



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Z A R A G O Z A

LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

Estudio del efecto de los medios condicionados
de Células Epiteliales y Fibroblásticas de
Cérvix Normal Humano, sobre el crecimiento
de Células TumORAles Provenientes de
Biopsias de Cáncer Cérvico-Uterino y la
Línea Tumoral HEP-2 IN VITRO

T E S I S
Que para Obtener el Grado de
B I O L O G O
P r e s e n t a
Luis Martínez Yáñez



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E .

PAGINA.

RESUMEN.....	1
MARCO TEORICO.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
HIPOTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	27
METODOLOGIA.....	28
RESULTADOS.....	32
ANALISIS DE RESULTADOS.....	43
CONCLUSIONES.....	46
APENDICES.....	47
LITERATURA CITADA.....	56
AGRADECIMIENTOS.....	66

RESUMEN.

La división celular, es un mecanismo biológico que permite que las células se reproduzcan, estableciendo así la restitución de células muertas. Sin embargo, este mecanismo de división, está regulado por factores o moduladores biológicos, que permiten establecer un control positivo o negativo de la proliferación celular, dependiendo de las condiciones microambientales en las que se encuentran las células.

Las células epiteliales y fibroblásticas son dos tipos celulares que presentan algunas características comunes. Ambas se encuentran en estrecha relación, compartiendo microambientes en los diferentes órganos en los que ellos residen.

De manera natural e *in vitro*, estas células presentan un mecanismo regulador de su división, que permite activar o inhibir su proliferación en base a la densidad, estableciendo un alto en la división celular por contacto. En este trabajo, se aportan evidencias de que las células normales epiteliales y fibroblásticas confluentes derivadas de cérvix humano, secretan al medio de cultivo un factor que inhibe la proliferación de sí mismas, así como de células tumorales provenientes de cáncer cérvico uterino. Se muestra que dicho factor es secretado a partir del día 10 de cultivo y que inhibe hasta un 40 % la proliferación de células tumorales provenientes de cáncer cérvico uterino, así como a las células tumorales provenientes de la línea tumoral de vejiga humana HEP, sugiriendo que el factor podría ejercer su efecto en células epiteliales independientemente del órgano del cual son derivadas. También se sugiere que la actividad inhibitoria del crecimiento presente en el medio condicionado, está dada por un factor de naturaleza proteica, ya que el medio condicionado en el que se encuentra, al ser tratado con una proteasa (Tripsina), su actividad inhibitoria es decrecio en un 50 %.

Por otro lado, el hecho de que el medio condicionado de Fibroblastos confluentes afecta la proliferación de las células epiteliales tanto normales como tumorales, establece que el fibroblasto y las células epiteliales derivadas de cérvix tanto normal como tumoral, interactúan de manera estrecha, logrando una comunicación bilateral que les permite regular su proliferación de manera autócrina y parácrina.

La relevancia de este estudio, constituye en la aportación de conocimientos que permiten comprender de una manera más clara, como el mecanismo de división de éstos dos tipos celulares es regulado, como interactúan entre sí y como una posible deficiencia en la secreción de este factor podría provocar un estado patológico en las células. Esto basado en el efecto inhibitorio observado en células normales y tumorales, lo que hace pensar que quizás el estado malignante de estas células tumorales esté directamente relacionado con la ausencia del factor inhibidor secretado por células normales. De ser cierto esta especulación, la purificación y caracterización de tal factor, podría tener una posible aplicación terapéutica para el tratamiento de enfermedades como es el cáncer de cérvix, cuya incidencia en la población mexicana es muy alta.

M A R C O T E O R I C O .

El cultivo de tejidos in vitro es una técnica que nos permite aislar diversos tipos celulares, propagarlos y conservarlos dentro de los medios nutritivos en condiciones de laboratorio controladas, permitiendo el estudio de diversos procesos celulares en áreas tales como: diferenciación celular, genética, endocrinología, etc. (1). Es hasta ahora una de las principales técnicas que posibilita la identificación y caracterización de un gran número de factores celulares, contribuyendo a la elaboración de modelos que expliquen la función de éstos factores, así como los mecanismos por los cuales éstos actúan.

El análisis de los procesos celulares in vitro, requiere del uso de sistemas que estén estructurados de una manera simple, y al mismo tiempo que puedan enfatizar los complejos procesos que involucra la regulación del metabolismo de la célula.

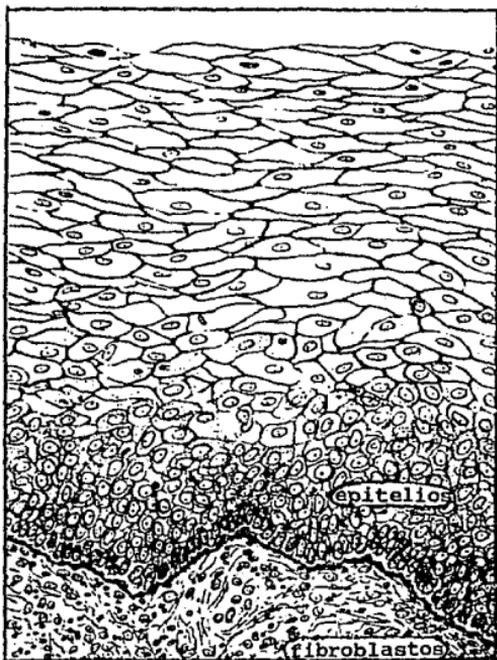
Uno de los procesos más estudiados es la división celular, debido a la importancia que representa este mecanismo para la organización estructural y funcional de los individuos. Mediante la técnica de cultivo, ha sido posible establecer las condiciones de crecimiento de diferentes tipos celulares, sin embargo, pese a los esfuerzos realizados en el mejoramiento de los medios de cultivo, existen ciertos tipos celulares de los cuales aún se desconoce cuales son las condiciones precisas que permitan mantenerlos por largos periodos de tiempo, inclusive hacerlos proliferar de manera uniforme in vitro.

Los epitelios, son uno de los tipos celulares a los que las condiciones de cultivo no se les ha precisado, no obstante, estas células son cultivadas en condiciones específicas que dependen del órgano del cual fueron obtenidos (2). La importancia de estas células radica en su papel multifuncional dentro del organismo. Los epitelios llevan a cabo la secreción de diversos factores con acción autócrina, parácrina y endócrina, revisten a todos los órganos así como a cavidades del mismo cuerpo, intervienen en el proceso de regeneración de órganos, en la generación de células hematopoiéticas, sirve como barrera de protección contra agentes extraños etc. Para realizar estas funciones, las células epiteliales forman tejidos con una disposición celular que les permite además una funcionalidad específica (3).

Las células epiteliales poseen características altamente diferenciadas y funcionales, que les confiere una diversidad que da origen a la formación de diferentes tipos de tejido epitelial. Sin embargo, todas ellas presentan cualidades comunes, como la polaridad celular y sus interconexiones, la capacidad de realizar un transporte vectorial de solutos, la poca movilidad in vivo, y conservan la capacidad de proliferar en respuesta a una daño tisular, o a un factor específico que estimule la proliferación celular. Además, conservan la habilidad para regular su crecimiento, lo cual implica un proceso de replicación altamente controlado (4).

Dentro del microambiente en el cual se desarrollan las células epiteliales, existe otro tipo celular con características

EPITELIOS HUMANOS



**EPITELIO PAVIMENTOSO POLIESTRATIFICADO
NO QUERATINIZADO DE LA VAGINA HUMANA .**

similares a la de los epitelios; también son adherentes y presentan una inhibición de la proliferación por contacto, e intervienen en los procesos metabólicos en los que están implicadas las células epiteliales, estas células son los fibroblastos (5).

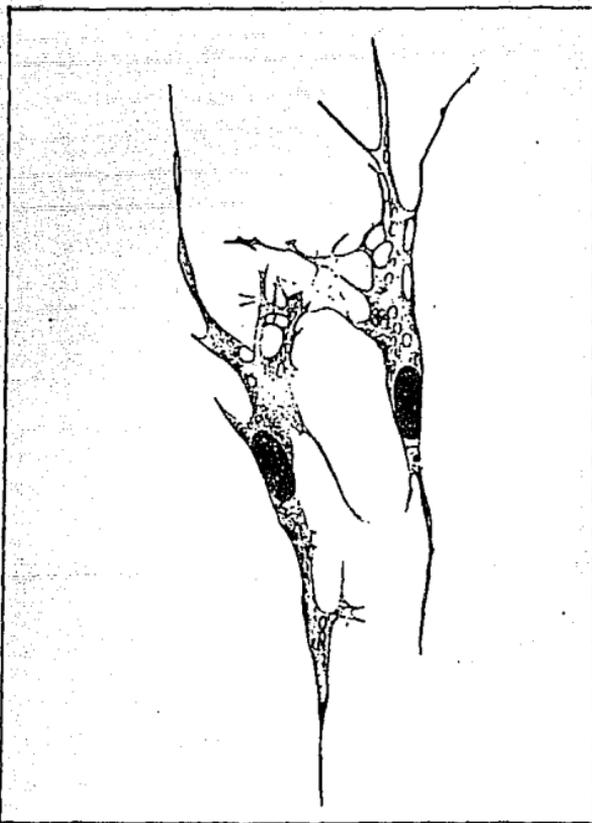
El fibroblasto es la célula primordial del tejido conjuntivo, capaz de formar la sustancia fundamental y las fibras que constituyen a este tejido. En el seno del tejido conjuntivo los fibroblastos pueden quedar inactivos tras haber formado sustancia fundamental y fibras, pero son capaces de recuperar su actividad, sobre todo en respuesta a procesos inflamatorios. Los fibroblastos son células grandes por lo general aplanadas, con un núcleo ovalado y un citoplasma escaso en forma de huso con grandes prolongaciones citoplásmicas que se extienden al exterior de la matriz, para conectar con las procedentes de otros fibroblastos, éstos presentan un gran desarrollo de retículo endoplásmico rugoso en relación con su actividad funcional, actividad que principalmente consta de mantener la integridad de los tejidos conjuntivos gracias a un lento y continuo recambio de los elementos extracelulares. Esta matriz desempeña un papel de soporte para otras células, entre ellas las células epiteliales, y permite la difusión de sustancias secretadas por los diferentes tipos celulares que radican en este tejido, estableciendo una comunicación celular de tipo parácrino y autócrino.

La funcionalidad de estas estirpes celulares (epiteliales y fibroblásticas), está ligada a su capacidad de proliferación y al grado de diferenciación que presentan. La diferenciación en las células de los seres vivos, les permite realizar funciones especializadas que sustentan la organización estructural y funcional del organismo. Una alteración en este proceso de diferenciación trae como consecuencia el aumento en la capacidad de replicación celular o la disfunción de sus actividades específicas, originando una neoplasia o una deficiencia metabólica respectivamente, que en ocasiones trae como resultado la muerte del individuo.

Para comprender la relación existente entre las células normales y tumorales, es necesario entender y tener en cuenta que el cuerpo humano contiene más de 10 millones de millones de células, esas células duplican su material y se dividen en un ciclo continuo. En este ciclo sólo algunas de ellas llegan al final de un proceso denominado diferenciación, mediante el cual las células se especializan llegando a un punto en el que cesa la división celular, desarrollando estructuras y funciones especiales y donde sólo pueden ser eventualmente reemplazadas por la división y diferenciación de otras células (6).

En un organismo completamente desarrollado, las células diferenciadas de algunos tejidos, tales como las neuronas del sistema nervioso, pierden la capacidad de dividirse mientras que determinados tipos celulares de otros tejidos, como las células epiteliales que revisten el aparato gastrointestinal, se dividen durante toda la vida del organismo teniendo ciclos continuos de divisiones mitóticas. Entre éstos dos extremos las células del hígado, serían un caso intermedio; presentan mitosis de manera moderada en los organismos adultos, no obstante, retienen la capacidad de entrar en mitosis continua si las condiciones

FIBROBLASTOS HUMANOS



FIBROBLASTOS DEL TEJIDO CONJUNTIVO
LAXO DEL SUBCUTIS DEL HOMBRE.

microambientales del tejido lo ameritan, por ejemplo en un daño tisular, en una respuesta inflamatoria etc.

CICLO CELULAR.

Como unidades altamente organizadas en un universo que favorece el desorden, las células están sujetas tanto al desgaste y a la destrucción como a los accidentes. Por consiguiente, toda célula está destinada a morir. Si un organismo debe continuar, tendrá que generar nuevas células a la misma velocidad a la que mueren sus células. Por esta razón, la división celular es de una importancia capital para la vida de todos los organismos. En un ser humano adulto, por ejemplo, se han de dividir millones de células cada segundo, simplemente para mantener su status quo.

El proceso de la división celular es bien visible al microscópio; consiste en dos procesos secuenciales: la división nuclear (denominada mitosis) y la división citoplásmica (denominada citocinesis). Pero antes de que una célula típica pueda dividirse, debe duplicar su masa y todos los elementos que contiene. Sólo de esta forma es posible que las dos nuevas células hijas contengan los componentes que necesitan para iniciar su propio ciclo de crecimiento celular, después de la división. La mayor parte del trabajo necesario para la preparación de la división celular, se produce de manera invisible durante la fase de crecimiento del ciclo celular que recibe el nombre engañoso de interfase. La mayoría de los componentes celulares se forman continuamente a lo largo de todo el período interfásico, entre dos divisiones celulares. Una excepción importante la constituye la síntesis de ADN, ya que el ADN del núcleo celular únicamente se replica durante una etapa limitada y muy concreta de la interfase. Este período recibe el nombre de fase S (S= síntesis) del ciclo celular. La otra fase concreta del ciclo es, evidentemente la fase de división celular que recibe el nombre de fase M (M= Mitótica). El período comprendido entre la fase M y el comienzo de la síntesis de ADN, recibe el nombre de fase G1 (G= gap del inglés separación), y el período comprendido entre el final de la síntesis de ADN y la fase M siguiente recibe el nombre de fase G2. Por consiguiente, la interfase está compuesta por sucesivas fases G1, S y G2, y normalmente abarca un 90% del tiempo total del ciclo celular. Por ejemplo, en las células que se dividen rápidamente en los eucariotas superiores, las sucesivas divisiones celulares (fase M) que interrumpen la interfase se suelen producir únicamente cada 16-24 horas, y cada fase M sólo dura 1 o 2 horas. Un ciclo celular típico con sus cuatro fases sucesivas, se ilustra en la figura 1.

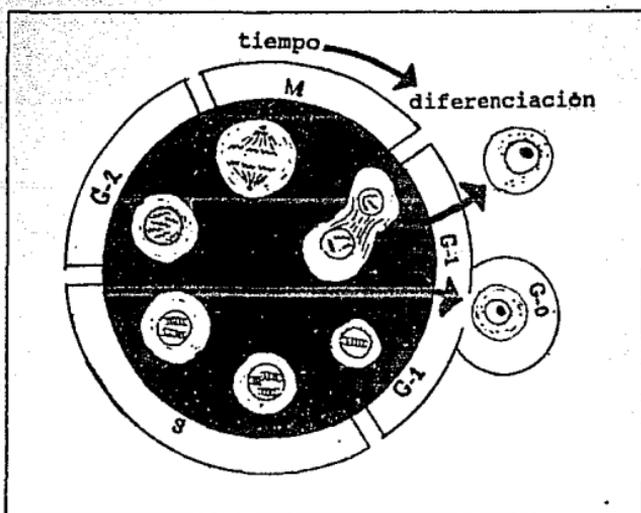


Fig.1 Las cuatro fases sucesivas del ciclo celular.

Después de la fase M, las células hijas inician la interfase de un nuevo ciclo. La interfase comienza con la fase G1 en la que las células, cuyas actividades biosintéticas se han reducido mucho durante la mitosis, adquieren de nuevo una velocidad elevada de biosíntesis. La fase S comienza cuando se inicia la síntesis de ADN y termina cuando el contenido en ADN del núcleo se ha duplicado y los cromosomas se han replicado (se dice que cada cromosoma consiste ahora en dos cromátides hermanas idénticas). La célula pasa entonces a la fase G2, que termina cuando empieza la mitosis con la citocinesis. Durante la primera parte de la fase M, los cromosomas replicados se condensan desde su estado interfásico extendido resultando fácilmente visibles al microscopio óptico. La envoltura nuclear se desintegra, y cada cromosoma sufre unos movimientos exactamente orquestados que dan lugar a la separación de su par de cromátides hermanas cuando se divide el contenido nuclear. Luego se forman dos nuevas envolturas nucleares, y el citoplasma se divide generando dos células hijas, cada una con un sólo núcleo cerrando el ciclo. En los organismos unicelulares, tales como las bacterias y los protozoos, existe una intensa presión de selección para que cada célula individual se desarrolle y replique lo más rápidamente posible. Por esta razón, la velocidad de división celular suele estar limitada tan sólo por la velocidad a la que los nutrientes se pueden absorber del medio y convertirse en materiales celulares. En los animales pluricelulares, la situación es

bastante distinta. los diferentes tipos celulares han perdido en diversos grados, sus capacidades de división rápida, de modo que no importa la velocidad, lo principal es la supervivencia del organismo, no la supervivencia de cualquiera de sus células individuales. A consecuencia de ello, las más de 10 billones de células del cuerpo humano se dividen a diferentes velocidades. Algunas células como las neuronas, las fibras de los músculos y los eritrocitos, no se dividen en absoluto después de alcanzar la madurez. Otras células, como las células epiteliales que revisten las superficies externas e internas del cuerpo (por ejemplo, del intestino, de los pulmones y de la piel) se dividen continua y rápidamente durante toda la vida del organismo. En ocasiones las células sufren todo su ciclo con su interfase y división en tan sólo ocho horas. Sin embargo, el comportamiento de los tiempos generacionales de la mayoría de las células animales queda más o menos entre las ocho horas y los 100 días.

La principal diferencia entre las células que se dividen rápidamente y las que se dividen con lentitud reside en el periodo de tiempo que pasan las células en la fase G1 del ciclo celular. Algunas células se dividen muy lentamente, permaneciendo en G1 durante días o incluso años. En cambio, el tiempo necesario para que una célula pase desde el inicio de la fase S hasta el final de la mitosis es notablemente constante, independientemente de la velocidad de división.

Se pueden efectuar mediciones mucho más detalladas del ciclo celular cuando las células están desarrollándose en cultivo, ya que su medio resulta entonces fácil de controlar y de manipular. La división celular en cultivo se puede retardar o incluso detener, limitando el aporte de nutrientes esenciales, privando a las células de los factores proteicos esenciales de crecimiento, añadiendo concentraciones bajas de inhibidores de la síntesis proteica, o permitiendo que las células lleguen a ser demasiado numerosas. En cualquiera de estos casos, el ciclo celular se detiene en la fase G1. De hecho, diversos experimentos han demostrado plenamente que el punto sin retorno conocido como punto de restricción (punto R) se produce al final de G1. Una vez sobrepasado este punto, las células se ven comprometidas a terminar con el resto del ciclo a su velocidad normal, independientemente de las condiciones externas (7).

FACTORES DE CRECIMIENTO.

Las investigaciones realizadas sobre el mecanismo de la división celular, establecen la presencia de factores diversos que inciden sobre células blanco, desencadenando un efecto estimulatorio o inhibitorio de tal mecanismo. Dentro de la gama de factores reportados se citan a factores de crecimiento, hormonas, factores de adhesión, receptores celulares, la matriz extracelular y un sin número de eventos que dependen en gran parte del tipo celular implicado (8).

Los factores reguladores del crecimiento, definidos como polipéptidos que estimulan o inhiben la proliferación celular en

cultivo y también para las células in vivo, son generalmente glicoproteínas de bajo peso molecular que se encuentran interactuando con la membrana celular, sitio donde son unidos a sus receptores.

Los factores que regulan la proliferación celular, se han dividido en dos grupos, los que presentan una actividad reguladora positiva y los que presentan una actividad reguladora negativa, no obstante hoy día, se conoce que algunos de éstos tienen una doble funcionalidad sobre el crecimiento dependiendo del tejido sobre el cual estén actuando.

Dada la existencia de una estrecha interrelación entre los fibroblastos y las células epiteliales, debido a la participación directa de estas dos estirpes en la regulación del mecanismo de la división celular de sí mismas, además de ser los epitelios un tipo celular implicado en el cáncer cérvico uterino (CaCu); es de interés particular para nosotros entender los factores que intervienen en el mecanismo regulatorio de la división celular de estas dos estirpes. En la década de los 80s, el estudio de factores estimuladores e inhibidores de la división celular, presentó gran auge, teniendo como consecuencia que se conocieran diversos factores, principalmente aquellos que tienen actividad proliferativa. En 1983, Nagao y colaboradores reportan un factor inhibidor para la formación de fibroblastos humanos de médula ósea, producido por células leucémicas (9); en ese mismo año, Lemaire y Dubois encuentran que los leucocitos mononucleares de sangre periférica estimulados con concanavalina A (Con A) o Pitohemaglutinina (PHA) producen un factor soluble que inhibe la síntesis de DNA y el crecimiento de fibroblastos de pulmón, este factor es referido como Factor Inhibidor del Crecimiento de Fibroblastos (FGIF: por sus siglas en inglés Fibroblast Growth Inhibitory Factor) (10).

Año con año se fueron acumulando las evidencias, en 1984, el estudio sobre este campo fue más fructífero, destacándose el trabajo del grupo de Iype y Mc Mahon quienes encontraron un inhibidor de la proliferación hepática, de naturaleza proteica y con un peso molecular de 26,000 daltons (d), con un punto isoeléctrico de 4.65, y la propiedad de inhibir específicamente la división celular y la síntesis de DNA en células epiteliales normales de hígado de rata, sin presentar efecto sobre células transformadas de hígado o células de hepatomas en cultivo (11). Ya en estos trabajos se plantea una inhibición de la proliferación regulada de manera parácrina y autócrinamente. De forma similar, el trabajo de Mordan y Toback, muestra evidencias para el control autócrino de la proliferación de células epiteliales de riñón, BSC-1, apoyando la hipótesis que establece que los productos autócrinos son de efecto opuesto sobre la proliferación y pueden regularla en células epiteliales renales (12). Walsh y col., estudiando la misma línea celular, encuentran que la proliferación celular y el flujo neto de sodio Na⁺ es inhibido por una proteína de 24,000d secretada por estas mismas células, sugiriendo que el control del flujo neto de sodio Na⁺ y la proliferación en células epiteliales de riñón podría estar mediado en parte por una proteína celular secretada de manera autócrina (13).

La regulación parácrina de la proliferación de células

fibroblásticas también fue ejercida por monocitos humanos incubados con PHA, lipopolisacáridos bacterianos (LPS) o partículas de zimosán opsonizadas con suero. Estos monocitos al ser estimulados con PHA secretan al medio un factor denominado Factor de Activación de Fibroblastos-producto por Monocitos (FAF-M: por sus siglas en inglés Fibroblast Activating Factor-Monocyte) con un peso molecular aparente de 38,000d y otro de 10,000d de menor actividad, ambos libres de IL-1 (14); de igual manera se ha encontrado que células monocíticas provenientes de leucemia monocítica tratada con mezerein son capaces de condicionar al medio de cultivo libre de suero con una actividad estimuladora de la proliferación de fibroblastos (15). Estos ensayos demuestran que la regulación parácrina de la proliferación de fibroblastos puede ser regulada tanto de manera positiva así como negativa.

Estudios llevados a cabo por Harel y col., en la línea celular normal de fibroblastos de pulmón de ratón denominada 3T3, presentan como característica primordial una inhibición de la proliferación por densidad, sin embargo establecen que tal inhibición está relacionada con la secreción de un factor proteico de 40,000d denominado Factor Difusible Inhibitorio de células Normales (IDFN: del inglés Inhibitory Diffusible Factor Normal) (16). Estudios paralelos realizados por Hsu y colaboradores con esta misma línea, permitieron la purificación del inhibidor de la proliferación con acción autócrina, con un peso molecular de 13,000d denominado FGR-s (del inglés: Regulator Growth Factor), cuya actividad es inhibida por anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente a este factor purificado, demostrando que es este polipéptido el que porta la actividad inhibitoria de la proliferación para tales células (17). Por otro lado, Betsholtz y Westermarck, muestran que la proliferación de fibroblastos de neonato humano inducida por Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y Factor de Crecimiento Derivado de plaquetas (PDGF) (por sus siglas en inglés: Epidermal Growth Factor y Platelet Derived Growth Factor respectivamente) en medios libres de suero dependen de la densidad celular y de la concentración de calcio Ca^{++} extracelular (18).

En el año de 1985, no solamente se encuentra una actividad inhibitoria de la proliferación de fibroblastos y células epiteliales en los medios condicionados, tal como se presenta en estudios del suero de varias especies rata, ratón y conejo, etc. Por lo que se hace evidente la necesidad de caracterización del factor que presenta la actividad inhibidora. El análisis del suero de rata revela que se trata de un factor proteico libre de lípidos con un peso molecular de 220,000d, cuyo efecto es observado en células epiteliales de hígado de rata búfalo (BRL) no transformadas, y que las mismas células transformadas con el virus del sarcoma de Rous son insensibles a este inhibidor (19).

El grupo de Holley reporta un inhibidor producido por las células BSC-1, las cuales son células epiteliales de riñón de mono verde africano. Este inhibidor es secretado al medio de cultivo por estas células, el cual presenta un peso molecular de 24,000d, muy activo con las mismas células pero no con otras, es capaz de inhibir la incorporación de timidina tritiada en un 50% en células CCL64 y células BSC-1, también estimula la formación

de colonias en agar blando de células AKR-2B, indicando que este factor denominado inhibidor del crecimiento (IG del inglés: inhibitor growth), estimula o inhibe el crecimiento dependiendo del tipo de células y las condiciones del crecimiento (20). Este mismo grupo estableció que el IG transforma un estímulo mitogénico en un estímulo hipertrófico para células tubulares proximales renales, con relación a la actividad antiporte de Na^+/H^+ (21).

El análisis de algunos factores anteriormente mencionados, reveló que entre ellos se presentaban características similares o idénticas, concluyendo en ocasiones que se trataba de un sólo factor. Uno de estos casos es el factor denominado TGF-beta, el cual anteriormente era referido como factor de inhibición de la diferenciación (DIF: del inglés Differentiation-inhibiting factor), o inhibidor del crecimiento de células BSC-1 (GI: del inglés inhibitor growth). El estudio sobre este factor fue de gran interés, desarrollando trabajos sobre su mecanismo de acción. Tal es el trabajo de Shipley y col., quienes muestran que el TGF-B estimula a las células AKR-2B a entrar a la fase S después de un prolongado intervalo prereplicativo (22).

Sin embargo, la presencia de otros factores con actividad inhibitoria del crecimiento seguía siendo constatada así como las nuevas relaciones existentes entre ellos; por ejemplo Eckert, Lubbe, Schon y Grosse mostraron que el TGF y un inhibidor del crecimiento de células epiteliales coexisten en las glándulas mamarias bovinas como factores de crecimiento separados (23).

En el año de 1986, prosiguió la investigación de factores inhibidores, y al TGF-beta se le encontró un efecto antagónico con el efecto del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés: fibroblast growth factor) sobre la proliferación de células endoteliales de aorta bovina (24); se le asoció al factor inhibidor de la proliferación de células epiteliales de traquea alteradas con carcinógenos, que es producido por células epiteliales de traquea normal en cultivo, secretado al medio de manera óptima en la tercera-cuarta semana, cuyas propiedades bioquímicas son similares a las del TGF-beta (25); además, se le encontró junto con el EGF un efecto opuesto y selectivo sobre la producción de proteínas secretadas por las células 3T3 murinas y por fibroblastos humanos (26).

En este mismo año fueron detectados otros factores inhibitorios, tal es el caso del Inhibidor de Crecimiento Epidermal (EGI) obtenido de plaquetas humanas, éste es una proteína capaz de inhibir la proliferación de células no malignas de epitelio derivado de hígado de rata búfalo (BRL), el EGI, es específico para células epiteliales, durante su purificación, fue separado del TGF-beta, que en este caso en particular estimula a las células fibroblásticas de riñón de rata búfalo (NRK) en agar, en presencia del factor de crecimiento epidermal (EGF). El EGI purificado mostró un peso molecular de 27,000d, está compuesto de dos subunidades de peso idéntico, su actividad resultó estable al calor a 90 grados centígrados por 3 minutos, pero sensible a ditiotreitól; y es capaz de inhibir la proliferación de tres líneas celulares epiteliales o malignas de manera significativa (BRL, MDCK y BSC-1) (27); otro factor fue

descubierto por el grupo de Huang, quienes purificaron a homogeneidad dos proteínas derivadas de cerebro bovino, denominadas Factor de Crecimiento Derivado de Cerebro (BDGF-A y B, del inglés; Brain-Derived Growth Factor), cuyo peso molecular es de 16,000 y 17,000d respectivamente, ambos presentando un punto isoeléctrico (pI) de 5.7 y con la misma actividad mitogénica, actuando sobre células vasculares, células endoteliales de aorta, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales, células gliales, fibroblastos y células de músculo liso (28). Sharma y Gehring, aislaron un factor de bajo peso molecular con actividad inhibidora del crecimiento de fibroblastos, obtenida de fibroblastos de embrión de pollo, cuyas propiedades bioquímicas son: presentar un peso molecular menor de 2,000d, es resistente a proteasa y ácidos y estable al calor (29); por otra parte al mismo tiempo el grupo de Lemaire, muestra que los macrófagos alveolares son capaces de secretar un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés: Fibroblast Growth Factor), mientras que los leucocitos mononucleares de sangre periférica estimulados con concanavalina A (CoA), producen un factor inhibitorio de la proliferación de fibroblastos (FGIF, del inglés: Fibroblast Growth Inhibitor Factor) en ratas a las cuales se les ha inyectado 5 mg y 10 mg de asbestos (30).

Muchos de los primeros hallazgos están basados en estudios de mamíferos inferiores, sin embargo Stein y Atkins caracterizaron un inhibidor de la síntesis de DNA asociado a membrana de células de fibroblastos diploides humanos senescentes, con la característica bioquímica de ser sensible a tripsina, al calor y al peryodato, sugiriendo que se trata de una glicoproteína (31).

Para 1987 la investigación de los factores inhibidores, consistió en estudios más profundos de factores ya establecidos, como el TGF así como en el descubrimiento de otros más. Para el caso del TGF, en este año se determinó la existencia de dos formas TGF-B1 y TGF-B2, con un 70% de similitud en secuencia de aminoácidos y con un potencial de inhibición idénticos al ser ensayados en células epiteliales. Sin embargo el TGF-B1, presenta una gran actividad inhibidora de la proliferación de células progenitoras hematopoiéticas, mientras que la actividad del TGF-B2 en estas células no es muy significativa (32); en otro estudio, se le asocia al TGF-Alfa en células transformadas con los virus Ad2- y SV40, que inducen la secreción de un factor similar al TGF-Alfa, capaz de inhibir la unión del EGF a sus receptores. En este mismo trabajo también se muestra que las células transformadas con el virus SV40 pero no las transformadas con el virus Ad2, secretan un poderoso inhibidor mitogénico (MI), el que actúa sobre células transformadas y no transformadas de manera citostática, con un peso molecular de 24,000d y difiere del TGF-B en que es labil al calor y tiene una especificidad blanco diferente para su actividad antimitogénica, además inhibe la incorporación de timidina en linfocitos de bajo estimulados con CoA (33).

El EGI previamente citado (27), por el mismo grupo de investigadores, propone que los inhibidores podrían ser la causa más predominante para la adquisición de malignidad, se encontró que las células BRL presentan un 50% de inhibición en su

proliferación cuando son expuestas a 20pg/ml del EGI, pero no inhiben la proliferación de estas mismas células cuando son transformadas con el virus RSV (34).

El factor difusible inhibitorio (IDF) producido por la línea celular 3T3, encontrado por Harel (16), decrece la síntesis de DNA en fibroblastos de embrión de pollo así como su proliferación; sin embargo, cuando estos fibroblastos son infectados por el virus Ny68 (un mutante del RSV), el IDF no inhibe su proliferación, sugiriendo que la expresión del oncogen en estos fibroblastos, induce a una disminución o pérdida en su sensibilidad al IDF, lo que podría explicar el porque las células transformadas escapan al factor inhibitorio, apoyando la hipótesis de que los factores inhibidores podrían ser la causa más predominante de malignidad al no presentar su efecto sobre las células transformadas (34, 35).

Las investigaciones en este año, también citaron el descubrimiento de nuevos factores, Huggett y col., caracterizan un factor inhibidor de la proliferación hepática, obtenido de hígado de rata adulta, con una actividad inhibitoria 1000 veces mayor que los previamente reportados, el factor presenta un rango de peso molecular de 17-19,000d y no es afectado al adicionar anticuerpos contra TGF-B (36); Mashima y col., por su parte presentaron un trabajo de particular interés, aislaron un factor del suero de conejo con actividad inhibidora de la proliferación; lo interesante de este factor es que presenta un efecto anti-maligno sobre células BRL transformadas por el virus RSV y no tiene efecto sobre células BRL no transformadas, dentro de sus propiedades tiene la característica de no pasar a través de una membrana de 10K, sensible a tripsina y ditiotretol y fue separado en dos especies con pI de 7.5 y 9.5 (37). La relación de estos factores con los virus, presentó un campo nuevo en el estudio de la malignencia celular, y no sólo se asoció la insensibilidad adquirida por las células normales al ser infectadas por un virus oncogénico, sino que también estos virus son capaces de codificar proteínas con actividad inhibidora de la actividad de factores de crecimiento, y que esta inhibición ocurre en parte por la inhibición competitiva de la interacción del receptor para el factor de crecimiento, como lo establece el trabajo de Strayer y Leibowitz (38). Por otro lado, el aislamiento de factores inhibidores comienza a ser comparado a través de anticuerpos policlonales y monoclonales, estableciendo similitudes estructurales y funcionales, como es el caso de el factor inhibitorio derivado de glándulas mamarias de bovino lactante (MDGI, del inglés: inhibitor growth derived mammary), aislado por Bohmer et.al., el cual presentó similitudes estructurales y funcionales con el factor inhibidor del crecimiento de fibroblastos (FGI), originando la posibilidad de que estos inhibidores puedan juntos definir una nueva familia de moléculas reguladoras del crecimiento (39); el grupo de Feltham, reporta un factor que inhibe la proliferación de fibroblastos, derivado de éstos mismos (FDGI, del inglés: inhibitor growth derived fibroblast), cuyas características son: ser secretado únicamente cuando los fibroblastos son estimulados con ácido poliribonucleico: ácido poliribocitidílico, tiene un peso molecular de 12,000d, e inhibe la proliferación de células

fibroblásticas diploides humanas en cultivo, células derivadas de tumores y células L derivadas de ratón (40). Un factor que en principio fue conocido por su capacidad para hacer que las células resistan a un crecimiento viral, denominado interferón (INF) (41), considerado como una parte importante en el sistema de defensa de los vertebrados, ahora se le conocen otras funciones aparte de la acción antiviral, juega un papel fisiológico en la regulación de la respuesta inmune por su interacción con células del mismo sistema así como con sus células blanco, también funciona como factor diferenciador y como inhibidor del crecimiento celular, modulando la expresión de genes en células diferenciadas y como participe en la regulación autócrina de la proliferación celular (42), este factor inhibe la síntesis de proteínas y la proliferación de la línea fibroblástica 3T3 de ratón Suizo (43).

Los estudios desarrollados anteriormente, muestran la capacidad que presentan las células para regular su división, sin embargo, la información obtenida hasta ese momento no fue suficiente para entender de una manera clara el mecanismo que regula la proliferación de estas estirpes celulares, por lo que se hizo necesario desarrollar trabajos con un mayor grado de información. Para 1988, se revela información más detallada, acerca de las nuevas funciones para factores establecidos o la descripción de unos nuevos comparados con los ya descritos ejemplo, se muestra que el TGF-B es capaz de regular la transcripción de los RNAs mensajeros para el inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1, fibronectina y procolagena tipo-1, sugiriendo que el TGF-B puede funcionar también como un regulador de actividad proteolítica extracelular (44); también se demostró que este factor es un inhibidor potencial de la proliferación con acción autócrina en líneas celulares de cáncer de mama humana con receptores negativos a estrógenos, sin afectar la proliferación de las líneas celulares con receptor positivo a estrógenos, presentando la posibilidad de que este polipéptido puede funcionar como un inhibidor autócrino de la proliferación o como un factor de crecimiento de acción parácrina para células tumorales estromales (45), y como un potente inhibidor de la proliferación para algunos gliomas (60 % de inhibición), siendo menos sensibles los glioblastomas que los astrocitomas y los oligodendrogliomas, postulando la teoría de regulación de la proliferación autócrina negativa para células tumorales, la cual establece que una producción reducida o una producción deficiente del inhibidor la proliferación normalmente encontrado en la célula, puede explicar la naturaleza autónoma de algunas células tumorales (46).

Por otro lado, se establece la interacción de la IL-1 y el EGF, mostrando un efecto aditivo, al potenciar la respuesta proliferativa cuando son aplicados de manera conjunta a fibroblastos Balb/3T3 (47). Sin embargo, la capacidad del sistema inmune para poder atacar a células tumorales no se basa en una sola molécula, ni en un sólo tipo celular. Es sabido que los linfocitos son las células que han mostrado un mayor potencial para destruir los tumores que en comparación con otros tipos celulares, y que su ataque es llevado a cabo por la participación coordinada y regulada de subpoblaciones de linfocitos, cuyo

ataque es directo por contacto membrana-membrana, o por la secreción de moléculas con actividad citotóxica. Otro tipo celular del sistema inmune que también tiene la capacidad de ejercer una actividad citotóxica sobre células tumorales es el linaje monocito/macrófago, los cuales son capaces de secretar moléculas con actividad citotóxica como es el caso del factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés: Tumor Necrosis Factor), sin embargo, también se ha demostrado que las células tumorales son capaces de responder de una manera diferente a este factor, siendo sensitivas unas más que otras, fenómeno que aún no queda claro. Spriggs y colaboradores, muestran que 14 líneas epiteliales tumorales, cuya mayoría presenta los receptores suficientes para TNF, presentan además resistencia a el efecto inhibitorio de este factor, sugiriendo que la resistencia no es ocasionada por la falta de receptores para TNF en la superficie celular (48).

El aislamiento de inhibidores no ha sido específico de un tipo celular, sino que al parecer, están involucrados diferentes tipos celulares, como ejemplo citaremos el inhibidor obtenido de el medio condicionado de células de leucemia mielomonocítica aguda, cultivadas con 12-O-tetradecanoil forbol acetato (TPA, del inglés: tetradecanyl phorbol acetate), el cual presenta un peso molecular de 70,000d con actividad inhibidora de fibroblastos, pero no de monocitos, con un efecto reversible, además estimula la formación de colonias de macrófagos y granulocitos, y estimula la diferenciación de células leucémicas hacia macrófagos (49). La producción de los factores inhibidores no sólo está relacionado a las células normales, algunas células malignas son capaces también de secretar algún inhibidor de la proliferación, tal es el caso del inhibidor de la proliferación de células transformadas (TGIF, del inglés: transformed cell growth-inhibiting factor), el cual inhibe la formación de colonias en agar de células provenientes de una línea derivada de carcinoma de mama, la secreción al medio de cultivo presenta dos picos con dicha actividad, cuyo peso molecular fue de 110,000 y 55,000d, (50).

La búsqueda de factores inhibidores o proliferadores, de características particulares presenta una gran problemática, escasean los factores que sólo afecten a células tumorales, pocos trabajos como el de Shirazuna y colaboradores, describen factores que inhiban la proliferación de células epiteliales y a la vez promuevan la diferenciación cuando son aplicados en células provenientes de un carcinoma. Shirazuna menciona que el factor es secretado por fibroblastos normales provenientes de la línea no maligna WI-38 y no presenta efecto sobre sí misma (51). Algo relevante para este año, es la aportación de evidencias sobre la malignidad celular, las cuales apuntan a una malignidad causada por la alteración de las vías de transducción de la señal de algunos receptores para moléculas reguladoras de la proliferación celular (52).

Para 1989, la investigación sobre factores reguladores de la proliferación sería un poco más profunda, y desde luego, la aportación de nueva información sobre los factores ya conocidos es lo más relevante de este año. Por ejemplo, Noda y Vogel mostraron que el FGF básico puede incrementar la expresión del

gen que codifica al factor de crecimiento transformante tipo beta en células similares a osteoblastos, cuando éstas son estimuladas con este factor (53); por otro lado, Sharma y Dahiya, determinan que la señal mitogénica del FGF básico no es iniciada por la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos en células epiteliales PC12, sugiriendo además, que la señalización mediada por el receptor para FGF básico no está dada por la vía de activación de la fosfolipasa C y que la respuesta mitogénica temprana, así como la síntesis de DNA, son iniciadas independientemente de los lípidos de inositol y de la activación de la proteína cinasa C (54). En contraposición, Presta y colaboradores, al trabajar con células FBAE AG 7680 normales y transformadas químicamente, FBAE GM 7373, encontraron que las células transformadas mostraron un nivel basal alto de actividad proteína cinasa C (PKC: del inglés Protein Kinase C), actividad cinasa activada por el FGF básico, la cual está involucrada en la mediación de la actividad mitogénica del FGF básico, comprobado por el uso de un inhibidor de la PKC, para abolir la actividad mitogénica del FGF básico, tanto en normales, como en las células transformadas (55).

Los trabajos sobre el TGF-B, muestran que algunas células tumorales derivadas de epitelio traqueal de rata son relativamente resistentes a la inhibición de la proliferación ejercida por el TGF-B-1 (56). El efecto del TGF-B sobre la proliferación de células epiteliales intestinales y del hígado es también marcadamente inhibitorio, desempeñando un papel regulador de la proliferación para este tipo celular en ambos órganos (57).

Plouet y Gospodarowicz, buscando la interacción existente entre el TGF-B-1 y FGFb encontraron que el TGF-B-1 modula positivamente la bioactividad del FGFb en células endoteliales de cornea, sugiriendo que el TGF-B-1 podría actuar a través de la regulación de la síntesis del FGFb en células endoteliales de cornea bovina (58). En otro dato McPherson y colaboradores, muestran que el inhibidor de la proliferación encontrado en las células BSC-1 del mono verde africano es similar al TGF-B-1 y 2 (59). En cuanto a información sobre el mecanismo de señalización molecular que presenta este factor, el grupo de Miao y Chen, establecen que este es capaz de inhibir la actividad de adenilato ciclasa en células endoteliales.

En este año, por ejemplo, se determina la actividad inhibitoria de la proliferación ejercida por el INF-beta, específicamente contra líneas celulares obtenidas de carcinoma colorectal (60); que el factor difusible inhibitorio es mostrado a tener una actividad bifuncional ya que actúa como un inhibidor de crecimiento celular y como un factor de crecimiento similar a insulina (61); que el factor inhibitorio derivado de hígado de rata presenta una acción de modulación positiva y negativa del crecimiento en diferentes sistemas celulares, efecto ejercido de manera diferente al TGF-B1 y el TNF-A en algunos tipos celulares (62); además el grupo de Lehmann, continuando con el estudio del MDGI, determinan que este factor proteico presenta un peso molecular de 14,500d y que su actividad inhibitoria no está exclusivamente restringida a las células epiteliales del tumor ácido de Ehrlich (63), así como también, que el MDGI está relacionado con un antígeno de 70,000d encontrado en el núcleo de

células epiteliales mamarias bovina, sugiriendo que el MDGI y el antígeno localizado en núcleo, podrían estar regulando la expresión génica para este factor, teniendo un papel regulador de la proliferación celular que actúa a nivel génico (64).

El descubrimiento de nuevas propiedades en moléculas conocidas, fue un trabajo que presentó interés entre los investigadores, ejemplo de ello fue la demostración de que la interleucina-6, presenta la capacidad de funcionar como un polipéptido regulador del crecimiento para células del hígado in vivo (65); que un inhibidor de fibroblastos y células epiteliales que actúa a través del bloqueo del efecto del EGF y PDGF, dicho inhibidor acciona a través de la inhibición selectiva del proceso dependiente de la tirosina cinasa, sin afectar respuestas similares obtenidas para hormonas, las cuales no son dependientes de la activación de la tirosina cinasa (66); también se encontró que las células epiteliales confluentes de traquea de rata normal producen un inhibidor que afecta el surgimiento de sitios de proliferación epitelial de forma negativa, mostrando que las células epiteliales pueden quizás en su generalidad, y sin importar el órgano del cual se obtuvieron, ser capaces de producir un inhibidor de la proliferación como parte de su mecanismo normal regulador de la división celular (67); así mismo fue encontrado un inhibidor presente en el extracto intestinal de ratón, que inhibe la proliferación de células epiteliales de colon, deja entrever que tales inhibidores presentan una acción parácrina (68); por último, se encontró en este mismo año que el leucotrieno D4 estimula la proliferación de células epiteliales glomerulares, respuesta que es mediada por un intercambio de Na^+ y de la proteína cinasa C (69).

Para 1990 y 1991, la aportación de nueva información abordó estudios bioquímicos y moleculares, los estudios se dirigieron a caracterizar de manera más completa los factores de crecimiento conocidos, estableciendo no sólo su peso molecular, se caracterizaron en algunos de ellos hasta su secuencia génica y la vía de transducción de la señal que siguen. Por ejemplo, se encontró que el RNAm para el TGF-B1 se incrementa en el hígado durante la carcinogénesis, y que en el estado temprano del proceso, las células ovales pero no los hepatocitos, contienen el RNAm del factor de crecimiento. Sin embargo, células ovales no malignas e inmortalizadas (línea celular LE/6) continuaron produciendo los niveles de RNAm del factor en cultivo; el mensajero del TGF-B1 marcadamente decreció sobre la transformación celular, pero los niveles del mensajero, aunque generalmente bajos, fueron diferentes en varios clones de células tumorales. Una característica consistente con las líneas malignas fue una disminución o pérdida de la sensibilidad al efecto del factor. Además las células tumorales en este caso podían ligar el TGF-B1 con capacidad similar a las normales, teniendo el mismo tipo de receptores (peso molecular: 280, 85 y 65,000d), sugiriendo que la pérdida de la sensibilidad al TGF-B1 en células epiteliales de hígado transformado involucra un mecanismo postreceptor. Algunos estudios en células epiteliales de hígado muestran que c-myc no es blanco para el TGF-B1, lo cual es consistente con la hipótesis de que el TGF-B1 secretado durante la carcinogénesis en células de hígado, puede inhibir la

proliferación de células normales, proporcionando una ventaja selectiva para el crecimiento de células que son parcialmente transformadas y no responsivas al factor (70). También se encontró para este factor que su actividad inhibitoria es ejercida en la fase G1 del ciclo celular de células epiteliales, deteniéndolas en esta fase, relacionada a la fosforilación de una proteína cinasa (71); se le asocia como un regulador del activador de plasminógeno en células epiteliales normales y neoplásicas (72); inhibe el efecto del PDGF a través de un bloqueo en la generación de segundos mensajeros (IP3) en células de osteosarcoma humano (73); es producido por diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran los fibroblastos y macrófagos de pulmón (74), células epiteliales normales mamarias de rata (75), linfocitos, miocitos, condrocitos, células leucémicas, endoteliales etc.

Al TGF-alfa se le adjudicó un papel diferenciador en dos líneas celulares de carcinoma de colon (76); se le asoció con la carcinogénesis de piel y con la proliferación de epitelio inmortalizado de traquea de rata (77).

El FGF-básico, se demostró estar almacenado como un componente de la matriz extracelular requerido para soportar la proliferación y diferenciación celular, se encontró que el FGF-básico se encuentra ligado a heparinsulfato en la matriz extracelular y es liberado en una forma activa cuando el heparinsulfato-matriz extracelular es degradado por una enzima (heparinasa), sugiriendo que este fenómeno es un nuevo mecanismo de regulación de la proliferación (78); dos receptores para miembros de la familia de este factor se encontraron amplificadas en subpoblaciones de células derivadas de cáncer de mama (79); en conjunto con la interleucina-1 beta (IL-1 beta), este factor es capaz de activar a fibroblastos dermales humanos (80), también mostró estar relacionado con la transformación celular (81), y con la producción de la mielopoiesis en cultivos de médula ósea humana cultivada (82), así como ser un factor multifuncional para células neuroectodérmicas (83).

Los estudios realizados sobre el INF-alfa establecieron que inhibe la proliferación de la línea epitelial obtenida de un carcinoma de prostata humana PC-3, cuyo efecto es dosis dependiente y parcialmente mediado por el incremento en los niveles celulares de AMP cíclico (84). En lo correspondiente al INF-gama, se demostró que este es capaz de incrementar la expresión del gen que codifica al receptor para el EGF, en una línea celular derivada de un carcinoma de mama humano (85).

El estudio de los factores anteriormente descritos, atrajo la atención de la mayoría de los investigadores que trabajan sobre esta área, este interés fue la base para descubrir factores nuevos así como para ampliar los conocimientos sobre factores ya conocidos. Para el EGF, se mostró que existe una relación estrecha de la expresión de receptores y la respuesta a este mismo en células de epitelio ovárico normal y en células epiteliales tumorales de ovario (86); se descubrió que la IL-1 es un regulador autócrino del crecimiento de células endoteliales humanas, que presenta un efecto antiproliferativo sobre una línea celular (NIH:OVCAR-3), derivada de un carcinoma ovárico humano y se probó que en diversos tipos celulares tuvo una acción

mitogénica y antimitogénica asociada con la inducción de la expresión del gen *gro* (87,88). Se estudió una proteína con efecto similar al factor de crecimiento nervioso (NGF), la cual modula la interacción parácrina entre una línea celular epitelial neoplásica y las células estromales de próstata humana (89); el fenotipo transformado se determinó estar asociado con la expresión de receptores para insulina en fibroblastos y células de ovario (90); se comprobó que los estrógenos inducen la proliferación y diferenciación de células epiteliales endometriales (91). En este mismo año se realizaron estudios sobre factores inhibidores no muy conocidos, como fue el estudio hecho por el grupo de Douzinas y colaboradores quienes aportan sus conocimientos sobre el efecto de un inhibidor de epitelio de intestino delgado humano, el cual actúa sobre el epitelio de la mucosa intestinal. Ese factor a demostrado ser no citotóxico y específico para el tracto digestivo y muy particularmente para el intestino delgado, con una acción reversible y dependiente de la dosis; en la purificación de este factor obtenido del medio condicionado de estas células se encontró una proteína de bajo peso molecular de aproximadamente 15,000d. el cual fue denominado PII (por sus siglas en inglés Purified Intestinal Inhibitor) ; se demostró también, que la acción de este factor provoca un alto de las células en la fase G1 del ciclo celular. Estos datos apoyan la hipótesis que establece que la regulación de la proliferación celular es mediada por inhibidores endógenos a nivel epitelial (92). Por otra parte, en este mismo año el grupo de Shoji y colaboradores establece que los fibroblastos de pulmón producen un factor con actividad estimuladora del crecimiento sobre células epiteliales bronquiales, el cual es sensible a proteasas y estable en ácido, sugiriendo que es de naturaleza proteica, al ser cromatografiado presentó un peso molecular de 6,000d (93).

La relación de otros factores con la transformación malignante, fue registrada, y asociada a diferentes fuentes o causas. Se asoció a oncogenes tales como el *K-fgf/hst*, *c-Ha-ras*, *v-raf* y *v-mos* (94,95,96); a virus, como son los papilomavirus (97); el virus SV40 de mono (98); a andrógenos (99), etc.

Los trabajos sobre factores de crecimiento fueron disminuyendo conforme se caracterizaban éstos, los factores que surgían como nuevos, al ser debidamente estudiados, presentaban características muy similares con los ya caracterizados, estableciendo una homogeneidad entre ellos, lo cual sugirió que los factores podrían ser agrupados en familias dependiendo de sus propiedades funcionales, bioquímicas y moleculares, aunque esto no quiere decir que todos estuvieran dentro de estas familias, algunos no pudieron ser clasificados por sus características específicas, por ser particulares de algún órgano en específico, o porque su peso molecular varía a pesar de ser secretado por el mismo tipo celular, sugiriendo que son factores similares funcionalmente pero de estructura diferente.

En 1992, el estudio sobre factores de crecimiento se basa en los trabajos bioquímicos y moleculares de los factores ya establecidos. Los estudios son enfocados a determinar la estructura primaria del factor, el gen que lo codifica, sus propiedades funcionales, bioquímicas y la relación que pueda existir con otras moléculas.

En este sentido el grupo de Shayman, reportó que el crecimiento de células epiteliales renales es modulado por una glucosilceramida, existiendo una asociación con una proteína cinasa C, esfingosinas y diacilglicerol (100); Weiss y Nuccitelli, revelan que la inhibición de la fosforilación de tirosina, previene el efecto mitogénico inducido por la trombina, sin provocar un aumento en los niveles de calcio intracelular libre en células vasculares de músculo liso (101); por otro lado, se reporta que la señal de transducción para el FGF-b pero no para el TGFalfa-1, involucra al metabolismo del ácido araquidónico en células endoteliales (102), sin embargo, el grupo de Presta reporta que el FGF-b requiere de una activación prolongada de la proteína cinasa C para inducir la proliferación celular en células endoteliales aórticas transformadas de bovino fetal (103); mientras tanto en este mismo año, se encontró que la IL-1 es capaz de modular la señal extracelular regulada por proteínas cinasas asociadas a microtúbulos, a través de la alteración en los niveles de fosforilación de éstas (104).

La caracterización molecular y bioquímica de estos factores en los posteriores estudios, se empieza a realizar de una manera más comparativa entre los factores más conocidos Hannocks y colaboradores describen la existencia de una regulación proteolítica para el FGF-b, IL-1 y TGF-a en células estromales de médula ósea humana (105).

Un estudio realizado por Besner y Klagsbrun, en 1991, se analizó un factor obtenido del medio condicionado de macrófagos el cual presentó actividad inhibidora de la proliferación de células endoteliales, denominado MD-ECI del inglés: macrophage-derived endothelial cell inhibitor, el cual es distinto del TGF-a y el TNF. Este inhibidor detiene la proliferación de células endoteliales basales incluso de células endoteliales previamente estimuladas con el FGF, siendo su efecto dosis dependiente, no tóxico y de acción reversible (106).

DE LA INFORMACION ANTERIOR, SE ELABORO LA SIGUIENTE TABLA DE FACTORES ESTIMULADORES E INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE CELULAS EPITELIALES Y FIBROBLASTICAS MAS IMPORTANTES, REPORTADOS ENTRE 1983 Y 1992.

FACTOR	ACTIVIDAD	PESO MOLECULAR en daltons (d).
Factor inhibidor para la formación de fibroblastos de médula ósea humana	inhibidora de fibroblastos	
Factor inhibidor del crecimiento de fibroblastos (FGIF).	inhibidora de fibroblastos	
Inhibidor de la proliferación hepática	inhibidora de epitelio	26,000

Factor de activación de fibroblastos producido por monocitos (FAF-M).	estimula la - proliferación de fibroblastos	38,000 Y 10,000
Factor difusible inhibitorio de células normales (IDFN).	inhibe la proliferación de fibroblastos	40,000
Factor regulador del crecimiento (FGR-s)	inhibe la proliferación de fibroblastos	13,000
Factor de crecimiento epidermal (EGF)	estimula la - proliferación de fibroblastos y epitelios	6,045
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	estimula la - proliferación de fibroblastos y epitelios	30,000
Factor inhibidor de la proliferación presente en suero de rata.	inhibe la proliferación de células epiteliales	220,000
Inhibidor del crecimiento (IG)	inhibe la proliferación de células epiteliales	24,000
Inhibidor del crecimiento de células epiteliales mamarias.	inhibe la proliferación de epitelio de mama	
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	estimula la - proliferación de epitelio y fibroblastos	13,000
Inhibidor del crecimiento epidermal (EGI)	inhibe la proliferación de epitelio	27,000
Factor de crecimiento derivado del cerebro (BDGF-A y B)	estimula la - proliferación de epitelios y fibroblastos	16,000 Y 17,000

Factor con actividad inhibidora del crecimiento de fibroblastos.	inhibe la proliferación de fibroblastos	2,000
Inhibidor de la síntesis de ADN asociado a membrana.	inhibe la síntesis de ADN en fibroblastos	
Factor inhibidor de la proliferación hepática	inhibe la proliferación de epitelios	17-19,000
Factor de suero de conejo con actividad inhibidora.	inhibe la proliferación de epitelios	> 10,000
Factor inhibidor derivado de glándulas mamarias de bovino lactante (MDGI)	inhibe la proliferación de epitelio mamario	14,500
Inhibidor del crecimiento derivado de fibroblastos (FDGI)	inhibe la proliferación de fibroblastos	12,000
Interferón (INF)	inhibe la proliferación de epitelios y fibroblastos	18,000
Inhibidor derivado de células de leucemia mielomonocítica aguda.	inhibe la proliferación de fibroblastos	70,000
Inhibidor del crecimiento de células transformadas (TGIF)	inhibe la proliferación de células de carcinoma de mama	110,000 Y 55,000
Interleucina-6	estimula la proliferación de epitelios	26,000
Interleucina-1	inhibe la proliferación de epitelio derivado de un carcinoma ovárico humano	17,000

Inhibidor intestinal
purificado (PII)

inhibe la pro-
liferación de
epitelio de la
mucosa intestinal.

15,000

Estrógenos

estimula la -
proliferación
y diferencia-
ción de epi-
telio endome-
trial

BIOLOGIA DEL CANCER.

Normalmente la tasa de división celular en los tejidos está controlada por mecanismos que permiten a las células dividirse únicamente, si se necesitan nuevas células. Por ejemplo, las células quiescentes del hígado son estimuladas para dividirse rápidamente después de haberse extirpado parte del hígado, y dejan de dividirse tan pronto como la masa normal del hígado se ha restaurado. El mismo tipo de división celular limitada, se ve en la piel, cuando ésta ha sufrido algún daño. Sin tal mecanismo de control por retroalimentación de la división celular, la forma y consecuentemente la función de un animal multicelular sería destruida rápidamente, ya sea por una división celular excesiva (como ocurre en el cáncer) o por una falla en el reemplazo de las células muertas en los tejidos que normalmente experimentan esa pérdida continua de células (como el tejido epitelial). Mecanismos similares también son importantes para el desarrollo ordenado de células y tejidos durante la embriogénesis (107).

La neoplasia es un trastorno de la reproducción celular, que conduce a la multiplicación sin límite a determinados grupos celulares, grupos que escapan a los controles normales del organismo y que está relacionada con algún factor estimulador del crecimiento. Las neoplasias pueden ser el comienzo de lo que se conoce como cáncer (108). Las células cancerosas son diferentes de las del resto del cuerpo, éstas tienen una división excesiva, fallan en el proceso de diferenciación y no responden a la actividad de hormonas y compuestos químicos que circulan normalmente en el cuerpo, las células cancerosas pueden perder el contacto con sus vecinos, para independizarse de la matriz extracelular y viajar a través de la sangre o fluidos linfoides y de esta manera alojarse y proliferar en otros lugares (metástasis) (109).

Es claro que las células cancerosas están menos sujetas a la mayoría de los mecanismos de retroalimentación que controlan la división celular, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, las células cancerosas en cultivo continuarán dividiéndose más allá del punto en el que las células normales detienen su división, proliferando y apilándose una sobre otra (110). Además las células cancerosas requieren menos cantidad de factores de

crecimiento que las células normales para poder sobrevivir y dividirse en cultivo (en algunos casos puede ser porque producen sus propios factores de crecimiento) (111).

Las células del cáncer muestran un número de propiedades que las hacen peligrosas para el huésped, incluyendo a menudo una habilidad para invadir otros tejidos y para inducir un crecimiento interno vascular (lo cual asegura que las células proliferantes del cáncer tengan un suministro adecuado de sangre) (112). Otra diferencia peligrosa entre las células normales y cancerosas es que las células cancerosas, como población pueden dividirse indefinidamente (113). En contraste casi todas las células normales en mamíferos mueren, después de un número limitado de divisiones. por ejemplo, cuando los fibroblastos normales de mamífero proliferan en cultivo, se dividen entre 20 y 50 veces en promedio, dependiendo del animal del que fueron extraídos. Conforme avanza el cultivo, las células individuales tardan cada vez más tiempo para dividirse, es decir alargan su ciclo celular, y eventualmente toda la población cesa de dividirse y muere. En general, las células tomadas de animales viejos se dividen menos veces en cultivo comparadas con el mismo tipo de células tomadas de un animal joven, sugiriendo que las células viejas ya han tenido muchas de sus divisiones asignadas mientras formaban parte del tejido en el animal íntegro. Tales observaciones han llevado a creer que las células diferenciadas están programadas para morir después de cierto número de divisiones. Esta muerte celular programada podría ser de gran valor para el organismo como un seguro adicional contra proliferación desenfrenada de una célula en particular. Esto significa también que la mayoría de las células que escapan de los controles normales de la división celular, podrían dar lugar solamente a pequeñas clonas de progenie celular antes de que muera totalmente la población (107).

Hasta hace poco, la diferencia fundamental entre las células normales y tumorales radicaba en cambios en los niveles de nucleótidos cíclicos celulares, fluidez de la membrana plasmática, proteínas secretadas, el citoesqueleto y el flujo de iones, (114). Mientras que los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis permanecían ocultos.

Las diferencias en el potencial de crecimiento entre las células cancerosas y las células normales en cultivo, están asociadas a menudo con cambios citoesqueléticos conspicuos (115). La reorganización del citoesqueleto que acompaña estas alteraciones en el comportamiento se refleja en dos cambios: las células cancerosas son por lo general más redondeadas y las fibras tensoras se reducen en número, o están ausentes. Estos y otros cambios, conocidos colectivamente como transformación neoplásica, pueden producirse en células normales por infección con virus de un tumor, tal como el virus del sarcoma de Rous (116). Este virus simple que causa cáncer en tejido de pollo, sólo tiene cuatro genes, uno de ellos (gene src) es la causa única de la transformación: cuando este gene se activa, las células son transformadas y se forman los tumores; cuando es inactivo, las células parecen ser normales. Esta modificación por el producto del gene src puede causar los cambios en el citoesqueleto observados después de la transformación celular por

el virus del sarcoma de Rous. Algunas observaciones sugieren que el crecimiento celular y la división pueden ser regulados normalmente por señales recibidas vía un citoesqueleto celular organizado (117,118).

Un tipo de cáncer que parece estar asociado con una etiología viral es el Cáncer Cérvico Uterino (CaCu). Este es el de mayor incidencia en nuestro país, ocupando el primer lugar como causa de muerte entre las enfermedades neoplásicas de la mujer (119).

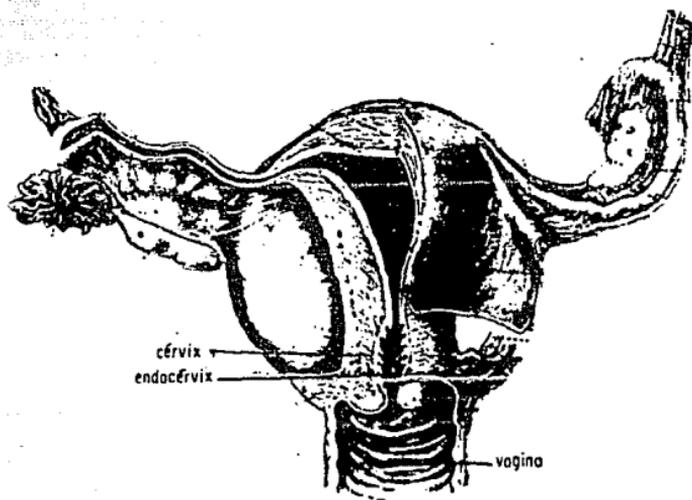
Pocas regiones del organismo son tan propensas a sufrir cambios patológicos como el tracto genital femenino y en relación con las patologías tumorales, es la más común. Afortunadamente; el 95% de las enfermas con cáncer incipiente pueden curarse (120) a pesar de esto, el carcinoma de cérvix es la primera causa de muerte de la mujer mexicana a partir de los 45 años (121). Los tumores del cérvix se desarrollan de manera gradual a partir de precursores preinvasivos, que en un estado in situ reversible pueden existir por varios años siendo completamente asintomáticos. Las anormalidades tempranas del cérvix, conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se diagnostican comúnmente en mujeres que fluctúan entre los 30 y 40 años de edad. Para que un NIC evolucione a un CaCu invasor necesita de 8 a 20 años (122) y en la mayoría de los casos se requieren de 5 a 10 años para que las células transformadas penetren la membrana basal del cérvix e invadan otros tejidos. Una vez ocurrido este fenómeno las pacientes que no han recibido tratamiento, o que no han respondido a este, mueren usualmente en un periodo de 3 a 5 años (123). La etapa terminal del CaCu se caracteriza por la invasión a otros órganos y el consecuente bloqueo de su función. Es conocido que los carcinomas tienen una gran capacidad para diseminarse inicialmente por ocupación de los nódulos linfáticos, en los cuales se observa una reacción hiperplásica, lo cual sugiere una respuesta del enfermo contra las células tumorales o contra sus productos, misma que generalmente no resulta suficiente para detener el avance de los tumores (124).

La etiología precisa del CaCu es aún desconocida, sin embargo se le ha asociado con una serie de factores causales que van desde el comportamiento sexual hasta la presencia de ciertos tipos de Virus del Papiloma Humano (VPH). Por ejemplo estudios en este campo sugieren que podría existir alguna relación entre el desarrollo de CaCu y el tabaquismo, ya sea directo o pasivo (125). Se ha encontrado también que entre las mujeres que han consumido anticonceptivos orales por largos periodos existe una mayor tendencia a generar CaCu (126,127). Los anticonceptivos orales pueden actuar como un co-carcinógeno en conjunción con agentes infecciosos (128).

El inicio de una vida sexual activa a temprana edad, la multiparidad y el número elevado de compañeros sexuales son factores de alto riesgo para el desarrollo de CaCu dado que aumentan la probabilidad de que se adquieran infecciones genitales (129). Entre estas quizá la de mayor peligrosidad es la causada por el VPH.

Los VPH son una familia de virus con DNA, los cuales inducen tumores epiteliales y fibroepiteliales de la piel o mucosa en vertebrados. Estos tumores, conocidos con el nombre de papilomas,

APARATO REPRODUCTOR FEMENINO



**REPLICA DE LOS ORGANOS REPRODUCTORES
FEMENINOS HUMANOS.**

son generalmente benignos, muestran un crecimiento limitado y frecuentemente sufren una regresión espontánea (130,131). Sin embargo, algunos miembros de la familia de los VPH inducen tumores que pueden evolucionar hacia carcinomas malignos, usualmente después de un largo período de latencia. Por otra parte, un gran número de estudios epidemiológicos, clínicos, patológicos y moleculares hechos durante este siglo indican que el CaCu podría ser una enfermedad producida por transmisión sexual, y que el VPH puede ser el agente sexualmente transmitido (132,133,134).

El tratamiento que se da a las pacientes con CaCu en los hospitales de nuestro país depende del estadio de desarrollo del tumor. La primera alternativa es la cirugía, ésta se aplica cuando se presenta un tumor in situ, que no ha tocado las paredes pélvicas. Cuando la masa tumoral ha invadido áreas que no pueden ser intervenidas quirúrgicamente, o cuando se presenta metástasis las opciones terapéuticas son la radioterapia y la quimioterapia.

La radioterapia se ha venido desarrollando desde los primeros años de nuestro siglo y hoy en día se aplica con buenos resultados en los estadios clínicos tempranos (135). En la mayoría de los casos la radioterapia se usa para reducir el tamaño de la masa tumoral, así como para eliminar las células que hayan sufrido transformación en las áreas aledañas (136).

La quimioterapia está basada en la aplicación de fármacos con efecto antineoplásico, su nivel de acción es muy amplio, y va desde el bloqueo del proceso mitótico hasta la inhibición de la función ribosomal. Generalmente los candidatos que son sometidos a quimioterapia tienen un CaCu avanzado, un carcinoma recurrente, después de cirugía o radiación, o presentan metástasis pélvicas y en nódulos periaórticos, condiciones que podrían limitar la potencialidad del éxito con otros tipos de tratamiento.

Estas terapias comparten dos características esenciales, no actúan de manera específica sobre las células del tumor y, dada su agresividad, producen efectos colaterales indeseables que provocan un agravamiento del estado general de los pacientes y disminuyen notablemente su calidad de vida. Otro factor importante es que los éxitos clínicos obtenidos con su aplicación disminuyen al aumentar el desarrollo de la enfermedad, lo cual deja sin esperanzas a las personas a quienes se les diagnostica un cáncer avanzado.

Por estas razones resulta urgente el desarrollo de nuevas alternativas por medio de las cuales sea posible ofrecer una esperanza de vida a los pacientes oncológicos. Para hacer esto posible es necesario desarrollar programas de investigación a nivel celular y molecular que aporten conocimientos que permitan una mayor comprensión de esta enfermedad, que en base a ellos se establezcan terapias más adecuadas para esta patología.

P L A N T E A M I E N T O D E L P R O B L E M A .

El estudio de fenómenos biológicos a nivel celular, es determinante para comprender el metabolismo en detalle de un organismo o ser vivo en general. A pesar de los avances presentados por el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos, es aún difícil trabajar con ciertos tipos celulares debido al desconocimiento de las condiciones de cultivo particulares. En este caso se encuentran las células epiteliales normales, las cuales presentan la problemática de no soportar un número de resiembras alto, son muy sensibles a cambios en su microambiente que llevan a alterar su metabolismo, y como respuesta general, éstas tienden a inhibir su proliferación. Sin embargo, basado en trabajos con estas células se han establecido ciertas condiciones para este tipo celular, condiciones que varían dependiendo del órgano del cual se obtienen y el objetivo por el cual se estudian, aunque con la limitante del tiempo de vida replicativa en cultivo (135).

Actualmente se realizan diferentes estudios en los cuales están implicadas estas células, estudios que tratan de proporcionar información que permita comprender el mecanismo metabólico que las rige, con la finalidad de aplicar este conocimiento a las patologías que presentan una relación directa o indirecta con los epitelios. Un estudio en particular es el que se lleva a cabo sobre el mecanismo regulador de la proliferación de células epiteliales, el cual aún no ha sido descifrado totalmente, por lo que su entendimiento permitiría, quizá, una mayor comprensión de los carcinomas, la elaboración de terapias adecuadas para esta patología y las que tengan relación con este mecanismo. Esto permitiría decrecer la tasa de incidencia de esta enfermedad, disminuir los gastos por parte de las instituciones de salud que tratan dicha patología, y sobre todo, establecer el conocimiento básico con su respectiva repercusión a lo largo del tiempo.

H I P O T E S I S .

Las células epiteliales y fibroblásticas normales en cultivo, son capaces de proliferar y de secretar una gama amplia de moléculas o factores con una función en específico, estas células al alcanzar una alta densidad en el plato de cultivo inhiben su proliferación de manera normal. Se ha reportado que esta inhibición quizás esté dada por la secreción en el medio de cultivo de un factor que presente actividad inhibidora de la división celular (136). Si las células epiteliales y fibroblásticas normales secretan al medio condicionado (MC) un factor con actividad inhibidora de la proliferación en la fase de confluencia, entonces podría esperarse que el MC de estas células, el cual presenta el factor inhibidor, pareo disminuya la proliferación de estas mismas células en la fase de crecimiento exponencial. También podría pensarse que si las células normales secretan este factor para regular de manera negativa su proliferación, la ausencia o disfunción de este factor podría quizás provocar una desregulación de la proliferación, permitiendo una proliferación positiva incontrolada como la que presentan las neoplasias. Si la ausencia o presencia del factor inhibidor es la causa de la desregulación de la proliferación en estas células, entonces cabría esperar que al adicionar este factor presente en los MCs de las células epiteliales y fibroblásticas en fase de confluencia a los cultivos de células tumorales del mismo tipo, el factor sea capaz de inducir una inhibición de la proliferación en estas células.

OBJETIVO GENERAL.

ESTUDIAR EL EFECTO INHIBIDOR DE LA PROLIFERACION PRESENTE EN LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE CELULAS EPITELIALES Y FIBROBLASTICAS NORMALES CONFLUENTES, SOBRE CELULAS TUMORALES DE CANCER CERVICO-UTERINO Y UNA LINEA TUMORAL DE LARINGE HUMANA (HEP-2).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.1.- Establecimiento de cinéticas de proliferación de células epiteliales y fibroblásticas, así como de las células tumorales provenientes de cáncer cervico-uterino y de la línea tumoral de vejiga humana (HEP-2).
- 1.2.- Obtención de medios condicionados de células epiteliales y fibroblásticas normales humanas en fase de confluencia.
- 1.3.- Determinar del efecto inhibitor de los medios condicionados producidos por células epiteliales y fibroblásticas en crecimiento confluyente, sobre la proliferación de células tumorales de CaCu y la línea tumoral de vejiga humana (HEP-2).

M E T O D O L O G I A .

MATERIAL BIOLÓGICO:

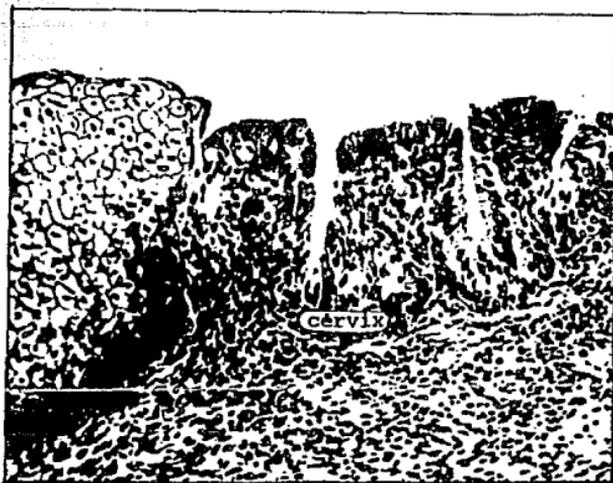
Las células epiteliales y fibroblásticas son obtenidas de una pieza quirúrgica de pacientes sometidos a histerectomía por causas diferentes al cáncer cérvico-uterino (CaCu).

Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en un medio de cultivo Eagle Medium (Gibco, U.S.A.) al 20% de suero fetal de bovino (Microlab, México) a 4 grados centígrados y procesada en las siguientes 2 a 3 horas. El procesamiento consiste en la separación por disección de la capa epitelial del tejido conjuntivo donde se encuentran los fibroblastos; ambas partes son cortadas por separado en trozos pequeños (5mm), y sometidos a una disgregación enzimática por tripsina pancreática (Sigma, U.S.A.) al 0.05%; ésta consiste en poner los trozos de tejido en un matraz de fondo plano de 50ml con 30ml de tripsina al 0.05% a 37 grados centígrados, con agitación durante 60 minutos. Una vez concluido el tiempo de disgregado, éste es decantado a un tubo de centrifuga de 50ml; El disgregado es centrifugado con 1ml de suero fetal de bovino (SFB) a 336.5g. El paquete celular obtenido de esta disgregación es resuspendido en Eagle Medium (EM) al 10% de SFB de tal manera que las células del paquete sean sembradas en platos de cultivo de 5ml, con una densidad celular de 500,000 células por plato. A la muestra de tejido remanente en el matraz se le añaden nuevamente 20ml de tripsina y se continúa durante 30 minutos más; la mezcla de tejido disgregado y tripsina se vierte a través de una malla de nylon que permite sólo el paso del material disgregado dejando los restos del tejido no disgregado en la malla, el filtrado es centrifugado, resuspendido y sembrado de manera similar al primer disgregado. Los cultivos son puestos en una incubadora a 37 grados centígrados, 5% de bióxido de carbono y una atmósfera de humedad a punto de rocío durante 3 días máximo, posteriormente, se realiza el primer cambio de medio y se continúa así cada 5 días hasta alcanzar cultivos confluentes y poder llevar a cabo resiembras que permitan obtener poblaciones de un sólo tipo celular en caso de ser necesario. Obtenidas las poblaciones se continúa con las resiembras para obtener los MC en etapa confluyente y a la vez usar estas mismas células en los ensayos experimentales.

CELULAS TUMORALES:

Las células tumorales son obtenidas de pacientes con CaCu, estas piezas quirúrgicas son fragmentadas en trozos pequeños (de 3 a 5 mm), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina 0.025% durante 20 minutos, de manera similar al procedimiento descrito para las muestras de tejido normal, se centrifuga el material disgregado de células tumorales y se siembra bajo las mismas condiciones que las células normales.

EPITELIOS HUMANOS



**EPITELIO PLANO ESTRATIFICADO NO QUERATINIZADO
DE LA PORCION VAGINAL DEL CUELLO UTERINO.**

LINEAS CELULARES:

Las líneas celulares de tipo epitelial T-3 y Calo provienen de un carcinoma de cérix humano, la HEP-2 proveniente de un carcinoma de laringe humana, son sembradas en cajas de cultivo de 5ml en EM al 10% de SFB en una incubadora a 37 grados centígrados, 5% de bióxido de carbono y una atmósfera húmeda a punto de rocío durante 5 o 6 días en promedio de acuerdo a la línea.

MEDIOS CONDICIONADOS:

Los MC de cada una de los tipos celulares normales y tumorales, así como de las líneas celulares se obtienen formando lotes de cada uno de ellos de tal manera que se tiene MC de células normales y tumorales en fase confluyente.

PROLIFERACION CELULAR:

La determinación de la proliferación celular fue evaluada utilizando la técnica de cristal violeta (137). Que a continuación se describe brevemente:

- a) fijar las células con glutaraldehído al 1.1 %
- b) dejar secar las placas de cultivo al aire
- c) añadir el colorante cristal violeta al 0.1 %
- d) lavar sutil y exhaustivamente las placas con agua desionizada o bidestilada de tal manera que el colorante no asimilado sea retirado de los pozos.
- e) dejar secar las placas al aire libre.
- f) añadir ácido acético al 10% (3ml), dejar en agitación 20 minutos a temperatura del cuarto.
- g) tomar lecturas en un espectrofotómetro a 590nm del sobrenadante de los pozos (3ml) y correlacionar las absorbancias obtenidas con el número de células.

CURVAS DE CALIBRACION:

La realización de las curvas de calibración, son llevadas a cabo con células previamente cultivadas en fase exponencial, desprendidas del plato de cultivo con tripsina al 0.05% durante 5 a 10 minutos para células normales y 3 a 5 minutos para células tumorales a una temperatura de 37 grados centígrados. Son colectadas en tubos de ensayo y centrifugadas a 336.5g para formar un paquete celular. Una vez centrifugadas, se añade un volumen específico y las células son resuspendidas y contadas con la ayuda de un hemocitómetro. Se toman alícuotas de 2 millones de células y se colocan en pozos de 2.5 ml. Los pozos consecutivos

deberán contener un mililitro de medio, se homogeniza el primer pozo y se realizan diluciones sucesivas, posteriormente se incuban por un espacio de 3 hrs como mínimo para las células tumorales y de 4 para las células normales. Una vez adheridas las células, se fijan con glutaraldehído y se tiñen para determinar su densidad óptica.

CINETICAS DE PROLIFERACION:

Para realizar las cinéticas, es necesario que las células se encuentren en etapa de proliferación exponencial. La células se siembran en cajas de 2.5 ml., con una densidad de 50 mil células por plato si son normales y 30 mil células por plato cuando son tumorales. Las células normales se incuban durante 15-17 días y 6-8 días de incubación para células tumorales. Durante este periodo se fijan las células de cuatro cajas diarias con glutaraldehído, las mismas que se tiñen para determinar su número celular con la técnica de cristal violeta (137). Con los valores de densidad se construyen las gráficas de tiempo vs densidad.

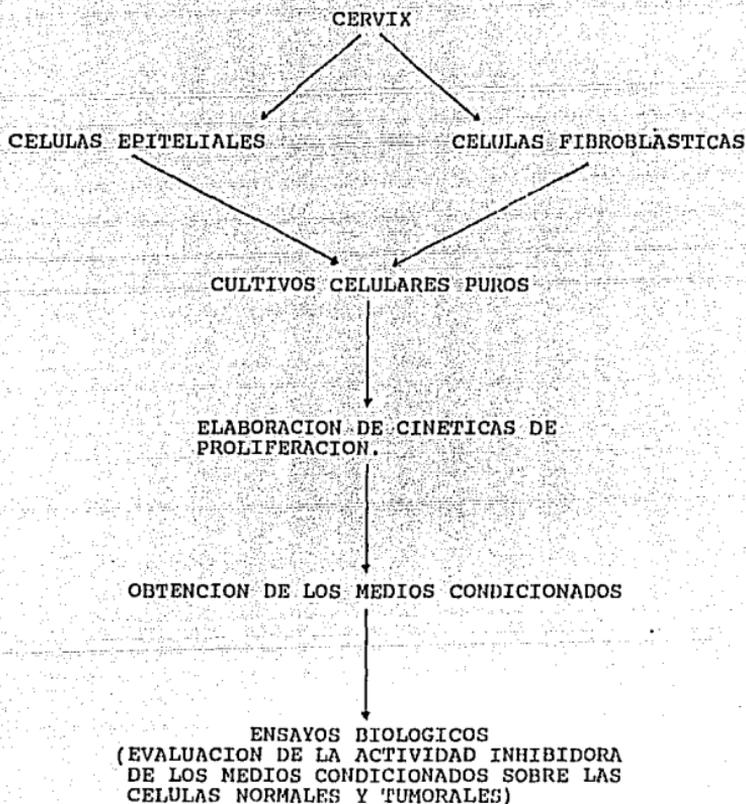
EFEECTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS:

La actividad de los medios condicionados de células epiteliales y fibroblásticas confluentes, se determina mediante ensayos experimentales en los que se prueban cada uno de los lotes de los medios condicionados sobre cultivos de células de cervix normal humano y líneas tumorales en fase de proliferación exponencial.

MEDIO CONDICIONADO TRATADO CON TRIPSINA:

El medio condicionado es sometido a la acción de tripsina al 0.05% en verseno, incubándose a 37 grados centígrados durante 30 minutos, una vez pasado el tiempo, es neutralizado el efecto proteolítico de la tripsina con suero fetal de bovino. Después del tratamiento, el medio condicionado es ensayado sobre la proliferación de células tumorales en fase exponencial.

DIAGRAMA DE FLUJO



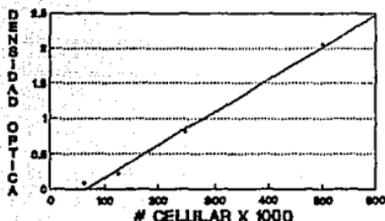
R E S U L T A D O S .

Las células, de manera natural regulan su división, no obstante, se conoce poco de los factores que participan en el mecanismo que regula la proliferación celular. Se conoce la existencia de ciertos factores de diferente naturaleza química que están relacionados con la regulación de la proliferación, la mayor parte de ellos estimuladores de la división celular. Se sabe además de la participación de elementos extracelulares, como son las hormonas o los factores de crecimiento, que pueden ser capaces de estimular o inhibir la proliferación (8). En particular, las células epiteliales y fibroblásticas detienen su proliferación al encontrarse con otras células vecinas, fenómeno conocido como inhibición por contacto, gracias a las técnicas de cultivo de tejidos, se ha permitido el estudio de este fenómeno en condiciones controladas in vitro, determinando la participación de elementos de naturaleza proteica secretados al medio por estas mismas células u otras de tipo diferente (16). Las células epiteliales y fibroblásticas se encuentran en una estrecha asociación, participan en mecanismos comunes como el de reparación de la piel, en la hematopoiésis, etc. Se han reportado factores que secretan los fibroblastos que tienen efecto sobre las células epiteliales (24), y no es de sorprenderse, que sucediera a la inversa. Para estudiar el mecanismo que regula la proliferación celular de ambas estirpes celulares, es necesario determinar y caracterizar las condiciones en las cuales estas células proliferan; de principio, es primordial establecer que tanto proliferan estas estirpes en el tiempo y en un área determinada, es decir, realizar una cinética de proliferación que nos permita establecer cuando dichas estirpes celulares se encuentran en la fase de proliferación, y cuando se encuentran en la fase de confluencia; para ello, se requiere de una técnica que nos permita determinar el número celular de forma precisa y fácil. Aunque se conocen algunas técnicas radioactivas como la de incorporación de timidina tritiada por el DNA en la síntesis del mismo, se eligió usar la técnica de incorporación de cristal violeta, la cual está basada en la relación que hay entre la densidad óptica producida por la incorporación del colorante al núcleo de las células y el número celular cuando se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm (Ver material y métodos). Primeramente, una curva patrón fue realizada para cada una de las estirpes celulares empleadas en este trabajo, tanto para células normales como para células provenientes de tumor de Cervix y líneas celulares establecidas, dejando ver la estrecha relación entre la densidad óptica y el número celular, confirmado por el coeficiente de correlación determinado para cada una de estas curvas (Fig. 1).

Una vez realizadas las curvas patrón de cada una de las estirpes celulares, se realizaron las cinéticas de proliferación para determinar el comportamiento de cada una de las estirpes en cultivo, tanto para células normales, como para la línea epitelial HEP-2 proveniente de un tumor de laringe humana y células tumorales provenientes de biopsias de Cáncer Cervicouterino (CaCu).

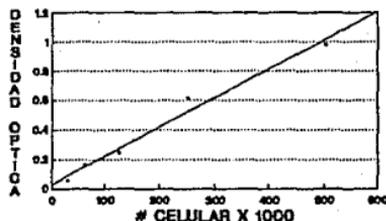
CURVAS DE CALIBRACION.

DE EPITELIOS HUMANOS
NORMALES DE CERVIX



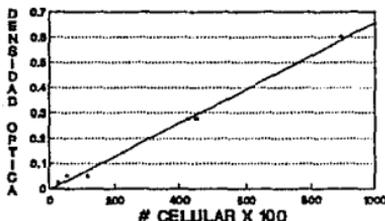
COEFICIENTE DE CORRELACION DE 0.98%

DE FIBROBLASTOS HUMANOS
NORMALES DE CERVIX



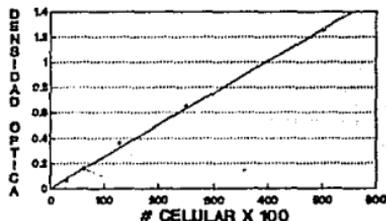
COEFICIENTE DE CORRELACION DE 0.99%

DE LAS CELULAS T-3
TUMORALES DE CaCu



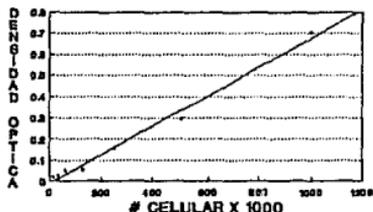
COEFICIENTE DE CORRELACION DE 0.99%

DE LAS CELULAS CALO
TUMORALES DE CaCu



COEFICIENTE DE CORRELACION DE 0.99%

DE LAS CELULAS HEP-2
TUMORAL DE LARINGE HUMANA



COEFICIENTE DE CORRELACION DE 0.99%

FIG. 1. CURVAS DE CALIBRACION PARA CELULAS NORMALES (EPITELIOS Y FIBROBLASTOS PROVENIENTES DE CERVIX NORMAL HUMANO), TUMORALES "CALO" Y "T-3" (EPITELIOS TUMORALES PROVENIENTES DE EXPOSAS DE CANCER CERVICO UTERINO) Y PARA LA LINEA CELULAR "HEP-2" (PROVENIENTE DE UN CANCER DE LARINGE HUMANA).

Las células epiteliales y fibroblásticas normales, provenientes de Cérvix normal, presentan un comportamiento característico, es decir, presentan cuatro fases; una fase denominada de adaptación la cual consiste en el tiempo que toman las células para acomodarse a las condiciones de cultivo, con una duración de tres o cuatro días; una fase de crecimiento exponencial que dura entre seis y siete días; una fase de confluencia que inicia a partir del décimo u onceavo día y que dura de tres a cuatro días; la cuarta fase se caracteriza por la disminución del número celular a causa de la muerte celular provocada por las condiciones del medio de cultivo. (figura 2). Las fases presentan características particulares pero comunes para ambos tipos celulares, es decir, la fase de crecimiento exponencial se caracteriza por una proliferación fuerte y secreción de moléculas diversas al medio de cultivo, mientras que la fase de confluencia presenta una fuerte inhibición de la división celular manteniendo constante el número celular a lo largo de tres a cuatro días después de la fase de crecimiento exponencial; una vez concluida la fase de confluencia, las células tienden a morir por las condiciones tóxicas del medio (Ver figura 2). La diferencia más notable en el comportamiento entre las células epiteliales y fibroblásticas es su tasa de proliferación, replicándose 1.9 veces más rápido las células fibroblásticas que las epiteliales (Ver tabla 1).

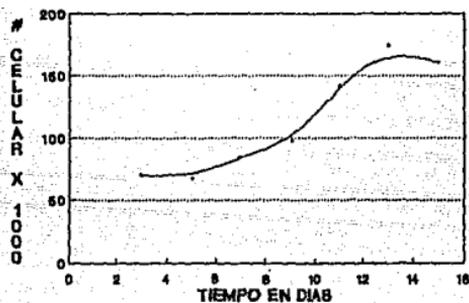
TIPO CELULAR	TIEMPO DE DOBLAJE
Calo _____	1.2 días
T-3 _____	1.2 días
HEP-2 _____	1.4 días
Fibroblastos normales humanos _____	2.8 días
Epitelios normales humanos _____	5.4 días

Tabla 1. tiempos de doblaje, para epitelios y fibroblastos de cérvix normal humano y células tumorales.

Ambos tipos celulares presentan una fase de confluencia, en la cual la división celular es detenida, quizás por un mecanismo físico, donde basta que las células esten en contacto unas con otras para inhibir su proliferación, sin embargo, esta explicación no responde al hecho de que tanto en las células epiteliales así como en las células fibroblásticas en cultivo, aparezcan espacios vacíos que no son llenados por las células,

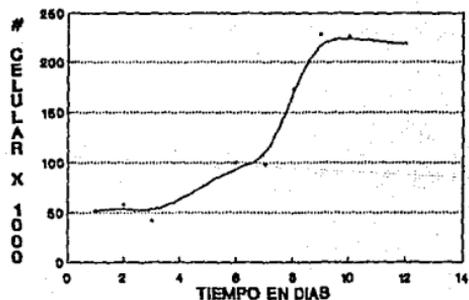
CINETICAS DE PROLIFERACION

DE EPITELIOS HUMANOS



CAJAS DE 2.5 ml.

DE FIBROBLASTOS HUMANOS



CAJAS DE 2.5 ml.

FIG. 2. CINETICAS DE PROLIFERACION DE CELULAS EPITELIALES Y FIBROBLASTICAS DE BIOPSIAS DE CERVIX NORMAL HUMANO.

esto hace pensar que quizás hay otro factor que interviene en el paro de la división celular, que es producido por sí mismas, secretado al medio de cultivo (medio condicionado MC), con un efecto autócrino. Para determinar la existencia de este factor, es necesario coleccionar los medios donde proliferan las células y comprobar su efecto en células del mismo tipo en fase exponencial. Como las cinéticas muestran que el paro de la división celular se da a partir del décimo día, lo cual quiere decir que el efecto del factor inhibidor de la proliferación se encuentra en concentraciones adecuadas para llevar a cabo su efecto, fue necesario coleccionar el medio de cultivo entre el onceavo y treceavo día para células fibroblásticas y epiteliales normales respectivamente (Ver figura 2).

Por otro lado, las células epiteliales tumorales, tanto las provenientes de CaCu, como la línea tumoral HEP-2, presentan una tasa de proliferación muy similar (ver tabla 1), todas mantienen una fase exponencial continua, sin embargo, la fase de confluencia en estas células no se da, prueba de ello es la total cobertura de la superficie de cultivo y el desprendimiento de las células al no encontrar un espacio en donde adherirse. Lo que presentan es una saturación total del área de cultivo que crea un artefacto al estar determinando el número celular (Figura 3). Si comparamos el comportamiento de las células normales con el de las tumorales, podemos decir que las células tumorales presentan una proliferación continua, que se replican 4.2 veces más rápido en promedio y no presentan fase de confluencia (ver tabla 1, figura 2 y 3).

Continuando con las células normales, una vez que son colectados los MC en fase de confluencia, se procedió a determinar si éstos MCs presentan una actividad inhibidora de la proliferación celular, por lo que se llevó a cabo un ensayo que consistió en cultivar células fibroblásticas normales provenientes de cérvix en presencia y en ausencia de el MC confluyente, evaluando su número celular en la fase exponencial (Figura 4).

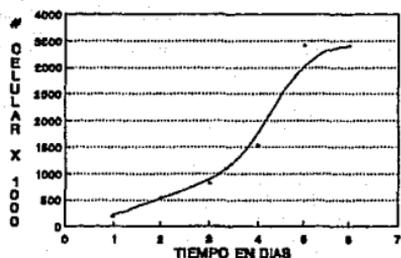
El ensayo, claramente muestra que el medio condicionado de fibroblastos en fase de confluencia, presenta una actividad inhibidora de la proliferación, la cual es capaz de inhibir hasta un 40% de la proliferación comparada con el control normal.

Una vez demostrada la existencia de una actividad inhibidora presente en el MC de fibroblastos se cuestionó sobre el posible efecto inhibidor sobre la proliferación de células tumorales, y si los medios condicionados de células epiteliales presentaban el mismo efecto sobre estas células tumorales, en particular sobre epitelios provenientes de CaCu. Para dar respuesta a tal cuestionamiento, se cultivaron células tumorales provenientes de dos biopsias de CaCu denominadas "Calo" y "T-3", y una línea celular epitelial bien establecida, proveniente de un cáncer de laringe humana llamada HEP-2, a las cuales se les cultivó en presencia y ausencia de los MCs de epitelio y fibroblastos confluentes (figura 5).

La actividad inhibidora a la proliferación de los MCs de epitelios y fibroblastos normales confluentes, inhiben la proliferación de células tumorales provenientes de CaCu así como las provenientes de laringe humana. Su mayor efecto fue observado

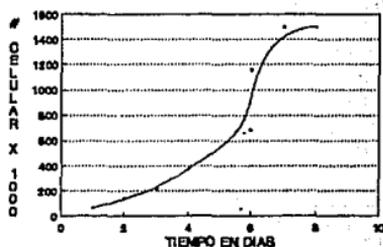
CINETICAS DE PROLIFERACION.

DE LAS CELULAS TUMORALES T-3



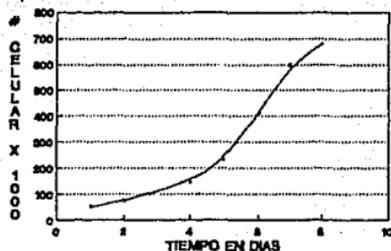
CAJAS DE 2.5 ml

DE CELULAS TUMORALES CALO



CAJAS DE 2.5 ml.

DE LA LINEA TUMORAL HEP-2

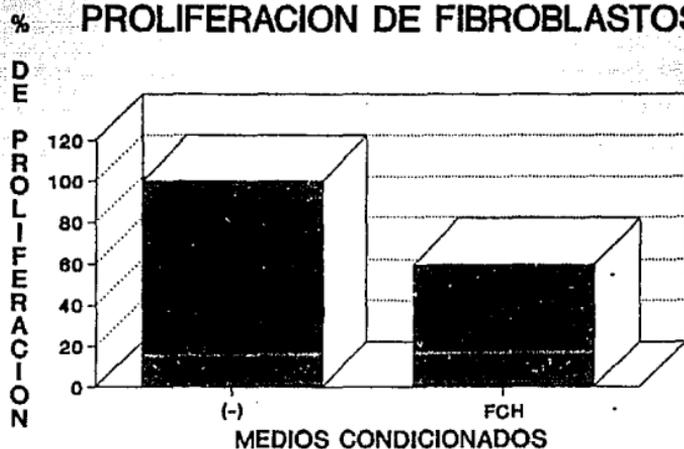


CAJAS DE 2.5 ml

FIG. 3. CINETICAS DE PROLIFERACION

DE LAS CELULAS TUMORALES
PROVENIENTES DE BIOPSIAS DE
CANCER CERVICO UTERINO ('CA-
LO' Y 'T-3') Y LA LINEA TUMOR-
RAL PROVENIENTE DE LARINGE
HUMANA 'HEP-2'.

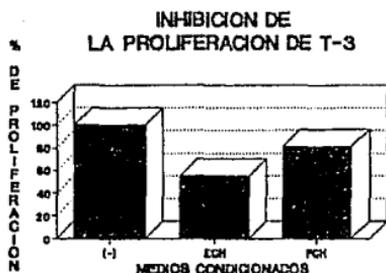
INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS



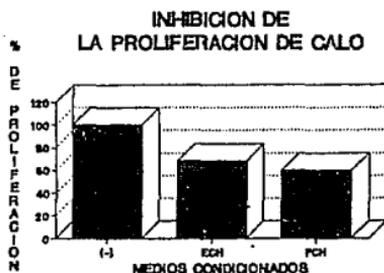
(-) (CONTROL)
FCH (MC. DE FIBROBLASTOS CONFLUENTES)

**FIG. 4. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA
PRESENTE EN LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE CELULAS NORMALES CONFLUENTES, SOBRE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS NORMALES HUMANOS.**

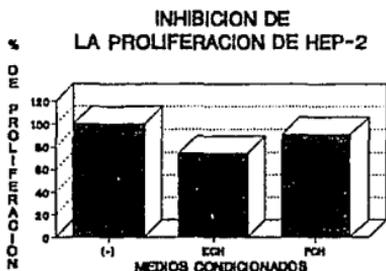
EFFECTO INHIBIDOR DE LOS MCs. DE FIBROBLASTOS Y EPITELIOS NORMALES CONFLUENTES SOBRE LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES.



(-) (CONTROL)
ECH (MC. DE EPITELIOS CONFLUENTES)
FCH (MC. DE FIBROBLASTOS CONFLUENTES)



(-) (CONTROL)
ECH (MC. DE EPITELIOS CONFLUENTES)
FCH (MC. DE FIBROBLASTOS CONFLUENTES)



(-) (CONTROL)
ECH (EPITELIOS CONFLUENTES)
FCH (FIBROBLASTOS CONFLUENTES)

FIG. 6. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA PRESENTE EN LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE EPITELIOS Y FIBROBLASTOS CONFLUENTES SOBRE LA PROLIFERACION DE LAS CELULAS TUMORALES "CALO" Y "T-3", PROVENIENTES DE BIOPSIAS DE CaCu Y LA LINEA TUMORAL DE LARINGE HUMANA "HEP-2".

en las células de CaCu "Calo", las cuales presentan una inhibición del 40% con el MC de fibroblastos humanos, sin embargo, el menor efecto lo presentan las células "T-3" y HEP-2 con el mismo medio condicionado (Ver figura 5).

Ya que las células epiteliales y fibroblásticas normales, son capaces de parar su proliferación de manera natural con la intervención de un factor inhibidor de la proliferación, secretado por ellas y con un efecto autócrino presente en los MCs de estas mismas en la fase de confluencia, el cual formaría parte del mecanismo que regula la proliferación de estas células, cabría pensar que las células tumorales de CaCu "calo", "T-3" y la línea tumoral HEP-2, son células que presentan una anomalía en el mecanismo de regulación de la proliferación, esta anomalía podría estar dada por la incapacidad de estas células a producir el factor inhibidor de la proliferación que se presenta en los MCs de células normales del mismo tipo. Para estudiar este punto, se realizó un ensayo en el que se cultivaron las células "T-3" y HEP-2 en presencia y ausencia de su propio medio condicionado, colectado en la fase de saturación (quinto-sexto día de cultivo), (Figura 6).

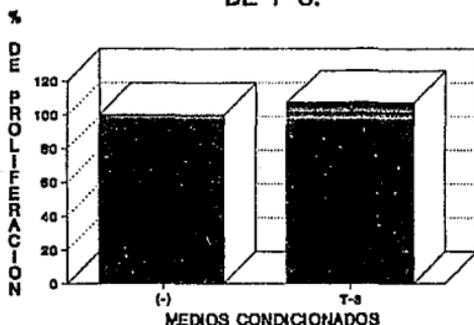
Los resultados obtenidos muestran que el MC proveniente de células tumorales no presenta ningún efecto sobre ellas mismas, indicando aparentemente que las células tumorales "T-3" y HEP-2 no secretan al medio de cultivo un factor con actividad inhibidora de la proliferación.

Se sabe que las células en cultivo son capaces de secretar al medio una diversidad de moléculas con efectos diferentes, estas moléculas pueden presentar una naturaleza química en particular, ya sea que se trate de una proteína, un lípido, un azúcar o las posibles mezclas entre éstas. Como se mencionó en el marco teórico, se han estudiado factores que estimulan e inhiben la proliferación celular, la mayor parte de éstos son de naturaleza proteica. En base a ello, se trató al MC proveniente de fibroblastos normales confluentes con una proteasa (tripsina 0.05%) con el objeto de saber si el factor presenta una naturaleza química de proteína, la proteasa romperá a las proteínas contenidas en el MC y si el factor es una proteína el efecto de la actividad inhibidora de la proliferación presente en el MC decrecerá o desaparecerá totalmente (Figura 7).

Los resultados muestran que el MC tratado con la proteasa disminuyó su actividad con respecto al MC no tratado, lo cual indica que es muy probable que se trate de un factor de naturaleza proteica.

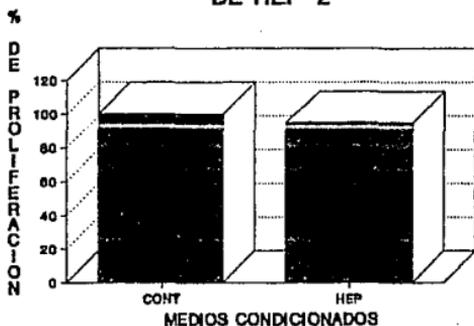
INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES

DE T-3.



(-) (CONTROL)
T-3 (MC. SATURANTE DE T-3)

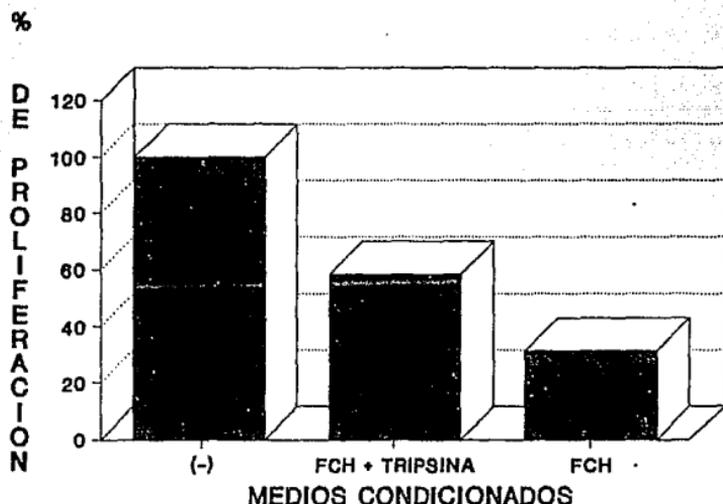
DE HEP-2



(-) (CONTROL)
HEP (MC. SATURANTE DE HEP-2)

FIG. 6. EFECTO DE LOS MCs. DE LAS CELULAS TUMORALES "T-3" Y "HEP-2" SOBRE LA PROLIFERACION DE SI MISMAS.

EFFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA PRESENTE EN EL MC. DE FIBROBLASTOS.



(-) (CONTROL)

FCH (MC. DE FIBROBLASTOS CONFLUENTES)

TRIPSINA (PROTEASA)

FIG. 7. EFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA PRESENTE EN EL MC. DE FIBROBLASTOS CONFLUENTES, EVALUADO SOBRE LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES "CALO".

A N A L I S I S D E R E S U L T A D O S .

Las células epiteliales y fibroblásticas son dos tipos celulares que presentan características comunes, tales como su capacidad de adherirse, la habilidad para formar monocapas, la capacidad de regular su proliferación a través de un contacto célula-célula, etc. Ambos se encuentran en estrecha relación, compartiendo microambientes en los diferentes órganos en los que residen. El hecho de que estas células se presenten en todos los órganos que constituyen al ser humano, deja ver que ellas desempeñan un papel importante en la función de los aparatos y sistemas que constituyen a un individuo.

De manera normal, estas células presentan un mecanismo regulador de su división, que permite en determinadas condiciones activar o inhibir su proliferación. El estudio de este mecanismo es de suma importancia, una comprensión detallada de los factores que participan en este mecanismo y su modo de acción, permitirá explicar como se desarrolla la patología del cáncer.

Las células epiteliales y fibroblásticas normales, presentan *in vitro*, ciertas etapas o fases de crecimiento que se expresan de manera secuencial a través del tiempo, estableciendo un comportamiento característico de éstas, como se muestra en la figura 2. Parte de este comportamiento no se basa sólo en la velocidad con que proliferan (tabla 1), está basado también en la producción de moléculas con una función específica con acción autócrina o parácrina.

En la literatura se ha citado que las células epiteliales y fibroblásticas son capaces de secretar al medio de cultivo moléculas con actividad inhibidora de la proliferación, ejerciendo una acción autócrina (12,17); también se sabe de la estrecha relación entre ambas estirpes celulares, por lo que no sería una sorpresa que los fibroblastos secreten alguna molécula que afectara a las células epiteliales de una forma positiva o negativa sobre su división celular. El efecto observado de la actividad inhibidora presente en el MC de fibroblastos confluentes, muestra una acción autócrina sobre los mismos fibroblastos cuando son sembrados en presencia de este inhibidor y en una fase de crecimiento exponencial (Figura 4).

Esto indica que el factor con actividad inhibidora se presenta en una concentración capaz de desempeñar su efecto en la fase de confluencia. Sin embargo, esto no descarta que este factor no esté presente en la fase exponencial, ya que existe la posibilidad de que se encuentre en concentraciones incapaces de ejercer su efecto de manera significativa.

El hecho de que los fibroblastos normales humanos secreten una molécula o factor que inhiba la proliferación de células epiteliales (acción parácrina), realza aún más la estrecha comunicación que existe entre éstos dos tipos celulares, evidenciando que quizás ellas regulen su proliferación de una manera bilateral a través de factores secretados al medio.

A diferencia de las células normales, las células tumorales presentan un comportamiento de proliferación distinto, son más rápidas y su división es continua, esto es, no presentan fase de confluencia (Figura 3).

Tratando de dar una explicación a la diferencia presentada entre células normales y tumorales con respecto a su proliferación, se encontró que las células normales secretan al medio de cultivo un factor que inhibe la proliferación de sí mismas en la fase de confluencia, mientras que las células tumorales no presentan esta fase, indicando por lo tanto, que dicha fase en células normales está dada por la secreción de un factor con actividad inhibidora de la proliferación, el cual requiere de una concentración adecuada, establecida por la densidad celular (Fig.2). Sin embargo, esto origina otra cuestión, ¿por qué las células tumorales carecen de una fase de confluencia?, quizás se deba a que ellas no son capaces de secretar o producir el factor con actividad inhibidora presente en los MC de células normales, o bien, no son capaces de responder a dicho factor por la carencia total o parcial de los receptores específicos para este factor.

Los resultados obtenidos en la figuras 5, apoyan la hipótesis de que las células tumorales provenientes de cervix y la línea epitelial proveniente de tumor de laringe, son capaces de responder al factor con actividad inhibidora de la proliferación presente en los MC de células epiteliales y fibroblásticas normales, evidenciando que éstas presentan la cantidad adecuada de receptores para el factor con actividad inhibidora, y que no son capaces de producir el factor de una manera adecuada para responder a éste. Esto último es apoyado por los resultados que se muestran en la figura 6, en la cual las células provenientes de tumor de cervix no presentan una inhibición de la proliferación cuando son expuestas a su propio medio condicionado. Además, el hecho de que las células HEP-2 respondan de la misma manera al factor que las provenientes de tumor de cervix, indica que quizás el factor tenga un efecto común para las células epiteliales independientemente del órgano del cual son obtenidas.

Los resultados obtenidos anteriormente, demuestran la existencia de un factor inhibidor presente en los MCs de células epiteliales y fibroblásticas normales. Ahora es necesario determinar la naturaleza química del factor, lo cual se consigue sometiendo al MC donde está presente el factor en estudio con reactivos específicos para proteínas, lípidos, azúcares o ácidos nucleicos.

En base a que la mayoría de los factores que intervienen en el mecanismo de regulación de la división son moléculas de bajo peso molecular y de naturaleza proteica, se esperaba que el factor con actividad inhibidora fuera de naturaleza proteica, lo cual fue confirmado, o por lo menos aportó una evidencia al respecto, cuando el MC donde el factor está presente, fue expuesto a una proteasa (tripsina), se observó que dicho medio es afectado por esta enzima de una manera parcial, indicando que el factor es de naturaleza proteica. El hecho de que el efecto del MC no fue abatido totalmente, se debe quizás a que no se utilizó la concentración adecuada de la proteasa (Figura 7).

El hallazgo de este trabajo, en el que se demuestra que las células epiteliales y fibroblásticas normales son capaces de secretar un factor proteico que inhibe no solamente su propia proliferación, sino que a su vez, en el caso de los fibroblastos

inhibe la proliferación de las células epiteliales, sugiere que el mecanismo que controla la proliferación de ambos tipos celulares está interconectado, estableciendo una estrecha intercomunicación entre éstos dos tipos celulares. Por otro lado, el efecto inhibitorio no sólo se observó en células normales, sino que además fue observado en células tumorales, lo que hace pensar que quizás el estado malignicente de estas células tumorales esté directamente relacionado con la ausencia del factor inhibidor secretado por células normales.

El encontrar un factor de naturaleza proteica con actividad inhibidora de la proliferación secretado por células normales, presenta una gran aportación a la comprensión del Cáncer Cérvico-uterino, ya que establece que este cáncer está relacionado de manera directa con la falta de producción de este factor, confiriendo un estado malignicente a las células epiteliales. El hallazgo da pauta a pensar que este factor podría ser utilizado de una manera terapéutica para este mal, que como se mencionó, representa una gran incidencia dentro de la población femenina en México, lo que traería como resultado no sólo una posible solución o terapia más adecuada para esta enfermedad, sino que también el ahorro de millones de pesos a las instituciones de salud que ofrecen tratamientos más agresivos (quimioterapia, radioterapia etc.) y costosos para contrarrestar esta patología.

Sin embargo, no basta con demostrar que existe un factor con actividad inhibidora de la proliferación, el siguiente paso es realizar una caracterización bioquímica y molecular que permitan comprender la estructura y función de esta proteína, que permita determinar su mecanismo de acción dentro del proceso de regulación de la proliferación celular, y la obtención de está en cantidades suficientes para poder ser aplicada a nivel terapéutico.

C O N C L U S I O N E S .

- 1.- Las células epiteliales y fibroblásticas de cérvix normal humano, presentan un comportamiento típico in vitro, mostrando cuatro fases: de adaptación, exponencial, confluencia y por último de muerte celular.
- 2.- En nuestras condiciones de cultivo los fibroblastos normales proliferan 1.9 veces más rápido que las células epiteliales.
- 3.- A diferencia de las células normales, las estirpes y líneas celulares tumorales provenientes de cérvix humano (Calo y T-3), y la línea tumoral de laringe humana HEP-2; no presentan etapa de confluencia.
- 4.- El efecto inhibitorio del medio condicionado de epitelios o fibroblastos confluentes, alcanza hasta un 40% sobre la proliferación de células tumorales.
- 5.- Las células tumorales "T-3", "Calo" y "Hep-2" son capaces de responder al factor inhibidor presente en los medios condicionados de epitelios y fibroblastos de cérvix normal inhibiendo su proliferación.
- 6.- La actividad inhibitoria de la proliferación presente en el medio condicionado de fibroblastos confluentes está dada por un factor de naturaleza proteica.

A P E N D I C E S .

APENDICE No.1.

CURVAS DE CALIBRACION Y CINETICAS DE PROLIFERACION

CALIBRACION DE HEP-2:

No.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1	0.015	0.0	15.625
2	0.0215	0.0021	31.250
3	0.045	0.028	62.500
4	0.0515	0.00495	125.00
5	0.1525	0.039	250.00
6	0.29	0.035	500.00
7	0.705	0.00707	1000.0
8 *	1.5	0.0	2000.0

NOTA: los números marcados con un "*" se eliminarón.

CINETICA DE HEP-2:

Día	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1	0.03	0.0047	48.627
2	0.23	0.0082	74.691
3	-	-	-
4	0.745	0.005	142.829
5	1.4	0.14	229.489
6	2.8	0.14	414.718
7	4.58	0.12	602.222
8	4.8	0.24	679.329

CALIBRACION DE T-3:

No.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1 *	0.02	0.0	6.992
2 *	0.0225	0.00353	13.984
3	0.025	0.00707	27.969
4	0.05	0.0	55.938
5	0.053	0.0014	111.875
6	0.14	0.014	223.750
7	0.275	0.035	447.500
8	0.6	0.029	895.000

CINETICA DE T-3:

Día	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1	0.069	0.001	214
2	0.1775	0.0035	542
3	0.2675	0.018	813
4	0.51	0.014	1543
5	1.125	0.106	3397
6	1.125	0.25	3397

CALIBRACION DE CALO:

No.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1 *	0.098	0.0062	7.825
2 *	0.056	0.0017	15.625
3	0.0575	0.000408	31.250

4	0.155	0.019	62.500
5	0.35	0.028	125.000
6	0.64	0.068	250.000
7	1.25	0.04	500.000
8 *	1.5	0.0	1000.00

CINETICA DE CALO:

Día	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1	0.19	0.076	62.0
2	0.31	0.057	135.0
3	0.45	0.014	218.0
4	0.74	0.043	382.5
5	1.26	0.189	682.5
6	2.05	0.026	1145.0
7	2.67	0.42	1500.0

CALIBRACION DE FIBROBLASTOS HUMANOS:

No.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1 *	0.055	0.0070	7.825
2 *	0.045	0.0066	15.625
3	0.058	0.0008	31.250
4	0.165	0.004	62.500
5	0.245	0.0081	125.00
6	0.61	0.018	250.00
7	0.977	0.02	500.00
8 *	1.18	0.1	1000.00

CINETICA DE FIBROBLASTOS:

Día	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1	0.137	0.03	51.54
2	0.15	0.02	56.7
3	0.11	0.0082	40.836
4	-	-	-
5	0.32	0.037	124.148
6	0.256	0.026	98.758
7	0.253	0.012	97.567
8	0.44	0.035	171.755
9	0.58	0.0081	227.296
10	0.576	0.017	225.709
11	-	-	-
12	0.55	0.0081	215.394

CALIBRACION DE EPITELIOS HUMANOS:

No.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
1	0.05	0.002	15.625
2	0.043	0.002	31.250
3	0.075	0.016	62.500
4	0.22	0.03	125.0
5	0.8	0.012	250.0
6	2.05	0.1	500.0

CINETICA DE EPITELIOS HUMANOS.

Día	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil
3	0.143	0.028	70
5	0.133	0.006	68
7	0.205	0.041	85
9	0.256	0.101	97
11	0.436	0.096	141
13	0.586	0.52	175
15	0.456	0.140	160

NOTA: los números marcados con "*" se eliminarón.

APENDICE No.2

ENSAYOS

ENSAYO T-3:

M.C.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil	Porcentaje %
Control	0.34	0.0	519	100
ECH	0.185	0.045	285	54.91
FCH	0.275	0.025	421	81.17
T-3	0.22	0.01	557	107.3

ENSAYO DE HEP-2:

M.C.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No.celular por mil	Porcentaje %
Control	0.265	0.035	72.0137	100
ECH	0.125	0.0078	53.4305	74.19
FCH	0.215	0.025	65.376	90.78
HEP-2	0.251	0.04	68.218	94.73

ENSAYO DE CALO:

M.C.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No. celular por mil	Porcentaje %
Control	0.4733	0.04	186.94489	100
ECH	0.325	0.025	127.9275	68.43
FCH	0.285	0.015	112.00	59.91
Calo	0.4535	0.02	179.1297	95.82

ENSAYO CON UNA PROTEASA:

M.C.	Densidad óptica promedio	Desviación estandar	No. celular por mil	Porcentaje %
Control	0.256	0.005	104.325	100
FCH-TRIP.	0.146	0.005	60.877	58.35
FCH	0.075	0.005	32.833	31.47

APENDICE No. 3.

COMPOSICION DEL MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE.

Aminoácido:	Concentración en (mg/l)
L-arginina	84.0
L-cistina	62.57
L-glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-Histidina HCL.H O	42.0
L-Isoleucina	105.0
L-Leucina	105.0
L-Lisina.HCL	146.0
L-metionina	30.0
L-Fenilalanina	66.0
L-Serina	42.0
L-Treonina	95.0
L-Triptófano	16.0
L-Tirosina (sal Disodica)	104.6
L-valina	94.0
Vitaminas:	
D-Ca Pantotenato	4.0
Cloruro de Colina	4.0

Acido Folico	7.2
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal.HCl	4.0
Rivoflavina	0.4
Tiamina	4.0
Sales inorgánicas:	
Cloruro de Calcio Anhidro	200.0
Nitrato de Hierro III Monohidratado	0.1
Cloruro de Potasio	400.0
Sulfato de Magnesio Anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.0
Fosfato Monosódico Monohidratado	125.0
Otros compuestos:	
L-Glucosa	4500.0
Rojo Fenol	15.0

Nota: del medio preparado comercialmente (Gibco, U.S.A.) se diluyen 13.4 g/l, en agua bidestilada, se adicionan 3.4 g/l de bicarbonato de sodio, asimismo se agregan antibióticos: Penicilina G y Estreptomyciná a una concentración de 0.062 y 0.1gr/l respectivamente. Posteriormente se afora a un volumen de 1000 ml y se agita hasta disolver el polvo procurando no sobreagitar. El PH del medio se ajusta a 6.9 con ácido clorhídrico y se esteriliza por filtración, pasándolo a través de una membrana millipore con poros de 0.22 micras de diámetro. Finalmente el medio se almacena a 4 grados centigrados hasta el momento de su uso.

APENDICE No. 4.

PREPERACION DE REACTIVOS.

Solución de verseno:

A 800 ml de agua bidestilada, se le agregan las siguientes sustancias:

Tris base	3.04 gr.
Cloruro de Sodio.....	8 gr.
Cloruro de Potasio.....	0.40 gr.
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA).....	0.20 gr.

Posteriormente se agita y se afora a un litro, se ajusta el PH a 7.7 con ácido clorhídrico 10 normal y se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante veinte minutos.

Solución de tripsina:

Se prepara colocando 0.05 gr. de tripsina pancreática de tipo II cruda (marca Sigma), en 100 ml de verseno, se mezcla y se

filtra utilizando una membrana millipore con un poro de 0.22 micrómetros. Se recomienda colocarla en tubos pequeños y almacenarla a -4 grados centígrados para evitar su autodigestión.

Solución de Acido Fórmico:

Se añaden a 200 ml de agua bidestilada 3.96 gr. de hidróxido de sodio y 4.22 ml. de Acido Fórmico y se afora a 500 ml.

Cristal violeta:

A 100 ml. de Acido Fórmico se agrega 0.1 gr. de Cristal Violeta y se filtra en papel filtro de poro grueso, se recomienda almacenarlo en un frasco tapado a -4 grados centígrados, para evitar su contaminación.

Desactivación del suero fetal de bovino:

Se descongela el suero fetal de bovino (Microlab, México), a temperatura ambiente, posteriormente se pasa a baño maría a una temperatura de 57 grados centígrados durante 30 minutos, con el propósito de inactivar algunas proteínas, tales como proteínas del complemento, que pueden interferir en los ensayos.

APENDICE No. 5.

CALCULOS ESTADISTICOS

Muy a menudo en la práctica se encuentra que existe una relación entre dos o más variables, y se desea expresar esta relación en forma matemática.

Regresión lineal:

Es la relación entre dos variables, expresada mediante una ecuación matemática que conecta a las variables (X,Y).

$$\text{ejemplo; } Y = A_0 + A_1 X$$

Donde X es la variable independiente y Y la variable dependiente, de un número N de muestras.

Recta de mínimos cuadrados:

De todas las rectas de aproximación de un conjunto de puntos, de datos dados, la recta que tenga la propiedad de que la suma de N desviaciones al cuadrado es un mínimo; es la mejor recta de ajuste.

$$A_0 = \frac{(\text{suma de } Y) (\text{suma de } X^2) - (\text{suma de } X) (\text{suma } XY)}{N (\text{suma de } X^2) - (\text{suma de } X)^2}$$

$$A_1 = \frac{N (\text{suma de } XY) - (\text{suma de } X) (\text{suma de } Y)}{N (\text{suma de } X^2) - (\text{suma de } X)^2}$$

Donde A_0 es cte. y A_1 la ordenada al origen.

Error típico de la estima de Y sobre X:

Es una medida de la dispersión de los puntos de los datos con respecto a la recta de mínimos cuadrados.

$$S_{x,y}^2 = \frac{\text{suma de } Y^2 - A_0 (\text{suma de } Y) - A_1 (\text{suma de } XY)}{N}$$

Coefficiente de correlación:

Es una medida del grado en que la recta de regresión de mínimos cuadrados se ajusta a los datos muestrales. si la variación se explica totalmente por la recta de regresión, entonces, el coeficiente de correlación "r" tiende a uno.

$$r = \frac{+}{-} \sqrt{\frac{\text{suma de } (Y \text{ estimada} - Y \text{ media})^2}{\text{suma de } (Y - Y \text{ media})^2}}$$

L I T E R A T U R A C I T A D A .

- 1.- Charity W. (1981). The growth requirements of vertebrate cell In Vitro. Cambridge University press. New York. 542pp.
- 2.- Medrano. (1975). Células virus y cáncer. Ed Blume. España. pp. 13-39.
- 3.- Vaquero, C. (1982). Fundamentos de histología. Ed. Interamericana. España. pp. 91-109.
- 4.- Guyton A. C. (1987). Tratado de fisiología médica. 6a. ed. Ed. Interamericana. México. pp. 44-45.
- 5.- Wheeler. (1980). Histología funcional. Ed. JIMS. España. pp. 18-21, 39-41.
- 6.- De Robertis, M. D., Saez, Ph. D., De Robertis, Jr. M. (1977). Biología celular. Ed. Ateneo. 9a ed. Buenos Aires Argentina. pp. 388.
- 7.- Bruce, A., Bray, D., Watson, I.D., Lewis, J., Raff, M. and Roberts, K. (1983). Molecular biology of the cell. Ed. Garland Publishing, New York, pp.618.
- 8.- Norman, J. T., Kujubu, D. and Fine, L. G. (1989). Regulation of epithelial cell growth In Vitro. In: Funtional epithelial cells in culture. Alan R. Liss. Ed. New York. pp. 165-191.
- 9.- Nagao, T., Yamauchi, K., Komatsuda, M., Noguchi, K., Shimizu, M. Yonekura, S. and Nozaki, H. (1983). Inhibition of human bone marrow fibroblast colony formation by leukemic cells. Blood. 62:1261-1265.
- 10.- Lemaire, I. and Dubois, C. (1983). In vitro suppression of fibroblast growth inhibitory lymphokine production by asbestos. Clin. Exp. Immunol. 53:239-248.
- 11.- Iype, P.T. and McMahon, J.B. (1984). Hepatic proliferation inhibitor. Mol. Cell. Biochem. 59:57-80.
- 12.- Mordan, L.J. and Toback, F.B. (1984). Growth of kidney epithelial cells in culture: evidence for autocrine control. Am. J. Physiol. 246:C351-C354.
- 13.- Walsh-Reitz, M.M., Toback, F.G. and Holley, R.W. (1984). Cell growth and net Na⁺ flux are inhibited by a protein produced by kidney epithelial cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:793-796.
- 14.- Dohlman, J.G., Payan, D.G. and Goetzl, E.J. (1984). Generation of a unique fibroblast-activating factor by human monocytes. Immunology. 52:577-584.
- 15.- Gaffney, E.V., Tsai, S.C., Lingenfelter, S.E., Dell-Aquila, M.L. and Gonda, J.E. (1984). Stimulation of diploid fibroblast growth with serum-free medium conditioned by mezerein-treated monocytic leukemia cells. J7. Leukoc. Biol. 35:489-500.
- 16.- Harel, L., Chatelain, G. and Golde, A. (1984). Density-dependent inhibition of growth: inhibitory diffusible factors from 3T3- and Rous sarcoma virus (RSV) - transformed 3T3 cells. J. Cell. Physiol. 119:101-106.
- 17.- Hsu, Y.M., Barry, J.M. and Wang, J.L. (1984). Growth control in cultured 3T3 fibroblasts: neutralization and identification of a growth-inhibitory factor by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:2107-2111.
- 18.- Betsholtz, C. and Westermark, B. (1984). Growth factor-induced proliferation of human fibroblasts in serum-free

- culture depends on cell density and extracellular calcium concentration. *J. Cell. Physiol.* 118:203-210.
- 19.- Miyazaki K., Mashima, K., Yamashita, N., Yamashita, J. and Horio, T. (1985). Characterization of a growth-inhibiting protein present in rat serum that exerts a differential effect on in vitro growth of non malignant rat liver cells when compared with Rous sarcoma virus-transformed rat liver cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 21:62-66
 - 20.- Holley, R.W., Baldwin, J.N., Greenfield, S. and Armour, R. (1985). A growth regulatory factor that can both inhibit and stimulate growth. *Ciba Found Symp.* 116:241-252.
 - 21.- Fine, L.G., Holley, R.W., Nasri, H. and Badie-Dezfooly, B. BSC-1 growth inhibitor transforms a mitogenic stimulus into a hypertrophic stimulus for renal proximal tubular cells: relationship to Na⁺/H⁺ antiport activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:6163-6166.
 - 22.- Shipley, G.D., Tucker, R.F. and Moses, H.L. (1985). Type beta transforming growth factor/growth inhibitor stimulates entry of monolayers cultures of AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicative interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4147-4151.
 - 23.- Eckert, K., Lubbe, L., Schon, R. and Grosse, R. (1985). Demonstration of transforming growth factor activity in mammary epithelial tissues. *Biochem. Int.* 11:441-451.
 - 24.- Frater-Schroder, M., Muller, G., Birchmeier, W. and Bohlen, P. (1986). Transforming growth factor beta and fibroblast growth factor have opposite effects on the proliferation of endothelial cells. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 116:1160-1162.
 - 25.- Terzaghi-Howe, M. and McKeown, C. (1986). Inhibition of carcinogen-altered rat tracheal epithelial cells by normal epithelial cell-conditioned medium. *Cancer. Res.* 46:917-921.
 - 26.- Chiang, C.P. and Nilsen-Hamilton, M. (1986). Opposite and selective effects of epidermal growth factor and human platelet transforming growth factor-beta on the production of secreted proteins by murine 3T3 cells and human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261:10478-10481.
 - 27.- Huang, W., Kimura, T., Mashima, K., Miyazaki, K., Masaki, H., Yamashita, J. and Horio, T. (1986). Purification and properties of epithelial growth inhibitor (EGI) from human platelets: its separation from type beta transforming growth factor (TGF-Beta). *J. Biochem. Tokyo.* 100:687-696.
 - 28.- Huang, J.S., Huang, S.S. and Kuo, M.D. (1986). Bovine brain-derived growth factor. Purification and characterization of its interaction with responsive cells. *J. Biol. Chem.* 261:11600-11607.
 - 29.- Sharma, C.P. and Gehring, H. (1986). A low molecular weight growth inhibitor secreted in cultures of chicken embryo fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139:1243-1249.
 - 30.- Lemaire, I., Beaudoin, H. and Dubois, C. (1986). Cytokine regulation of lung fibroblast proliferation. Pulmonary and systemic changes in asbestos-induced pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:653-658.
 - 31.- Stein, G.H. and Atkins, L. (1986). Membrane-associated inhibitor of DNA synthesis in senescent human diploid fibroblasts: characterization and comparison to quiescent

- cell inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:9030-9034.
- 32.- Ohta, M., Greenberger, J.S., Anklesaria, P., Dassols, A. and Massague, J. (1987). Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. Nature. 329:539-541.
- 33.- Akagi, K., Murai, K., Haddada, H., Levine, A.S. and Patch, C.T. (1987). Mitogenic and antimitogenic transforming growth factors secreted by adenovirus 2- and simian virus 40-transformed hamster cells: possible roles in promoting tumorigenesis. Cancer Res. 47:4086-4092.
- 34.- Miyazaki, K., Mashima, K., Kimura, T., Huang, W., Yano, K., Ashida, Y., Kihira, Y., Yamashita, J. and Horio, T. (1987). Growth inhibitors in serum, platelets, and normal and malignant tissues. Adv. Enzyme. Regul. 26:225-237.
- 35.- Blat, C., Villaudy, J., Rouillard, D., Golde, A. and Harel, L. (1987). Modulation by the src oncogene of the effect of inhibitory diffusible factor IDF45. J. Cell. Physiol. 130:416-419.
- 36.- Huggett, A.C., Krutzsch, H.C. and Thorgeirsson, S.S. (1987). Characterization of a hepatic proliferation inhibitor (HPI): effect of HPI on the growth of normal liver cells-comparison with transforming growth factor beta. J. Cell. Biochem. 35:305-314.
- 37.- Mashima, K., Kimura, T., Miyazaki, K., Yamashita, J. and Horio, T. (1987). Growth inhibitory protein present in rabbit serum, which is more effective on tumorigenic rat liver epithelial cells than on non-tumorigenic ones: its species, and mode of existence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 148:1215-1222.
- 38.- Strayer, D.S. and Leibowitz, J.L. (1987). Inhibition of epidermal growth factor-induced cellular proliferation. Am. J. Pathol. 128:203-209.
- 39.- Bohmer, F.D., Sun, Q., Pepperle, M., Muller, T., Eriksson, U., Wang, J.L. and Grosse, R. (1987). Antibodies against mammary derived growth inhibitor (MDGI) react with a fibroblast growth inhibitor and with heart fatty acid binding protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 148:1425-1431.
- 40.- Feltham, N., Fahey, D. and Knight, E. Jr. (1987). A growth inhibitory protein secreted by human diploid fibroblasts. Partial purification and characterization. J. Biol. Chem. 262:2176-2179.
- 41.- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). The interferon. Proc. R. Soc. Lond. B. 147:258-267.
- 42.- Hauser, H. (1990). Interferons. In: Growth factors, differentiation factors, and cytokines. Habenicht, A. (Ed), pp.243-253.
- 43.- Sundstrom, S., Lundblad, D. and Lundgren, E. (1987). Interferon inhibits preferentially the synthesis of proteins associated with growth stimulation of Swiss 3T3 mouse fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta. 908:275-284.
- 44.- Keski-Oja, J., Raghoebar, R., Sawdey, M., Loskutoff, D.J., Postlethwaite, A.E., Kang, A.H. and Moses, H.L. (1988). Regulation of mRNAs for type-1 plasminogen activator inhibitor, fibronectin, and type I procollagen by

- transforming growth factor-beta. Divergent responses in lung fibroblast and carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 263:3111-3115.
- 45.- Arteaga, C.L., Tandon, A.K., Von-Hoff, D.D. and Osborne, C.K. (1988). Transforming growth factors beta: potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res.* 48:3898-3904.
 - 46.- Helseth, E., Unsgaard, G., Dalen, A. and Vik, R. (1988). The effect of type beta transforming growth factor on proliferation of clonogenic cells from human gliomas. *Acta Neurichir. Suppl. Wien.* 43:118-120.
 - 47.- Kimball, E.S., Fisher, M.C. and Persico, F.J. (1988). Potentiation of balb/3T3 fibroblast proliferative response by interleukin-1 and epidermal growth factor. *Cell. Immunol.* 113:341-349.
 - 48.- Spriggs, D.R., Imamura, K., Rodriguez, C., Sariban, E. and Kufe, D.W. (1988). Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J. Clin. Invest.* 81:455-460.
 - 49.- Rogalsky, V., Svet-Moldavsky, I., Arlin, Z., Dent, T. and Holland, J.F. (1988). Fibroblast growth inhibitor. *Biomed. Pharmacother.* 42:547-553.
 - 50.- Podolsky, D.K., Pleskow, D.K. and Jafari, H. (1988). Latent transformed growth inhibiting factor in human malignant effusions. *Cancer. Res.* 48:418-424.
 - 51.- Shirasuna, K., Morioka, S., Watatani, K., Hayashido, Y., Furusawa, H., Sugiyama, M., Okura, M. and Matsuya, T. (1988). Growth inhibition and differentiation of human salivary adenocarcinoma cells by medium conditioned with normal human fibroblasts. *Cancer. Res.* 48:2819-2824.
 - 52.- Walsh-Reitz, M.M., Feldman, R.I. and Toback, F.G. (1988). Aberrant responses to growth-regulatory signals by variant kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 254:F747-F753.
 - 53.- Noda, M. and Vogel, R. (1989). Fibroblast growth factor enhances type beta 1 transforming growth factor gene expression in osteoblast-like cells. *J. Cell. Biol.* 109:2529-2535.
 - 54.- Sharma, A. and Dahiva, R. (1989). Basic fibroblast growth factor does not initiate mitogenic signalling via phosphoinositide hydrolysis in PC12 cells. *Indian. J. Exp. Biol.* 27:593-597.
 - 55.- Presta, M., Maier, J.A., Rusnati, M. and Ragnotti, G. (1989). Basic fibroblast growth factor: production, mitogenic response, and post-receptor signal transduction in cultured normal and transformed fetal bovine aortic endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 141:517-526.
 - 56.- Presta, M., Maier, J.A. and Ragnotti, G. (1989). The mitogenic signaling pathway but not the plasminogen activator-inducing pathway of basic fibroblast growth factor is mediated through protein kinase C in fetal bovine aortic endothelial cells. *J. Cell. Biol.* 109:1877-1884.
 - 57.- Bernard, J.A., Beauchamp, R.D., Coffey, R.J. and Moses, H.L. (1989). Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:1578-1582.
 - 58.- Plouet, J. and Gospodarowicz, D. (1989). Transforming growth

- factor beta-1 positively modulates the bioactivity of fibroblast growth factor on corneal endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 141:393-399.
- 59.- McPherson, J.M., Sawamura, S.J., Ogawa, Y., Dineley, K., Carrillo, P. and Piez, K.A. (1989). The growth inhibitor of African green monkey (BSC-1) cells is transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Biochemistry.* 28:3442-7.
 - 60.- Wong, V.L., Rieman, D.J., Aronson, L., Dalton, B.J., Greig, R. and Anzano, M.A. (1989). Growth-inhibitory activity of interferon-beta against human colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 43:526-530.
 - 61.- Blat, C., Delbe, J., Villaudy, J., Chatelain, G., Golde, A. and Harel, L. (1989). Inhibitory diffusible factor 45 bifunctional activity. As a cell growth inhibitor and as an insulin-like growth factor I-binding protein. *J. Biol. Chem.* 264:12449-12454.
 - 62.- Chapekar, M.S., Huggett, A.C. and Thorgeirsson, S.S. (1989). Growth modulatory effects of a liver-derived growth inhibitor, transforming growth factor beta 1, and recombinant tumor necrosis factor alpha, in normal and neoplastic cells. *Exp. Cell. Res.* 185:247-257.
 - 63.- Lehmann, W., Widmaier, R. and Langen, P. (1989). Response of different mammary epithelial cell lines to a mammary derived growth inhibitor (MDGI). *Biomed. Biochim. Acta.* 48:143-151.
 - 64.- Muller, T., Kurtz, A., Vogel, F., Breter, H., Schneider, F., Angstrom, U., Mieth, M., Bohmer, F.D. and Grosse, R. (1989). A mammary-derived growth inhibitor (MDGI) related 70 KDa antigen identified in nuclei of mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 138:415-423.
 - 65.- Huggett, A.C., Ford, C.P. and Thorgeirsson, S.S. (1989). Effects of interleukin-6 on the growth of normal and transformed rat liver cells in culture. *Growth-Factors.* 2:83-89.
 - 66.- Dean, N.M., Kanemitsu, M. and Boynton, A.L. Effects of the tyrosine-Kinase inhibitor genistein on DNA synthesis and phospholipid-derived second messenger generation in mouse 10T1/2 fibroblasts and rat liver T51B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:795-801.
 - 67.- Terzaghi-Howe, M. (1989). Inhibitor production by normal rat tracheal epithelial cells influences the frequency of spontaneous and X-ray-induced enhanced growth variants. *Carcinogenesis.* 10:967-971.
 - 68.- Skraastad, O. and Reichelt, K.L. (1989). An endogenous colon mitosis inhibitor reduces the increased cell proliferation in colonic epithelium induced by dietary cholic acid and treatment with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis.* 10:79-82.
 - 69.- Baud, L., Prez, J., Chergui, G., Cragoe, E.J. Jr. and Ardailou, R. (1989). Leukotriene D4-induced proliferation of glomerular epithelial cells: PKC and Na⁺-H⁺ exchanger-mediated response. *Am. J. Physiol.* 257:C232-C239.
 - 70.- Braun, L., Gruppuso, P., Mikumo, R. and Fausto, N. (1991). Transforming growth factor beta 1 in liver carcinogenesis: messenger RNA expression and growth effects. *Cell. Growth.*

Differ. 1:103-111.

- 71.- Howe, P.H., Draetta, G. and Leof, E.B. (1991). Transformin growth factor beta 1 inhibition of p34cdc2 phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest. *Mol. Cell. Biol.* 11:1185-1194.
- 72.- Hiti, A.L., Rideout, W.M., Laug, W.E., and Jones, P.A. (1990). Plasminogen activator regulation by transforming growth factor-beta in normal and neoplastic human urothelium. *Cancer. Commun.* 2:123-128.
- 73.- Pontbriant, C.M., Chen, J.K. and Orlando, J.A. (1990). TGF-beta inhibits the platelet-derived growth factor-induced formation of inositol trisphosphate in MG-63 human osteosarcoma cells. *J. Cell. Physiol.* 145:488-495.
- 74.- Kallery, J., Kovacs, E.J., Nicholson, K. and Fasibisiak, J.P. (1991). transforming growth factor-beta production by lung macrophages and fibroblasts. *Chest.* 99:S85-S86.
- 75.- Ethier, S.P. and Van-de-Velde, R.M. (1990). Secretion of a TGF-beta-like growth inhibitor by normal rat mammary epithelial cells *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* 142:15-20.
- 76.- Watkins, L.F. and Levine, A.E. (1991). Differential role of transforming growth factor-alpha in two human colon-carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 47:455-460.
- 77.- Ferriola, P.C., Earp, H.S., Diaugustine, R. and Nettesheim, P. (1991). Role of TGF alpha and its receptor in proliferation of immortalized rat tracheal epithelial cells - studies with tryptostin and TGF alpha antisera. *J. Cell. Physiol.* 147:166-175.
- 78.- Vlodavsky, I., Korner, G., Ishai-Michaeli, R., Bashkin, P., Bar-Shavit, R. and Fuks, Z. (1990). Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer. Metastasis. Rev.* 9:203-226.
- 79.- Adnane, J., Gaudray, P., Dionne, C.A., Crumley, G., Jaye, M., Schlessinger, J., Jeanteur, P., Birnbaum, D. and Theillet, C. (1991). BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene.* 6:659-663.
- 80.- Clementlacroix, P., Friteau, L. and Damais, C. (1991). Activation of human dermal fibroblasts by fibroblast growth factors (FGFs) and/or interleukin-1-beta (IL-1 beta). *Lymphokine and Cytokine Research.* 10:111-114.
- 81.- Yallon, A. and Klagsbrun, M. (1990). Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer and Metastasis Reviews.* 9:191-202.
- 82.- Wilson, E.L., Rifkin, D.B., Kelly, F., Hannocks, M.J. and Gabrilove, J.L. (1991). Basic fibroblast growth factor stimulates myelopoiesis in long-term human bone marrow cultures. *Blood.* 77:954-960.
- 83.- Westermann, R., Grothe, C. and Unsicker, K. (1990). Basic fibroblast growth factor (bFGF), a multifunctional growth factor for neuroectodermal cells. *J. Cell Science.* 6:97-117.
- 84.- Okutani, T., Nishi, N., Kagawa, Y., Takasuga, H., Usui, T. and Wada, F. (1991). Role of cyclic AMP and polypeptide growth regulators in growth inhibition by interferon in PC-3

Cells. Prostate. 18:73-80.

- 85.- Hamburger, A.W. and Pinnamaneni, G.D. (1991). Increased epidermal growth factor receptor gene expression by gamma-interferon in human breast carcinoma cell line. *British J. Cancer.* 64:64-68.
- 86.- Rodriguez, G.C., Berchuck, A., Whitaker, R.S., Schlossman, D. and Clarkepearson, D.L. (1991). Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. 2. Relationship between receptor expression and response to epidermal growth factor. *American J. Obstetrics and Gynecology.* 164:745-750.
- 87.- Kilian, P.L., Kafkka, K.L., Biondi, D.A., Lipman, J.M., Benjamin, W.R., Feldman, D. and Campen, C.A. (1991). Antiproliferative effect of interleukin-1 on human ovarian carcinoma cell line (NH:OVCAR-3). *Cancer Research.* 51:1823-1828.
- 88.- Rannekar, V.V., Waheed, S., Davises, T.J., Toback, F.G. and Rangnekar, V.M. (1991). Antimitogenic and mitogenic actions of interleukin-1 in diverse cell types are associated with induction of gro gene expression. *J. Biological Chemistry* 266:2415-2422.
- 89.- Djakiew, D., Delsite, R., Pflug, B., Wrathall, J., Lynch, J.H. and Onoda, M. (1991). Regulation of growth by a nerve growth factor-like protein which modulates paracrine interactions between a neoplastic epithelial cell line and stromal cells of the human prostate. *Cancer Research.* 51:3304-3310.
- 90.- Giorgino, F., Belfiore, A., Milazzo, G., Costantino, A., Maddux, B., Whittaker, J., Golfine, I.D. and Vigneri, R. (1991). Overexpression of insulin receptors in fibroblast and ovary cells induces a ligand-mediated transformed phenotype. *Molecular Endocrinology.* 5:452-459.
- 91.- Osteen, K.G. and Anderson, T.L. (1991). Effect of estrogen on human endometrial epithelial cell growth and differentiation *in vitro*. *Steroids.* 56:279-283.
- 92.- Douzinas, E., Lavagna, C., Nano, J.L. and Rampal, P. (1990). Effects of an inhibitor isolated from human small intestine on organ culture of intestinal mucosa. *Digestion.* 46:170-176.
- 93.- Shoji, S., Rickard, K.A., Takizawa, H., Ertl, R.F., Linder, J. and Rennard, S.I. Lung fibroblast produce growth stimulatory activity for bronchial epithelial cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:433-439.
- 94.- Talarico, D. and Basilico, C. (1991). The k-fgf/hst oncogene induces transformation through an autocrine mechanism that requires extracellular stimulation of the mitogenic pathway. *Molecular and Cellular Biology.* 11:1138-1145.
- 95.- Basolo, F., Elliot, J., Tait, L., Chen, X.Q., Maloney, T., Russo, I.H., Pauley, R., Momiki, S., Caamano, J., Kleinszanto, A.J.P., Koszalka, M. and Russo, J. (1991). Transformation of human breast epithelial cells by c-Ha-ras oncogene. 4:25-35.
- 96.- Scully, J.L. and Edwards, P.A.W. (1991). Transformation of a mammary epithelial cell line by the v-raf and v-mos oncogenes. *International J. Cancer.* 48:128-135.

- 97.- Blanton, R.A., Perezreyes, N., Merrick, D.T. and McDougall, J.K. (1991). Epithelial cell immortalized by human Papillomaviruses have premalignant characteristics in organotypic culture. *Am. J. Pathology*. 138:673-685.
- 98.- Tsuyama, N., Miura, M., Kitahira, M., Ishibashi, S. and Ide, T. (1991). SV40 T-antigen is required for maintenance of immortal growth in SV40-transformed human fibroblasts. *Cell Structure and function*. 16:55-62.
- 99.- Delaunoit, Y., Dauvois, S., Dufour, M., Simard, J. and Labrie, F. (1991). Inhibition of cell cycle kinetics and proliferation by the androgen 5 alpha-butyl-N-methyl-11-(16-alpha-chloro-3',17 beta-Dihydroxy-Estra-1,3,5-(10) Triene-7' alpha-y1) Undecanamide in human breast cancer ZR-75-1 cells. *Cancer Research*. 51:2797-2802.
- 100.- Shayman, J.A., Deshmukh, G.D., Mahdiyoun, S., Thomas, T.P., Wu, D., Barcelon, F.S. and Radin, N.S. (1991). Modulation of renal epithelial cell growth by glucosylceramide. Association with protein kinase C, sphingosine, and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 266:22968-22974.
- 101.- Weiss, R.H. and Nuccitelli, R. (1992). Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents thrombin-induced mitogenesis, but not intracellular free calcium release, in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 267:5608-5613.
- 102.- Fafeur, V., Jiang, Z.P. and Bohlen, P. (1991). Signal transduction by bFGF, but not TGF beta 1, involves arachidonic acid metabolism in endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 149:277-283.
- 103.- Presta, M., Tiberio, L., Rusnati, M., Dell'Era, P. and Ragnotti, G. (1991). Basic fibroblast growth factor requires a long-lasting activation of protein kinase C to induce cell proliferation in transformed fetal bovine aortic endothelial cells. *Cell. Regul.* 2:719-726.
- 104.- Bird, T.A., Sleath, P.R., DeRoos, P.C., Dower, S.K. and Virca, G.D. (1991). Interleukin-1 represents a new modality for the activation of extracellular signal-regulated kinases/microtubule-associated protein-2 kinases. *J. Biol. Chem.* 266:22661-22670.
- 105.- Hannocks, M.J., Oliver, L., Gabrilove, J.L. and Wilson, E.L. (1992). Regulation of proteolytic activity in human bone marrow stromal cell by basic fibroblast growth factor, Interleukin-1, and transforming growth factor beta. *Blood*. 79:1178-1184.
- 106.- Besner, G.E. and Klagsbrun, M. (1991). Macrophages secrete a heparin-binding inhibitor of endothelial cell growth. *Microvasc. Res.* 42:187-197.
- 107.- Ham, A. W. (1970). *Tratado de histologia*. Ed. Interamericana 6a ed. México. pp. 59.
- 108.- Bishop, J. M. (1987). *The molecular genetic of cancer*. Science 235:305-311.
- 109.- Nicolson, G. H. (1979). *Metastasis cancerosas*. Investigación y ciencia. 32:22.
- 110.- Stoker, M., G. (1973). Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. *Nature*. 246:200-203.
- 111.- Pierce, G.B., Shikes, R. and Fink, L.M. (1978). *Cancer: A*

- problem of developmental biology. Ed. Englewood Cliffs. N. Jersey.
- 112.- Medrano, E.E. and Pardee, A.B. (1980). Prevalent deficiency in tumor cells of cycloheximide-induced cycle arrest. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:4123-4126.
 - 113.- Ponten, J. (1976). The relationship between in vitro transformation and tumor formation in vivo. Biochem. Biophys. Acta. 458:397-422.
 - 114.- Abelson, J. (1979). RNA procession and the intervening sequence problem. Annu. Rev. Biochem. 48:1035-1069.
 - 115.- Barendsen, G.W., Janse, H.C., Deys, B.F. and Hollander, C.F. (1977). Comparison of growth characteristics of experimental tumors and derived cell cultures. Cell. Tissue. Kinet. 10:469-475.
 - 116.- Hunter, T. (1980). Proteins Phosphotylyated by the RSV transforming function. Cell. 22:647-648.
 - 117.- Dustin, P. (1980). Microtubules. Sci. Amer. 243:59-69.
 - 118.- Byers, B. and Porter, K.R. (1964). Oriented microtubules in elongating cells of the developing lens rudiment after induction. Proc. Natl. Acad. Sci. 52:1091-1099.
 - 119.- Stern, P. (1991). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. From: Paterson Symposium No. 26. 28-30 th October 1991. Manchester, England. pp 57.
 - 120.- Figueroa, S. J. F., Arias B. O. (1992). Carcinoma cérvico uterino etapas IB IIB IIB, tratado con radioterapia externa (acelarador lineal) mAs fuentes radioactivas de alta actividad intracavitarias. Cancerologia. 38:1565.
 - 121.- Stern, P. (1991). Human papillomaviruses and cervical cancer. From: Paterson symposium. 28-30 th october. Manchester, England.
 - 122.- Rommery, S.L., et.al. (1980). Gynecology and Obstetrics: The Healt Care of Women. 2a. Mc.Graw-Hill. pp 203.
 - 123.- Krupp, M.A. and Chatton, M.J. (1982). Diagnóstico Clínico y Tratamiento. 17a. Ed. El manual Moderno, S.A. 1324 pp.
 - 124.- Thorn, G.W., Adams, R.D., et.al. (1979). Medicina Interna de Harrison. 5a. Ed. La Prensa Médica Mexicana S.A. 2499 pp.
 - 125.- Slattery, M.L., Robinson, L.M., Schuman, K.L., et.al. (1989). Cigarette smoking and exposure to passive smoke are risk factors for cervical cancer. JAMA. 261:1593.
 - 126.- Vessey, M.P., Lawless, M., McPherson, K. and Yeates, D. (1983). Neoplasia of the cervix uteri and contraception: a possible adverse effect of the pill. Lancet. II. pp 930.
 - 127.- Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptive. (1985). Invasive cervical cancer and combined oral contraceptives. Brit. Med. J. 290:961
 - 128.- Brinton, A.L., Huggins, G.R., Lehman, H.F., Mallin, K., Savitz, D.A., Trapido, E., Rosenthal, J. and Hoover, R. (1986). Long-term use of oral contraceptives and risk of invasive cervical cancer. Int. J. Cancer. 38:339.
 - 129.- McNab, J. (1991). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. From: Paterson Symposium No. 26. 28-30th October, 1991. Manchester, England. pp 103.
 - 130.- Rulison, R.H. (1942). Spontaneous regression of human papillomas. Arch. Dermatol. Syphilol. 46:66.
 - 131.- Massing, A.M. and Epstein, W.L. (1963). Study of human

- papilloma virus lesions. Arch. Dermatol. 87:306.
- 132.- Peto, R. and Zur Hausen, H. (1986). Viral Etiology of cervical cancer. 21, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp 321.
 - 133.- Jenson, A.B. and Lancaster, W.D. (1990). Association of human papillomavirus with benign, premalignant, and malignant anogenital lesions. In: H. Pfister (ed), Papillomaviruses and human cancer, CRC Press, Boca Raton. pp 11.
 - 134.- Reeves, W.C., Caussy, D., Briton, L.A. and Rawes, W.E. (1987). Case-control study of human papillomaviruses and cervical cancer in Latin America. Int. J. Cancer. 40:450.
 - 135.- Tak, W., Munzenrider, J. and Mitchell, G. (1979). External irradiation and one radium application for carcinoma of the cervix. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 5:29.
 - 136.- Gomez, G., Fuentes, F., Guadarrama, F. y Mota, G. (1991). Estudio comparativo de dos diferentes técnicas de radioterapia utilizadas para el tratamiento de cáncer cérvico uterino en el Instituto Nacional de Cancerología. Cancerología 37:1239.
 - 137.- Kueng, W., Silber, E. and Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. Analytical Biochemistry. 182:16-19.

A G R A D E C I M I E N T O S .

Mi agradecimiento a la Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Zaragoza", en especial al Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer por las facilidades otorgadas en el desarrollo de mi tesis.

Al personal del Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer por su colaboración y amistad.

A Paty por su incondicional colaboración.

Y muy en especial al biólogo Luis Sánchez Sánchez por sus consejos y apoyo brindado en todo momento.