

RESISTENCIA CONCOMITANTE ANTITUMORAL

RAUL A. RUGGIERO*, PEDRO D. DI GIANNI**, MARCELA FRANCO**, OSCAR D. BUSTUOABAD

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen La resistencia concomitante de ratones portadores de un tumor contra un implante secundario de ese mismo tumor, fue evaluada en ratones eutímicos y atímicos usando 17 tumores con diferentes grados de inmunogenicidad. Durante el desarrollo tumoral, se observaron dos picos, temporalmente separados, de resistencia concomitante: el primer pico fue detectado sólo con tumores inmunogénicos pequeños (< 500 mm³); fue específico de tumor y mediado por mecanismos inmunológicos clásicos dependientes de células T. El segundo pico fue exhibido por tumores grandes (> 2000 mm³) independientemente de su inmunogenicidad; fue inespecífico de tumor, timo-independiente y correlacionó con la presencia de un factor (o factores) del suero (ni anticuerpos ni complemento) que inhibía *in vitro* la proliferación de las células tumorales. De los 17 tumores estudiados, 15 mostraron una resistencia concomitante moderada o fuerte. Los dos tumores restantes, que mostraron una resistencia concomitante débil o indetectable y que exhibían correspondientemente una baja o nula actividad inhibitoria en el suero, eran los únicos que daban metástasis pulmonares. Esto sugirió una correlación entre resistencia concomitante, ausencia de metástasis y la existencia de un factor inhibidor en el suero. Este factor fue caracterizado parcialmente, mostrándose resistente al calor (5-10' a 100°C) y a cambios de pH, estimándose su peso molecular entre 850 y 1200 D; fue recuperado en columnas de HPLC (cromatografía líquida de alta performance) en una sola fracción presentando máxima absorción a 215 y 266 nm. Además, estudios de análisis de aminoácidos y de resonancia magnética nuclear sugirieron la presencia de una molécula de tirosina y una o más moléculas de hidratos de carbono en su estructura.

La resistencia concomitante antitumoral es el fenómeno según el cual un individuo portador de un tumor inhibe o retarda el crecimiento de un implante secundario de ese mismo tumor realizado en un sitio distante del crecimiento primario. Este fenómeno fue descrito originalmente por Paul Ehrlich¹ en 1906 y en 1908, Bashford² acuñó el nombre de «inmunidad concomitante» con el que se lo ha conocido habitualmente. Este nombre anticipa una interpretación inmunológica que pue-

de ser verdadera para ciertos tumores pero no necesariamente para otros, en virtud de lo cual el término «resistencia concomitante» parecería más adecuado.

La resistencia concomitante ha sido relativamente poco estudiada —en comparación con otras áreas de la oncología experimental— a pesar de haber sido descrita asociada a tumores humanos^{3,4} y a su posible participación en el control de las metástasis, teniendo en cuenta que éstas no son más que implantes secundarios naturales en un individuo portador de un tumor. En este sentido, la experiencia clínica y numerosos datos experimentales han revelado que, en muchas ocasiones, la extirpación de un tumor va seguida de un rápido desarrollo de metástasis que no eran aparentes al tiempo de la extirpación,

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

** Becario del CONICET

Dirección postal: Dr. Raúl A. Ruggiero, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires, Argentina.

sugiriendo que la presencia del tumor primario ejerce un control inhibitorio sobre aquéllas^{3, 5, 6}.

Durante muchos años, la resistencia concomitante fue estudiada utilizando tumores murinos fuertemente inmunogénicos inducidos por dosis masivas de carcinógenos químicos o virales; en consecuencia, el fenómeno fue explicado desde un punto de vista puramente inmunológico, suponiendo que el mecanismo por el cual se inhibía el implante tumoral secundario no era diferente del encargado de rechazar microorganismos patógenos o tejidos extraños⁷⁻⁹. Sin embargo, si bien los linfocitos derivados del timo (linfocitos T) y, en menor medida los anticuerpos, cumplen sin duda un papel en la resistencia concomitante inducida por tumores inmunogénicos, había en la literatura ciertos datos —no siempre debidamente reconocidos— que sugerían que un mecanismo diferente del inmunológico también podía, quizá, participar en la generación de la resistencia concomitante^{10, 11}.

Debido a esto, en 1982 comenzamos a investigar sistemáticamente el fenómeno de resistencia concomitante utilizando especialmente (aunque no exclusivamente) como modelos de estudio, a tumores murinos con débil o indetectable inmunogenicidad. Suponíamos que si la resistencia concomitante se manifestaba aún con estos tumores, ello habría de significar, inequívocamente, que existía un mecanismo antitumoral que no dependía del sistema inmunológico convencional.

La importancia de un mecanismo de este tipo radica en el hecho de que la gran mayoría de los tumores espontáneos de rata y ratón y presumiblemente un considerable porcentaje de los tumores humanos, carecen de detectable inmunogenicidad^{12, 13}. Por lo tanto, no cabría esperar que los métodos inmunoterapéuticos convencionales que presuponen precisamente la inmunogenicidad de los tumores, fueran eficaces contra ellos. En cambio, métodos no inmunológicos que no presuponen la inmunogenicidad de los tumores, podrían eventualmente servir como herramientas terapéuticas contra todo tipo de tumores, independientemente de su inmunogenicidad.

Descripción del ensayo de resistencia concomitante

Antes de iniciar la descripción de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, es conve-

niente mencionar el ensayo de resistencia concomitante utilizado en todo este estudio: un grupo de ratones recibía un implante de un tumor por vía s.c. en el flanco derecho, seguido a diferentes intervalos, por un segundo implante del mismo tumor en el flanco izquierdo. Otro grupo de ratones (controles) era desafiado sólo en el flanco izquierdo. La medida o el título de resistencia concomitante se definió como el cociente entre la TD50 del implante secundario en ratones portadores de tumor y la TD50 en ratones controles (TD50 es el número de células tumorales capaces de crecer en el 50% de los ratones). Cuanto mayor es la TD50 del implante secundario con respecto a la TD50 de los controles, mayor es la inhibición de ese implante secundario y en consecuencia mayor es la resistencia concomitante.

Resistencia concomitante en tumores murinos

Desde 1982 hasta la fecha, hemos estudiado la resistencia concomitante asociada a 17 tumores murinos con diferentes grados de inmunogenicidad, desde tumores con fuerte inmunogenicidad hasta aquéllos con inmunogenicidad débil o nula (Tabla 1)¹⁴⁻¹⁶.

Los resultados de este estudio sugieren que, durante el desarrollo de un tumor primario, pueden ser detectados 2 picos temporalmente separados de resistencia concomitante (Fig. 1); con fines de mayor simplicidad se muestran aquí los datos correspondientes a sólo 9 de los tumores descritos en Tabla 1: el resto de los tumores con débil o nula inmunogenicidad se comportan en forma parecida al tumor LB, salvo el MM3 que se asemeja más al C7HI. El primer pico se observa cuando el tumor es pequeño (< 500 mm³) al tiempo del segundo implante tumoral, es específico de tumor (esto es, sólo se observa cuando el segundo implante se lleva a cabo con células del propio tumor pero no con células de otro tumor), y es timo-dependiente (desde que se observa en ratones eufímicos pero no en ratones nude, genéticamente timoprivos). La intensidad del primer pico de resistencia concomitante es proporcional a la inmunogenicidad tumoral (esto es, cuanto mayor es la inmunogenicidad del tumor, mayor es la altura del primer pico de resistencia concomitante; recíprocamente cuando la inmunogenicidad es débil o nula, el primer pico no se observa) y

TABLA 1.- Origen, tipo e inmunogenicidad de los tumores utilizados en los experimentos de resistencia concomitante

Tumor	Origen	Tipo	Inmunogenicidad
L15-A	Alogeneico	Linfoma	Muy fuerte
MC-D	Inducido ¹	Fibrosarcoma	Fuerte
MC-C	Inducido ¹	Fibrosarcoma	Fuerte
MNU-MPA	Inducido ^{2/3}	Ca. mama	Moderada
MC-B	Inducido ¹	Fibrosarcoma	Moderada
MNU	Inducido ³	Ca. mama	Moderada
M3	Espontáneo	Ca. mama	Débil
MM3	Variante de M3	Ca. mama	Débil
CS	Inducido ⁴	Ca. mama	Débil
C7HI	Inducido ²	Ca. mama	Indetectable
PX	Inducido por cuerpo extraño ⁵	Fibrosarcoma	Indetectable
CM	Espontáneo	Ca. mama	Indetectable
CEP	Espontáneo	Ca. indiferenciado	Indetectable
CEI	Espontáneo	Ca. indiferenciado	Indetectable
CPV	Espontáneo	Ca. indiferenciado	Indetectable
L15-S	Espontáneo	Linfoma	Indetectable
LB	Espontáneo	Linfoma	Indetectable

1: MC = metilcolantreno; 2: MPA = medroxiprogesterona; 3: MNU = metilnitrosourea; 4: MMTV = virus de tumor mamario murino; 5: cilindro de vidrio implantado s.c.

una típica reacción de rechazo inmunológico, con profusa infiltración de macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos, se observa histológicamente en el sitio del segundo implante tumoral, causando la muerte de éste. Más aún, la cinética de aparición y desaparición del primer pico de resistencia concomitante inducido por un tumor correlaciona con la aparición y desaparición de anticuerpos y linfocitos citotóxicos contra ese tumor.

Por otro lado, el segundo pico de resistencia concomitante se observa cuando el tumor es grande (> 2000 mm³) al tiempo del segundo implante tumoral, no es específico de tumor y es timoindependiente (desde que se observa tanto en ratones eutímicos como en ratones nude).

El segundo pico de resistencia concomitante es inducido por tumores inmunogénicos y no inmunogénicos y el análisis histológico en el sitio del segundo implante tumoral —inhibido por resistencia concomitante— muestra células tumorales morfológicamente bien preservadas, sin signos de necrosis y sin infiltración por parte de células del huésped, contrastando con una reacción clásica de rechazo inmunológico. Una marcada

disminución en el número de mitosis por campo puede ser vista en este implante secundario respecto de los controles, lo que sugiere un mecanismo citostático que lleva a este implante a un estado de tumor dormido. No sabemos todavía si esta citostasis se debe a una acumulación de células en un punto dado del ciclo celular o a un equilibrio dinámico entre proliferación y muerte (por ejemplo, por apoptosis) o a ambas causas. El segundo pico de resistencia concomitante no está asociado a ninguna respuesta inmunológica convencional, sea específica (anti-cuerpos, linfocitos T) o inespecífica (NK, macrófagos); en cambio, correlaciona con factores presentes en el suero de ratones portadores de tumores grandes (diferentes de anticuerpos citotóxicos y complemento) que inhiben la proliferación *in vitro* de las células tumorales. Esto es, cuanto mayor es la altura del segundo pico de resistencia concomitante, mayor es la actividad inhibitoria observada en el suero de estos ratones; recíprocamente, cuando el segundo pico está ausente, también lo está esta actividad inhibitoria del suero (Fig. 2).

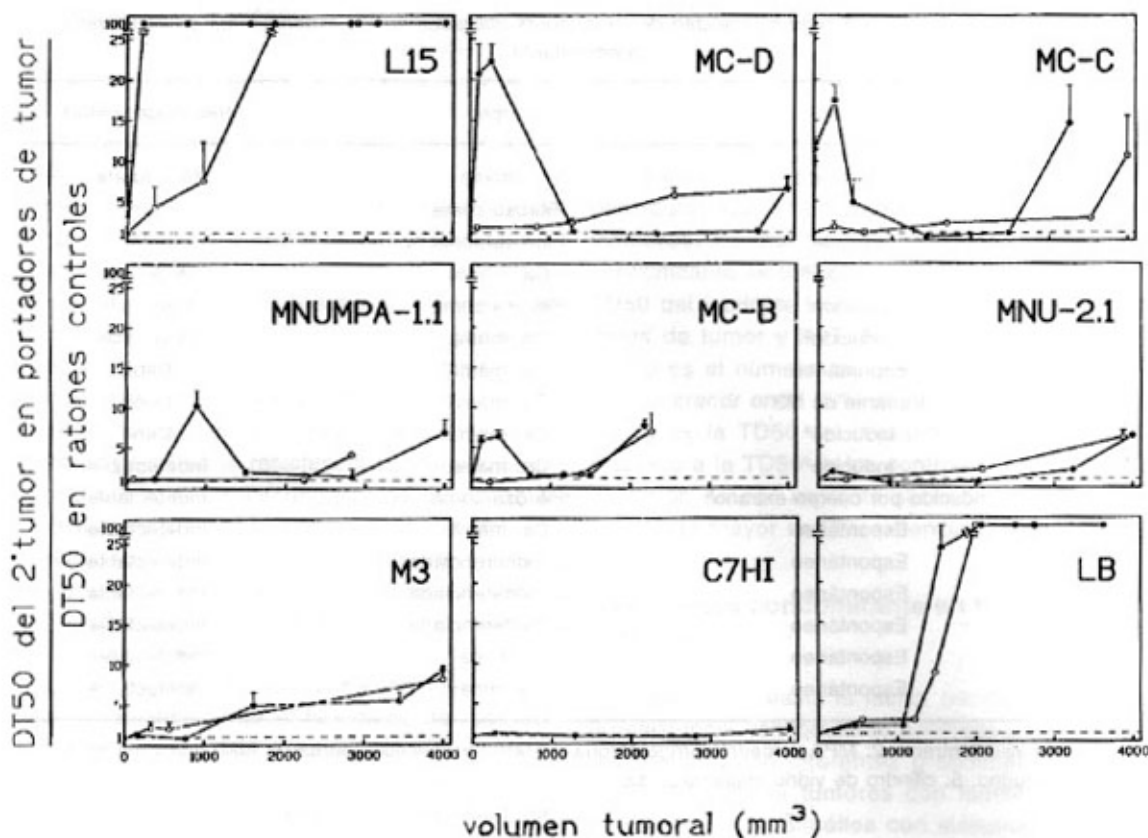


Figura 1.

Resistencia concomitante y metástasis

En su gran mayoría, los tumores que hemos estudiado exhiben una resistencia concomitante moderada o fuerte y, como hemos visto en el punto anterior, existe una estrecha correlación entre el segundo pico de resistencia concomitante y la existencia en el suero de factores inhibidores de la proliferación tumoral *in vitro*. Sólo dos tumores muestran una resistencia concomitante débil (tumor MM3) o nula (tumor C7HI) a lo largo de todo su desarrollo y los ratones portadores de estos tumores exhiben, correspondientemente, una baja o nula actividad inhibitoria en el suero. Es interesante señalar que estos tumores son —entre los que hemos estudiado— los únicos que dan metástasis pulmonares siendo el C7HI el más metastásico de los dos. Todo esto sugiere una correlación entre resistencia concomitante, ausencia de metástasis y actividad inhibitoria en el suero. Una evidencia adicional en este sentido lo brinda el siguiente

experimento (manuscrito en preparación): ratones portadores de C7HI fueron divididos en dos grupos; uno de ellos recibió un implante del tumor LB (que no da metástasis) y el otro, no recibió nada. Cuando los ratones estaban moribundos, fueron sacrificados y se analizaron los pulmones. Los ratones que portaban sólo C7HI y que no tenían actividad inhibitoria en el suero, mostraron un alto número de metástasis; los que portaban ambos tumores y tenían una alta actividad inhibitoria (producida por el tumor LB) exhibieron un número de metástasis muy inferior (Fig. 3). Esto significa que las metástasis de un tumor que no da resistencia concomitante, pueden ser inhibidas por la presencia de otro tumor que sí da resistencia concomitante. Dado que ambos tumores (C7HI y LB) carecen de inmunogenicidad y que resultados similares fueron obtenidos en ratones eufímicos y nude, puede concluirse que esta inhibición de las metástasis no está relacionada con un mecanismo inmunológico convencional.

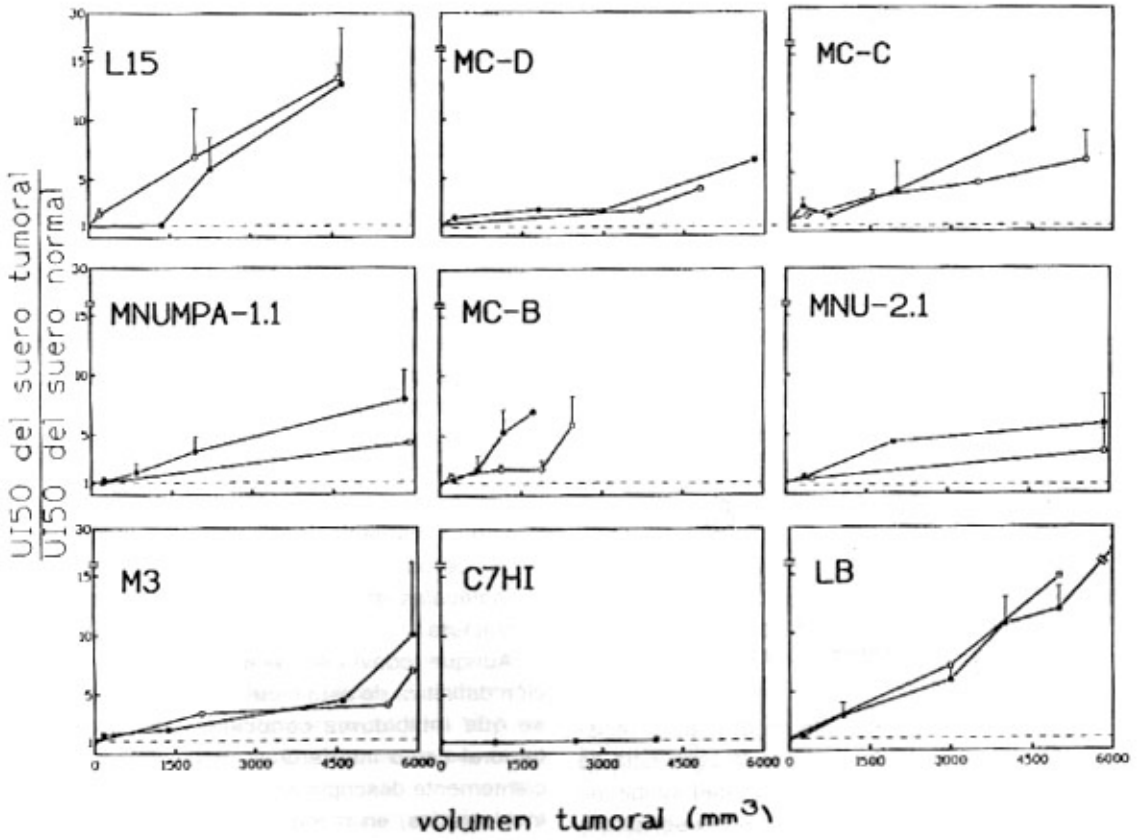


Figura 2.

Resistencia Concomitante y Metástasis

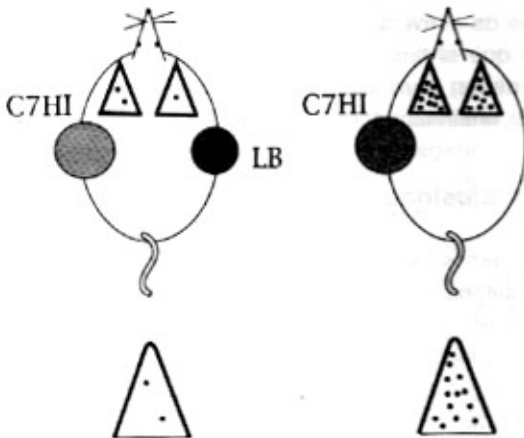


Figura 3.

Resistencia concomitante en ratones en parbiosis

La actividad inhibitoria de la proliferación tumoral *in vitro*, presente en el suero de ratones portadores de tumores grandes que generan resistencia concomitante, no parece ser sólo un acompañante de este fenómeno sino que puede ser su causa. En efecto, una resistencia al crecimiento de un implante tumoral —por ejemplo, del tumor LB— fue observada en un ratón normal unido en parbiosis a un ratón portador de LB. Esta imitación de la resistencia concomitante correlacionó con la presencia de actividad inhibitoria sérica transferida del ratón portador de tumor al ratón normal unido en parbiosis con él. Más aún, cuando ambos ratones en parbiosis fueron separados, el título de actividad inhibitoria decayó rápidamente en el suero del ratón normal, en el que las células LB previamente inhibidas comenzaron a crecer (Fig. 4).

Resistencia Concomitante y Parabiosis

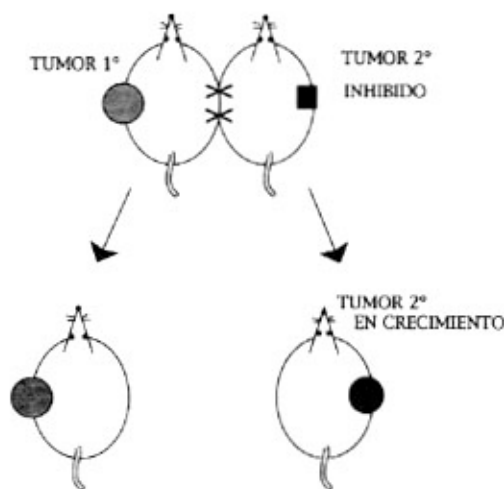


Figura 4.

Estos experimentos sugieren que: a) la resistencia concomitante depende de la presencia de un alto y persistente nivel de actividad inhibitoria en el suero, y b) que este nivel podría ser alcanzado sin enfermedad aparente, lo que sugiere que esta actividad inhibitoria puede ser útil en la terapéutica antitumoral.

Caracterización del factor(es) inhibidor presente en el suero de ratones portadores de tumores grandes

Hemos señalado que el primer pico de resistencia concomitante puede ser explicado a través de mecanismos inmunológicos convencionales que han sido extensamente estudiados por otros autores^{9, 19}. La limitación de estos mecanismos es que sólo pueden ser inducidos por y aplicados contra un mismo tumor inmunogénico.

El segundo pico de resistencia concomitante, en cambio, puede ser inducido por un tumor y aplicado contra otro, independientemente de la inmunogenicidad de ambos. Este segundo pico de resistencia concomitante correlaciona con la aparición en suero de una actividad inhibitoria de la proliferación *in vitro* de las células tumorales. Teniendo en cuenta que se trata de un mecanismo no investigado en otros laboratorios, pareció im-

portante tratar de purificar y caracterizar esta actividad antitumoral. Aunque todavía no hemos completado su caracterización, podemos adelantar algunas conclusiones:

- a. Se trata de un factor(es) de bajo peso molecular, ya que por estudios de cromatografía en columna, en capa delgada y espectrometría de masa; su peso se ha estimado entre 850 y 1200 D.
- b. Es resistente al calor (5-10' a 100°C) y permanece estable en un rango de pH entre 4 y 11.
- c. Es recuperado en columnas de HPLC (cromatografía líquida de alta performance) en un sólo pico presentando máxima absorción a 215 y 266 nm.
- d. Estudios de análisis de aminoácidos y de resonancia magnética nuclear sugieren la presencia de una molécula de tirosina y una o más moléculas de hidratos de carbono en su estructura.

Aunque todavía es necesaria una caracterización definitiva de esta molécula, puede adelantarse que inhibidores conocidos del crecimiento tumoral como interferones, TNF, TGFβ y la recientemente descrita angiostatina²⁰⁻²³ no estarían involucrados, en razón de su mayor peso molecular (que oscila entre 18.000 y 40.000 D) y de otras propiedades físicas (p.e. TNF, TGFβ y angiostatina no resisten el calentamiento a 100°C).

El origen de este factor inhibidor aún es incierto: hasta hoy ha sido sólo ocasionalmente recuperada alguna actividad inhibitoria en el medio condicionado de algunos tumores; por otro lado, la timectomía o esplenectomía no reducen el título de actividad inhibitoria en el suero (sugiriendo que el timo y el bazo no cumplen un rol importante) pero sí lo hace el tratamiento con drogas antiinflamatorias (resultados no publicados).

Conclusiones y perspectivas

Hemos caracterizado parcialmente una actividad inhibitoria de la proliferación tumoral presente en el suero de ratones portadores de tumores grandes e inductores de resistencia concomitante.

Según estudios en ratones en parabiosis, esta actividad inhibitoria podía ser la causa del segundo pico de resistencia concomitante. No obstante, a pesar de que esta actividad puede ser trans-

ferida entre ratones en parabiosis, nosotros no hemos podido transferirla a ratones normales por inoculación periódica de suero de ratones portadores de tumor. Teniendo en cuenta que el suero normal no elimina *in vitro* la actividad del suero de portadores de tumor y que las funciones de clearance no parecen estar afectadas en estos ratones, la explicación más simple para el alto y persistente nivel de actividad inhibitoria en el suero de ratones portadores de tumor es que ésta es continuamente producida para compensar el alto rango de pérdida. Si así fuera, el problema de transferir resistencia antitumoral sería meramente técnico y basado en determinar qué protocolo de inoculación de suero podría imitar o simular su producción *in vivo*. En este sentido, contar con una importante cantidad de actividad inhibitoria purificada podría aumentar considerablemente las posibilidades de transferencia. No obstante, la enorme producción de actividad inhibitoria requerida por esta explicación y los numerosos intentos fallidos para transferir resistencia antitumoral a través de suero en éste y otros modelos^{24, 26} hace abrigar sospechas de que el problema pueda no ser sólo técnico.

Es intrigante que una situación similar a la observada con la resistencia concomitante, ocurre en la regulación del crecimiento del hígado. En efecto, una hepatectomía parcial o total estimula las mitosis en hepatocitos previamente no-proliferantes ubicados en cualquier lugar del organismo²⁷, en la misma forma que la extirpación de un tumor induce la proliferación de las metástasis o de los implantes secundarios previamente inhibidos de crecer por resistencia concomitante^{14, 28}. Más aún, el suero de animales normales y hepatectomizados exhibe efectos inhibidores y estimuladores, respectivamente, de la proliferación *in vitro* de los hepatocitos; no obstante, los numerosos intentos para inhibir la regeneración hepática por repetidas inyecciones de suero normal o para estimular el crecimiento hepático por inyecciones de suero de animales hepatectomizados no han sido, hasta hoy, exitosos, mientras que la transferencia de señales inhibitorias o estimuladoras de la proliferación hepática fue posible entre animales en parabiosis^{29, 30}.

Si las analogías son algo más que casualidades, la comprensión de la resistencia concomitante —especialmente del mecanismo del segundo pico de resistencia concomitante inducido por tu-

mores grandes, independientemente de su inmunogenicidad— podría ayudar a develar algunos mecanismos de control de la proliferación celular normal y tumoral y, eventualmente, a mejorar la terapia antineoplásica convencional.

Summary

Antitumor concomitant resistance

Concomitant resistance of tumor-bearing mice against a second tumor challenge was evaluated in euthymic and athymic mice using 17 tumors with different degrees of immunogenicity.

Two temporarily separated peaks of concomitant resistance were detected during tumor development: the first peak was only observed associated with small immunogenic tumors (< 500 mm³); it was tumor-specific and mediated by Tcell-dependent immunological mechanisms. The second peak was exhibited by large tumors (> 2000 mm³) independently of their immunogenicity; it was non-tumor specific, thymus-independent and correlated with a serum-activity (neither antibodies nor complement) which inhibited the *in vitro* proliferation of tumor cells.

Out of 17 tumors studied, 15 tumors exhibited a moderate or strong concomitant resistance. The remaining two, which exhibited a weak or undetectable concomitant resistance and correlatively, a low or absent serum-inhibitory activity were the only tumors which induced lung metastases. This fact suggested a correlation between concomitant resistance, absence of metastases and the existence of an inhibitory factor(s) in the serum.

This inhibitory factor was partially characterized: it was resistant to boiling (5-10' at 100°C) and to variations of pH; its molecular weight was estimated between 850 and 1200 D; it was recovered in only one fraction from HPLC (high power liquid chromatography) columns presenting maximum absorption at 215 and 266 nm; aminoacid analysis and magnetic nuclear resonance studies suggested the presence of a molecule of tyrosine and one or two molecules of carbohydrates in its structure.

Bibliografía

1. Ehrlich P. Experimentelle Carcinomstudien an Mäusen: *In: Arbeiten aus dem Koiglichen Institut für Experimentelle Therapie zu Frankfurt/AM, Ehrlich P (ed) Jena: Fisher, 1906; 77-103.*
2. Bashford E, Murray J, Haaland M. General results

- of propagation of malignant new growths. In: Bashford (ed). Third scientific report on the investigation of the Imperial Cancer Research Fund. London: Taylor and Francis, 1908; 262-8.
3. Lange PH, Hekmat K, Bosl G, et al. Accelerated growth of testicular cancer after cytoreductive surgery. *Cancer* 1980; 45: 1498-506.
 4. Southam CM. Co-existence of allogeneic tumour growth and homograft immunity in man. *Europ J Cancer* 1968; 4: 507-11.
 5. Gorelik E. Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. *Adv Cancer Res* 1983; 39: 71-120.
 6. Sugarbaker EV, Thornthwaite J, Ketchan AS. Inhibitory effect of a primary tumor on metastasis. In: Day SB (ed). *Cancer Invasion and Metastasis*, New York: Raven Press, 1977: 227-40.
 7. Akporiaye ET, Kudalore M, Stevenson AP, et al. Isolation and reactivity of host effectors associated with the manifestation of concomitant tumor immunity. *Cancer Res* 1988; 48: 1153-8.
 8. Belehradec J, Barski G, Thonier M. Evolution of cell-mediated antitumor immunity in mice bearing a syngeneic chemically induced tumor. Influence of tumor growth, surgical removal and treatment with irradiated tumor cells. *Int J Cancer* 1972; 9: 461-9.
 9. North RJ. Down-regulation of the antitumor immune response. *Adv Cancer Res* 1985; 45: 1-43.
 10. Gorelik E, Segal S, Feldman M. On the mechanism of tumor «concomitant immunity». *Int J Cancer* 1981; 27: 847-56.
 11. Yuhás JM, Pazmiño NH, Wagner E. Development of concomitant immunity in mice bearing the weakly immunogenic line 1 lung carcinoma. *Cancer Res* 1975; 35: 237-41.
 12. Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defence against cancer based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976; 33: 241-59.
 13. Middle JG, Embleton MJ. Naturally arising tumours of the inbred WAB/Not rat strain II. Immunogenicity of transplanted tumours. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 637-43.
 14. Bonfil RD, Ruggiero RA, Bustuoabad OD, et al. Role of concomitant resistance in the development of murine lung metastases. *Int J Cancer* 1988; 41: 415-22.
 15. Franco M, Bustuoabad OD, di Gianni PD, et al. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumors. *Br J Cancer* 1996; 74: 178-186.
 16. Meiss RP, Bonfil RD, Ruggiero RA, Pasqualini CD. Histologic aspects of concomitant resistance induced by non-immunogenic murine tumors. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 1163-75.
 17. Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Bonfil RD, et al. «Concomitant immunity» in murine tumors of non-detectable immunogenicity. *Br J Cancer* 1985; 51: 37-48.
 18. Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Cramer P, et al. Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing nonimmunogenic tumors. *Cancer Res* 1990; 50: 7159-65.
 19. Tuttle RL, Knick VC, Stopford CR, Wolberg G. In vivo and in vitro antitumor activity expressed by cells of concomitantly immune mice. *Cancer Res* 1983; 43: 2600-5.
 20. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320: 584-8.
 21. Keski-Oja J, Postlethwaite AE, Moses HL. Transforming growth factors in the regulation of malignant cell growth and invasion. *Cancer Investigation* 1988; 6: 704-24.
 22. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-28.
 23. Trincheri G, Perussia B. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 1985; 6: 131-6.
 24. Gershon RK, Carter RL, Kondo K. On concomitant immunity in tumor-bearing hamsters. *Nature* 1967; 213: 674-6.
 25. Vaage J, Agarwal S. Serum therapy for radiation-induced impairment of immune resistance to metastases. *Cancer Res* 1977; 37: 3556-60.
 26. Woglom WH. Immunity to transplantable tumours. *Cancer Rev* 1929; 4: 129-209.
 27. Jirtle RL, Michalopoulos G. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. *Cancer Res* 1982; 42: 3000-4.
 28. Gorelik E. Antimetastatic concomitant immunity. In: Liotta LA, Hart JR (eds). *Tumor Invasion and Metastasis*. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, 1982: 113-31.
 29. Bresnick E. Regenerating liver: an experimental model for the study of growth. *Methods Cancer Res* 1971; 6: 347-97.
 30. Moolten FL, Bucker NLR. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross-circulation. *Science* 1967; 158: 272-4.