

COMPOSICION RELATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS EN ALGUNAS NEOPLASIAS DEL CANINO

José L. Arias B. (MV), Carlos Cerpa G. (Lic. Biol.), Loreta Pérez C. (MV),
Loreto Muñoz A. (MV), Verónica Pozo G. (MV), Ema González Z. (QF)

RELATIVE COMPOSITION OF GLICOSAMINOGLYCANS IN SOME CANINE NEOPLASMS

By using an electrophoretic analysis of GAGs: isolated from canine mammary tumors, hepatomas and transmissible venereal tumors (TVT), were compared with the corresponding normal tissues. An increase of homopolimeric GAGs was observed (HA and CS). The findings were analysed according to the current antecedents about the role of GAGs in the biological behaviour of tumor cells.

Palabras claves: Glicosaminoglicanos, neoplasias, canino / **Key words:** Glicosaminoglycans, neoplasms, dogs.

Al analizar la arquitectura tisular de un metazoo se constata que entre los tejidos epiteliales, muscular, nervioso y las células del tejido conectivo, se presenta un abundante producto extracelular relativamente estable conocido como matriz extracelular (MEC) (Hay, 1981). La MEC está constituida principalmente por colágenos (Tipo I al XII), otras glicoproteínas (principalmente fibronectina y laminina), proteoglicanos (con sus glicosaminoglicanos sulfatados asociados) y glicosaminoglicanos no sulfatados (ácido hialurónico) (Hay, 1981; Kemp y Hinchliffe, 1984; Trelstad, 1984). Estos componentes, de manera aislada o en conjunto, son capaces de inducir la diferenciación celular, afectar la proliferación, influenciar el metabolismo celular, mediado por su interacción con componentes de la membrana celular y a través de ellos con el citoesqueleto, y servir como una vía específica de migración celular (Hay, 1981; Trelstad, 1984).

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son componentes no fibrilares de la MEC constituidos por cadenas lineales de disacáridos. Entre los de mayor importancia se conocen los GAGs sulfatados, queratán-sulfato (KS) condroitín 4 ó 6 sulfato (C-4-S y C-6-S), dermatán-sulfato (DS), heparán sulfato

(HS) y heparina (Hep), y un GAG no sulfatado, el ácido hialurónico o hialuronan (HA). Son moléculas polianiónicas a las que se les ha reconocido un importante rol como moduladores de superficie de la conducta celular (Hay, 1981; Kemp y Hinchliffe, 1984; Porter y Whelan, 1984; Trelstad, 1984). Su principal función parece estar relacionada con la organización de la MEC y en especial de la proteína fibrilogenética, colágenos intersticiales (I, II y III) y fibronectina. De acuerdo a su rol en la MEC se distinguen dos tipos de GAGs; los homopolímeros (HA y CS) y los copolímeros (HS y DS) (Chiarugi, 1982).

Muchas evidencias sugieren que los GAGs copolímeros son cofactores positivos del ensamblaje de la MEC, mientras que los homopolímeros se reconocen como desestabilizadores de la misma, favoreciendo por ejemplo, la migración y proliferación celular. Tales mecanismos parecen influenciar los procesos de proliferación, diferenciación y migración celulares que operan durante la ontogénesis (Trelstad, 1984) así, como también, parecen influir parcialmente en algunas de las conductas biológicas de las células neoplásicas en los procesos de invasión o metastasis (Chiarugi, 1982; Dietrich, 1984; Turley, 1984). Además, se ha encontrado que la presencia de heparán sulfato en la superficie celular es una señal que detiene la proliferación celular, en tanto que su desaparición ocurre alrededor de la profase y coincide con los cambios morfológicos que suceden al inicio de la mitosis (Kraemer y Tobey, 1972). Por su parte, también en condiciones normales, la presencia de condroitín sulfato en la

Departamento de Ciencias Biológicas Animales.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile

Financiado por Proyecto N° 0155/84 FONDECYT y Proyecto A
2937 D.T.I., Universidad de Chile

superficie celular coincide con el inicio de la citodiferenciación y estimula la proliferación celular (Dietrich, 1984).

En cuanto al rol del ácido hialurónico, éste se ha asociado al favorecimiento de la migración celular, especialmente a un aumento de la hidratación y turgencia de la matriz extracelular que tiene como consecuencia un aumento del espacio entre las láminas ortogonales de las fibras de colágeno. Tal rol es particularmente evidente en el movimiento celular que se presenta ampliamente definido durante el desarrollo (Toole, 1982).

Como una manera de relacionar los cambios en la composición relativa de algunos componentes de MEC con el comportamiento biológico de las células neoplásicas en los tumores, se determinó la composición relativa de glicosaminoglicanos en diversas neoplasias del canino, a saber: hepatomas, tumores mamarios y tumor venéreo transmisible (TVT).

MATERIAL Y METODOS

Las muestras consistieron en grupos de hepatomas, diversos tumores mamarios y tumores venéreos transmisibles junto con tejidos normales —hígado, vagina de hembras en diestro, prepucio, glándula mamaria en último tercio de gestación— provenientes de caninos machos o hembras mestizos. El grado de anormalidad y compromiso tumoral se analizó histopatológicamente.

Inmediatamente de extraídas las muestras fueron sometidas a los siguientes procedimientos.

1. Extracción de GAGs (según Breen y col. (1976) y Cella y col. (1979))

Las muestras fueron lavadas tres veces en una solución de NaCl 0,15 M, homogeneizadas y pesadas. El homogeneizado se suspendió en medio Dulbecco que contenía 0,01% de tripsina bajo agitación durante 15 min a 37°C. El incubado se centrifugó a 250 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se incubó en presencia de pronasa a razón de 30 µg/ml durante toda la noche a 37°C. Luego se agregó ácido tricloroacético (al 10% concentración final) bajo agitación a 4°C, centrifugándose luego la suspensión a 25.000 x g por 20 min a 4°C.

El sobrenadante obtenido se filtró a través de papel Whatman N° 1. Al filtrado se le agregó etanol 95% en proporción de tres veces el volumen obtenido, se dejó a 10°C toda la noche, lográndose la precipitación de los GAGs (Roden y col., 1972). El precipitado se recuperó en un filtro Goech N° 4 por vacío. Los GAGs fueron resolubilizados en agua destilada, congelados y posteriormente liofilizados.

2. Determinación de la presencia y cantidad total de GAGs. Reacción del carbazol cualitativa y cuantitativa (Bitter y Muir, 1962)

La presencia de GAGs se estima a través de la determinación colorimétrica del ácido urónico por el método de carbazol, en el cual el ácido sulfúrico hidroliza el enlace entre glucosamina y el ácido glucurónico, y el tetraborato de sodio aumenta la sensibilidad de la reacción. Por lo tanto no permite reconocer queratán sulfato.

Con cada muestra liofilizada se preparó una solución al 1%. De esta solución madre se hizo una nueva solución al 0,01%, la cual fue usada en la prueba cualitativa y cuantitativa del carbazol, usando glucuronato de sodio como estándar.

La transmitancia de las soluciones coloreadas se determinó en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch - Lomb), a una longitud de onda de 530 nm y luego se expresó como absorbancia. Los valores de absorbancia se multiplicaron por 2,5 obteniéndose los GAGs totales (Breen y col., 1976), los que se expresaron finalmente como porcentajes de GAGs.

3. Separación e identificación de GAGs por métodos electroforéticos

a) *Electroforesis en ácido clorhídrico* (Wessler, 1971)

La migración en estas condiciones depende del grado de sulfatación de los diferentes GAGs. Se utilizó como electrolito, una mezcla de ácido clorhídrico 0,1 N y cloruro de potasio 0,05 M y tiras de acetato de celulosa de 2,5 × 17 cm (Sepraphore III, Gelman), como soporte de la electroforesis. Se aplicaron 3 µl (30 µg) de soluciones al 1% de las muestras y 2 µl (20 µg) de los GAGs estándares. Las tiras se sometieron a un gradiente de potencial capaz de generar una corriente constante de 2 mA por tira (0,8 mA/cm), durante 5 hr. Posteriormente, se introdujeron en una solución de Alcian Blue (colorante policatiónico) 0,2% en acetato de sodio 0,05 M y etanol 95% (1:1) por 10 min; enseguida se fijaron en una solución de ácido acético al 5%.

Se usaron como GAGs estándares: ácido hialurónico (HA) (Sigma e Inst. Ronzoni); condroitín 4 y 6 sulfato (CS) (Inst. Ronzoni); dermatán sulfato (DS) (Inst. Ronzoni y Seikagaku); heparán sulfato (HS) (Inst. Ronzoni y Seikagaku); Heparinas "fast moving" (FM) y "slow moving" (SM) (Inst. Ronzoni).

El patrón de migración de los GAGs estándares en ácido clorhídrico, desde el cátodo hacia el ánodo, es el siguiente: cercano al origen migra el HA, un poco más distante el HS, luego CS y DS que

migran a la misma altura y finalmente las heparinas FM y SM, que migran juntas.

b) *Electroforesis en acetato de Bario*
(Wessler, 1968; Oreste y Torri, 1980)

En este caso la migración depende más de la estructura del GAG que del grado de sulfatación de éste. La electroforesis se realizó en una solución "buffer" de acetato de bario 0,1 M ajustado a pH 5,8 con ácido acético. Se aplicaron 4 µl (40 µg) de las soluciones de los GAGs de las muestras y 2 µl (20 µg) de los GAGs estándares. Las tiras se sometieron a una diferencia de potencial capaz de generar una corriente constante de 1mA por tira (0,4 mA/cm) durante 16 hrs. Para la tinción y fijación se siguieron los mismos procedimientos descritos para la electroforesis en ácido clorhídrico.

El comportamiento electroforético de los GAGs estándares en este medio, desde el cátodo hacia el ánodo, es el siguiente: muy cercano al origen migra la heparina SM; luego HS y heparina FM; más alejados DS y HA, que migran a la misma altura y finalmente CS.

4. Densitometría

Se utilizó este método para lograr una mejor identificación de los GAGs en cada una de las muestras y a su vez para poder cuantificar la proporción relativa de éstos. Se realizó densitometría a todas las tiras electroforéticas sometidas a ácido clorhídrico y "buffer" de acetato de bario.

Las tiras electroforéticas, una vez teñidas y fijadas, fueron aclaradas en una solución de metanol y ácido acético (4:1), durante 3 min. Luego se colocaron a la estufa a 85°C por alrededor de 30 min. Una vez aclaradas y frías, se cortaron de 8 × 1 cm de ancho para su posterior lectura en un densitómetro (Schimadzu UV-190) a 600 nm, obteniéndose una curva.

En la electroforesis en ácido clorhídrico, se calculó el área bajo la curva de los distintos trazados densitométricos, obteniéndose el porcentaje del total de absorbancia. Luego, se corrigió por un valor relativo que representa la afinidad equimolar de los diferentes GAGs para el Alcian Blue en ácido clorhídrico (Oreste, 1979), determinándose así el porcentaje que representa cada GAG en el total de los GAGs de la muestra.

RESULTADOS

Luego de la extracción y liofilización de la fracción que contenía los GAGs se estableció, mediante la reacción del carbazol, la concentración de GAGs totales que contenía cada liofilizado. Esto permitió establecer la cantidad absoluta de GAGs totales

obtenidos de cada muestra. Al calcular la concentración de GAGs totales presentes por unidad de peso de las muestras estudiadas (cuadro 1) se evidenció que la cantidad de GAGs totales no aumenta, cuando se comparan los tumores de origen principalmente epitelial con sus tejidos normales de origen. Es así cómo los adenocarcinomas no parecen producir más GAGs totales que la glándula mamaria ni los hepatomas con respecto al hígado normal. No obstante, los tumores cuyo origen presenta un gran componente mesenquimático sí presentan notablemente aumentada su concentración de GAGs totales. Los tumores mixtos mamarios presentan una mayor cantidad de GAGs totales que la glándula mamaria normal, y lo propio ocurre con los TVT al compararlos con los tejidos vaginales o prepuciales.

El análisis densitométrico, corregido por las afinidades relativas al Azul Alcian, de las electroforesis en HCl o en acetato de Ba, con o sin digestión mediante mucopolisacaridasas específicas, permitió estimar la proporción relativa de los distintos GAGs en las muestras estudiadas (cuadro 2).

Al comparar las proporciones relativas de los GAGs se evidencia que los tejidos normales presentan una mayor proporción de GAGs copoliméricos (HS y DS) que de homopoliméricos (HA y CS). Hace excepción a esto el tejido vaginal normal, el que presenta una proporción mayor de GAG homopoliméricos.

Si se obtienen las concentraciones absolutas de GAGs en los diferentes tejidos neoplásicos (cuadro 3) se observa una notable disminución del HS en todos los tumores comparados con sus tejidos normales, con excepción del tejido vaginal.

La disminución en HS es mayor en los adenocarcinomas que en los tumores mixtos mamarios.

Un aumento del DS se aprecia sólo en los tumores mamarios mixtos, mientras que de HA y CS se aprecia un aumento en todos los tumores, con excepción del TVT prepucial en el que no se detecta CS.

DISCUSION

Desde hace algún tiempo se ha propuesto que los GAGs están involucrados en procesos celulares fundamentales como crecimiento celular y mitosis, adhesividad, migración y reconocimiento celular, como también en transformación neoplásica (Hay, 1981; Kemp y Hinchliffe, 1984; Porter y Whelan, 1984; Trelstad, 1984).

En este estudio se analizaron muestras de glándulas mamarias caninas normales en las cuales se determina la presencia de HS, DS y CS. Estas glándulas provenían de perras que se encontraban en el último tercio de gestación, período en el cual

CUADRO 1
 CANTIDAD DE MUESTRAS DE TUMORES Y TEJIDOS NORMALES UTILIZADOS (g),
 CANTIDAD ABSOLUTA DE GAGs OBTENIDOS (mg)
 Y CONCENTRACION DE GAGs TOTALES PRESENTES POR UNIDAD
 DE PESO DE LAS MUESTRAS FRESCAS ($\text{mg} \times 10^{-5}$)

	Peso fresco tejido utilizado g	GAGs totales obtenidos mg	Mg de GAGs por mg de tejido $\text{mg} \times 10^{-5}$
Glándula mamaria normal	358,60	10,03	2,79
Adenocarcinoma mamario tubular simple	142,90	5,67	3,96
Adenocarcinoma mamario tubular complejo	482,60	12,04	2,49
Tumor mamario mixto maligno	777,80	66,97	8,60
Tumor mamario mixto benigno	270,00	29,82	11,04
Vagina normal	184,30	4,20	2,28
Prepucio normal	258,00	5,30	2,05
TVT vaginal	124,40	18,42	14,81
TVT prepucial	168,60	17,64	10,46
Hígado normal	745,00	6,10	0,87
Hepatomas	1.823,60	17,26	0,94

CUADRO 2
 COMPOSICION RELATIVA DE GAGs EN LOS TEJIDOS ESTUDIADOS (%)

	Acido hialurónico	Condroitín 1 y 4 sulfato	Heparán sulfato	Dermatán sulfato	Heparina
Glándula mamaria normal	—	11,20	43,68	45,12	—
Adenocarcinoma mamario tubular simple	2,17	63,50	7,12	27,21	—
Adenocarcinoma mamario tubular complejo	10,60	76,81	2,90	9,69	—
Tumor mamario mixto maligno	—	75,07	7,35	17,58	—
Tumor mamario mixto benigno	—	75,35	4,63	20,02	—
Vagina normal	67,81	24,82	7,37	—	—
Prepucio normal	—	10,65	33,42	55,93	—
TVT vaginal	79,25	18,55	2,20	—	—
TVT prepucial	84,64	—	2,10	13,26	—
Hígado normal	—	—	5,20	88,5	3,0
Hepatomas	62,7	28,15	3,95	5,1	—

CUADRO 3
 CONCENTRACION ABSOLUTA DE DIFERENTES GAGs POR mg
 DE TEJIDO ESTUDIADO (mg $\times 10^{-5}$)

	Acido hialurónico	Condroitín 4 y 6 sulfato	Heparán sulfato	Dermatán sulfato	Heparina
Glándula mamaria normal	—	0,31	1,22	1,26	—
Adenocarcinoma mamario tubular simple	0,086	2,51	0,28	1,07	—
Adenocarcinoma mamario tubular complejo	0,26	1,91	0,07	0,24	—
Tumor mamario mixto maligno	—	6,45	0,63	1,51	—
Tumor mamario mixto benigno	—	6,48	0,51	2,21	—
Vagina normal	1,54	0,56	0,17	—	—
Prepucio normal	—	0,22	0,68	1,14	—
TVT vaginal	11,73	2,75	0,32	—	—
TVT prepucial	8,85	—	0,22	1,38	—
Hígado normal	—	—	0,043	0,72	0,025
Hepatomas	0,59	0,26	0,037	0,048	—

el crecimiento de la glándula está dado principalmente por fenómenos de hipertrofia y de diferenciación con una baja tasa de división celular.

Cabe señalar que a medida que la glándula mamaria avanza en su diferenciación disminuye su síntesis de HA hasta desaparecer al momento de mayor diferenciación (Gordon y Bernfield, 1980). Esta observación es concordante con la composición relativa de GAGs encontrada en las glándulas mamarias normales en nuestro trabajo.

Al analizar la naturaleza y composición relativa de GAGs en los tumores mamarios, se debe considerar que se incluyen tanto los GAGs correspondientes a las células transformadas así como los generados como respuesta de los tejidos del huésped. Es así como resulta concordante el hecho que de aquellos tumores que presentan una apreciable producción de tejido conectivo (desmoplasia), como son los tumores mixtos, se obtuvo una mayor proporción de GAGs totales en el liofilizado.

Los tumores mamarios caninos analizados muestran una drástica disminución relativa de la proporción de HS comparados con la glándula mamaria normal. Tal disminución, unida al aumento en la proporción de CS, podría relacionarse al aumento de la proliferación y migración celular presente en tales tumores. De hecho, los proteoglicanos de HS asociados a la membrana celular pueden

ser los responsables de anclar la célula a la matriz (Koda y col., 1985; Rapraeger y Bernfield, 1985), en tanto que el CS puede alterar la especificidad y afinidad del HS a tal unión (Rapraeger y col., 1985).

La presencia de HA en los adenocarcinomas y su no determinación en los tumores mixtos podría relacionarse a la mayor invasividad relativa y mayor malignidad descrita en los primeros (Bostock, 1975).

Se ha demostrado que el HA promueve la formación de protrusiones o procesos citoplasmático celulares, posiblemente al reducir la adhesión celular al sustrato, contribuyendo de este modo a aumentar la motilidad (Erickson, 1980). El HA, dado su gran volumen de exclusión, es capaz de abrir espacios entre los tejidos liberando las células de su inhibición de contacto (Albercrombie, 1979) y/o proveyendo espacios para la consecuente movilidad celular e invasión (Turley, 1984).

La arquitectura tisular de la glándula mamaria normal, así como de otros órganos, se encuentra estabilizada por la interacción de elementos epiteliales y mesenquimáticos mediante una membrana basal (Hay, 1981; Porte y Whelan, 1984). Esta membrana basal consiste principalmente de genotipo IV, laminina y proteoglicanos, especialmente de HS, determina una compartimentalización tisular

característica, la que es destruida en presencia de carcinomas infiltrativos como el adenocarcinoma (Liotta y col., 1984). En general, se ha considerado este efecto, es decir, la presencia o ausencia de una membrana basal continua, como un criterio de diferenciación de un tumor benigno o maligno, o mejor aún de tumor no infiltrativo de uno infiltrativo (Liotta y col., 1984).

La mayor proporción relativa de HS, determinada en la glándula mamaria normal, debería ser un reflejo de la abundante membrana basal que la caracteriza, en tanto que su baja proporción relativa bien podría ser reflejo de su ausencia total en los adenocarcinomas y parcial en los tumores mixtos. Así también, la mayor proporción relativa de HA en los adenocarcinomas, podría reflejar las alteraciones en la MEC que favorecen el movimiento celular y por consiguiente su invasividad.

Con respecto al TVT, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que se presentan cambios en la composición relativa de glicosaminoglicanos (GAGs) al comparar tumores venéreos transmisibles de machos y hembras entre sí y respectivamente con sus tejidos huéspedes normales.

Es necesario tener presente que la extracción de GAGs de estos tumores comprende tanto aquéllos posiblemente sintetizados por las células transformadas así como aquellos generados por el tejido huésped en respuesta a la presencia de éstas. Sin embargo, en general los TVT estudiados presentan una mayor proporción de ácido hialurónico que sus tejidos normales. Es interesante destacar que a pesar de la ausencia de este GAG en prepucio normal, el TVT prepucial al igual que el TVT vaginal presenta ácido hialurónico, lo cual sería un indicador que la presencia de ácido hialurónico en estos tumores sería resultado de síntesis por parte de las células tumorales y no contaminación con componentes de la matriz del tejido normal.

La menor proporción de heparán sulfato en los TVT, al comparar con los tejidos normales, podría deberse, por una parte, a la ausencia en los tumores de una membrana basal continua, estructura en la cual el heparán sulfato corresponde a uno de sus principales constituyentes (Hay, 1981; Porter y Whelan, 1984; Trelstad, 1984), y por otra parte, sería reflejo de la naturaleza no epitelial de sus células, las que poseen una menor cantidad de tal GAG.

A pesar del aumento en la proporción de ácido hialurónico, cuestión que es bastante generalizada en muchos tumores (Chiarugi, 1982) y de la ausencia de una membrana basal continua que se ha indicado como característica de los tumores con alta capacidad invasora y metastizante (Liotta y col., 1984), al TVT, en general, se la considera un tumor con alta capacidad invasora, aunque sólo ocasional-

mente genera metástasis (Barron y col., 1963; Amber y Henderson, 1982). Las células de TVT tendrían la potencialidad de modificar profundamente la matriz extracelular, lo que facilitaría el proceso de invasión; sin embargo, la presentación de metástasis no sería frecuente, ya que las células transformadas son capaces de generar oportunamente una respuesta inmune que, o permite la remisión del tumor o limita su capacidad metastizante.

En relación con los hepatomas el mayor porcentaje relativo de GAGs presente en estos tumores con respecto a los de hígados normales, encontrados en este trabajo, es coincidente con un gran número de trabajos que demuestran la presencia de altos niveles comparativos de estos componentes en diversos tumores animales y humanos (Danishefsky y col., 1966; Kuroda y col., 1974; Kojima y col., 1975).

Edward y col. (1980), usando similares condiciones de extracción de GAGs que las usadas en este trabajo, encuentran que los GAGs predominantemente presentes en hígados de rata normal corresponden a heparán sulfato y dermatán sulfato, lo que es del todo coincidente con los GAGs informados aquí para hígados normales caninos. La aparición de heparina en estos hígados normales puede ser explicada por la parcial ruptura de células hepáticas durante los procedimientos de extracción de GAGs, ya que este GAG sulfatado se encuentra en el interior de las células.

De todas formas, la proporción de heparán sulfato obtenida en el presente trabajo, es menor que la obtenida por otros autores en hígados de otras especies y en células transformadas (Kojima y col., 1975; Nakamura y col., 1978; Kojima y col., 1982). Esto podría ser explicado por los diferentes procedimientos de extracción usados en este trabajo con respecto a estos autores. Es así como se debe considerar que la digestión con tripsina sólo remueve la mitad del heparán sulfato presente (Ohkubo y col., 1981; Dietrich, 1984), y que la precipitación con ácido tricloroacético también contribuye a que se pierda parte del heparán sulfato.

Aunque la proporción de heparán sulfato en hígados normales y hepatomas parece diferente, los valores absolutos son bastante similares; esto también coincide con la mayoría de los autores que reportan más bien cambios en el grado de sulfatación del heparán sulfato y no en su valor total (Nakamura y col., 1978; Hurst y col., Hurst y col., 1981).

La aparición de condroitín sulfato en los hepatomas es coincidente con similares hallazgos en células hepáticas transformadas *in vitro* (Ninomiya y col., 1980), en hepatomas de diversas especies (Kojima y col., 1975; Kojima y col., 1982), e incluso en algunas etapas de la regeneración hepática (Edward y col., 1980).

Este aumento de condroitín sulfato, al igual como se ha demostrado en otros modelos experimentales, podría estimular la proliferación celular presente en los hepatomas caninos. Este rol de condroitín sulfato como una molécula de "antirreconocimiento celular", se desprende ya sea de su rol de estimulación de la división celular o por su presencia a modo de una cubierta en superficies no agregantes, como ocurre en la pared de los vasos sanguíneos, en leucocitos y plaquetas (Vannuchi y col., 1982).

No obstante lo anterior, el hecho más notable en los hepatomas caninos es la alta proporción de ácido hialurónico. Su presencia en la superficie celular se ha reportado como indirectamente proporcional al grado de adhesión celular (Toole, 1982). Más aún, el ácido hialurónico promueve la desadhesión de una gran variedad de células (Abatangelo y col., 1982; Turley, 1984), y aunque él esté presente en el medio de migración de células embrionarias (Toole, 1982), y de células invasivas tumorales (Chiarugi, 1976), este polímero no parece actuar como sustrato para tales migraciones.

Tanto por sus propiedades sobre la desadhesividad celular como por su gran volumen de exclusión, que abre espacios entre los tejidos, liberando las células de su inhibición de contacto (Abercrombie; 1979), el ácido hialurónico de hecho promueve la migración celular, fenómeno de gran relevancia en la invasión celular durante la morfogénesis y tumorigénesis.

Aunque la síntesis de ácido hialurónico tiende a aumentar y la de heparán sulfato a disminuir en los tumores, los cambios precisos en la composición relativa de GAGs parecen estar más bien relacionadas con el tipo de tumor que con la tumorigénesis *per se* (Turley, 1984). Sin embargo, si se examina cuidadosamente el desarrollo de los tumores, se aprecia que los cambios más notables en la proporción relativa de GAGs son coincidentes con la invasión primaria y con la formación de metástasis (Toole, 1982).

Estas características fenotípicas de las células transformadas que tienen tanta influencia en fenómenos de diferenciación celular y en procesos de asociaciones celulares, hacen indispensable que se continúe, con la mayor profundidad posible, el estudio de los mecanismos por los que operan estos componentes de la matriz extracelular, de modo de reconocer puntos de control de la biología celular que permita actuar sobre la tumorigénesis o contrarrestar la invasividad y/o metástasis.

RESUMEN

Mediante el análisis electroforético de glicosaminoglicanos (GAGs) aislados de tumores mamarios,

hepatoma y tumores venéreos transmisibles (TVT) y de los tejidos normales correspondientes de caninos, se encontró un aumento en la proporción relativa y en la concentración de GAGs homopolímeros (HA y CS). Estos hallazgos se discuten a la luz de los antecedentes actuales acerca del rol de los glicosaminoglicanos en la conducta biológica de las células tumorales.

REFERENCIAS

- ABATANGELO, C.; R. CORTIVO; M. MARTELLI; P. VECCHIA. Cell detachment mediated by hyaluronic acid. *Exp. Cell Res.*, 137: 73-78, 1982.
- ABERCOMBIE, M. Contact inhibition and malignancy. *Nature (Lond.)*, 281: 259-262, 1979.
- AMBER, E.I.; R.A. HENDERSON. Canine transmissible venereal tumor: evaluation of surgical excision of primary and metastatic lesions in Zaria-Nigeria. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 18: 350-352, 1982.
- BARRON, C.N.; L.Z. SAUNDER; H.R. SERBOLD; M.K. HEATH. Intracellular tumors in animals. V. Transmissible venereal tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 24: 1263-1269, 1963.
- BITTER, T.; M. MUIR. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4: 330-334, 1962.
- BOSTOCK, D.E. The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Europ. J. Cancer* 11: 389-396, 1975.
- BREEN, M.; H.G. WEINSTEIN; L.J. BLACK; M.S. BORCHERDING; R.A. SITTING. Microanalysis and characterization of glycosaminoglycans from human tissue via zone electrophoresis. *Methods Carbohydr. Chem.* 7: 101-115, 1976.
- CELLA, M.C.; G. FIBBI; C. CANTINI; Z. DEL PANTA; V.P. VANNUCHI; C. CRISCI; M. DEL ROSSO; R. CAPPELLETTI; V.P. CHIARUGI. Intercellular glycosaminoglycans in human cancer. *Tumori* 65: 677-686, 1979.
- CHIARUGI, V.P. Cell coat glycosaminoglycans in cellular transformation and differentiation. *Exp. Cell. Biol.*, 44: 251-259, 1976.
- CHIARUGI, V.P. Glycosaminoglycans and neoplastic transformation. *Anticancer Res.* 2: 275-282, 1982.
- DANISHEFSKY, I.; E.T. OPPENHEIMER; O. HERITIER-WATKINS; M. WILLWHITE. Mucopolysaccharides in animal tumor. *Cancer Res.* 26: 229-232, 1966.
- DIETRICH, C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 17: 5-15, 1984.
- EDWARDS, M.; W.F. LONG; H.H.K. WATSON; F.B. WILLIAMSON. Sulfated glycosaminoglycans in regenerating rat liver. *Biochem. J.* 188: 769-773, 1980.
- ERICKSON, C.A. The deformability of BHK cells and polyoma virus-transformed BHK cells in relation to locomotory behavior. *J. Cell. Sci.*, 44: 187-200, 1980.
- GORDON, J.R.; M.R. BERNFIELD. The basal lamina of the postnatal mammary epithelium contains glycosaminoglycans in a precise ultrastructural organization. *Develop. Biol.*, 74: 118-135, 1980.
- HAY, E. Cell biology of extracellular matrix. New York, Academic Press, 426 p., 1981.
- HURST, R.E.; R.T. PARMELY; N. NAKAMURA; S.S. WEST; F.R. DENYS. Heparan sulfate of AH-130 ascites hepatoma cells: a cell-surface glycosaminoglycan not displaced by heparin. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 731-737, 1981.
- KEMP, R.B.; J.R. HINCHLIFFE. Matrices and cell differentiation. N.Y., A.R. Liss, 1984, 471 p.

- KODA, J.E.; A. RAPRAEGER; M. BERNFIELD. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 260(13): 8157-8162, 1985.
- KOJIMA, J.; N. NAKAMURA; M. KANATANI; K. OHMORI. The Glycosaminoglycans in human hepatic cancer. *Cancer Res.*, 35: 542-547, 1975.
- KOJIMA, J.; N. NAKAMURA; M. AKIYAMA. Glycosaminoglycans in 3-methyl-4 dimethylaminasobenzene - induced rat hepatic cancer. *Cancer Res.*, 42: 2857-2860, 1982.
- KRAEMER, P.M.; R.A. TOBEY. Cell cycle dependent desquamation of heparan sulfate from the cell surface. *J. Cell Biol.* 55: 713-717, 1972.
- KURODA, J.; S. SAITO; N. SENO; S. NAGASE; K. ANNO. Isolation and chemical characterization of mucopolysaccharides from rat tumors. *Cancer Res.*, 34: 308-312, 1974.
- LIOTTA, L.A.; C.N. RAO; S.H. BARSKY. Tumor cell interaction with the extracellular matrix. *IN: Trelstad, R.L. The role of extracellular matrix in development.* New York, Alan R. Liss, pp. 357-371, 1984.
- NAKAMURA, N.; R.E. HURST; S.S. WEST. Biochemical composition and heterogeneity of heparan sulfates isolated from AH-130 ascites hepatoma cells and fluid. *Biochem. Biophys. Acta.* 538: 445-456, 1978.
- NINOMIYA, Y.; R.I. HAYA; Y. NAGAL. Glycosaminoglycan synthesis by liver parenchymal cell clones in culture and its change with transformation. *Biochem. Biophys. Acta.* 629: 349-358, 1980.
- OHKUBO, Y.; I. FUNAKOSHI; I. YAMASHINA. Degradative removal of heparan sulfate from the surface of an ascites hepatoma, AH 66. *J. Biochem.*, 89: 161-167, 1981.
- ORESTE, P. Caratterizzazione del glicosaminoglicans mediante combinazione di metodi enzimatici e di risonanza magnetica nucleare. Tesis. Milano, Fac. Sci. Biol., Univ. Studi., 1979.
- ORESTE, P.; G. TORRI. Fingerprinting of heparins by low-amperage electrophoresis in barium acetate. *J. Chromatogr.*, 195: 398-401, 1980.
- PORTER, R.; J. WHELAN. Basement membranes and cell movement. London, Pitman, 285 p., 1984.
- RAPRAEGER, A.; M. BERNFIELD. Cell surface proteoglycan of mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 260: 4103-4109, 1985.
- RAPRAEGER, A.; M. JALKANEN; E. ENDO; J. KODA; M. BERNFIELD. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 260: 11046-11052, 1985.
- RODEN, L.; J.R. BAKER; J.A. CIFONELLI; M.B. MATHEWS. Isolation and characterization of connective tissue polysaccharides. *Methods Enzimol.*, 28: 73-140, 1972.
- TOOLE, B.P. Developmental role of hyaluronate. *Connect. Tissue Res.*, 10: 93-100, 1982.
- TRELSTAD, R.L. The role of extracellular matrix in development. N.Y., A.R. Liss, 643 p., 1984.
- TURLEY, E.A. Proteoglycans and cell adhesion. *Cancer Metast. Rev.*, 3: 325-339, 1984.
- VANNUCCHI, S.; G. FIBBI; R. CAPELLE; M. DEL ROSSO; V.P. CHIARUGI. Glycosaminoglycans changes involved in polymorphonuclear leukocyte activation "in vitro". *J. Cell Physiol.*, 111: 149-154, 1982.
- WESSLER, E. Analytical and preparative separation of acidic glycosaminoglycans by electrophoresis in barium acetate. *Anal. Biochem.* 26: 439-444, 1968.
- WESSLER, E. Electrophoresis of acidic glycosaminoglycans in hydrochloric acid: a micro method for sulfate determination. *Anal. Biochem.* 41: 67-69, 1971.

Recibido el 30 de enero de 1989.