

03762



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DEL EFECTO INHIBIDOR A LA PROLIFERACION PRESENTE EN LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE CULTIVOS CONFLUENTES DE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES HUMANAS NORMALES: CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y EVALUACION DE SU CAPACIDAD INHIBIDORA EN CELULAS DERIVADAS DE CANCER CERVICO-UTERINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A : LUIS SANCHEZ SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCON

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

MARCO TEORICO

El cultivo de tejidos *in vitro* es una técnica que 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, así como los mecanismos de acción por los cuales tales factores actúan.

Es por ello que el análisis de los procesos celulares *in vitro*, requiere del uso de sistemas que estén estructurados de una manera simple, pero que puedan reproducir los complejos procesos que involucra la regulación del metabolismo de la célula.

Uno de los procesos metabólicos más estudiados es la división celular, debido a la importancia que representa este mecanismo para la organización estructural y funcional de los seres vivos. 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 medios de cultivo, existen ciertos tipos celulares de los cuales aún se desconocen las condiciones precisas que permitan mantenerlos por largos períodos de tiempo o inclusive crecerlos de manera uniforme *in vitro*.

Aún no se han precisado las condiciones de cultivo para los epitelios; no obstante, estas células son cultivadas en condiciones específicas dependiendo del órgano del cual fueron obtenidos (2). La importancia de los epitelios radica en su papel multifuncional dentro del organismo: 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 hematopoyéticas, sirven como barrera de protección contra agentes extraños etc. Para realizar dichas funciones, las células epiteliales forman tejidos con una disposición celular diferente, que les permite además una funcionalidad específica (3).

Las células epiteliales poseen características altamente diferenciadas y funcionales, que les confieren cierta diversidad que da origen a la formación de diferentes tipos de tejido epitelial con rasgos específicos. 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 la retención de la capacidad de proliferar en respuesta a un daño tisular, a un factor específico que estimule la proliferación celular etc., 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

similares a la de los epitelios; ambas son adherentes, presentan una inhibición de la proliferación por contacto, intervienen en los procesos metabólicos en los que están implicadas las células epiteliales etc. Tales 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 al tejido conjuntivo. 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, 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. La matriz desempeña un papel de soporte para otras células, entre las cuales están las células epiteliales, y permite la difusión de sustancias secretadas por los diferentes tipos celulares que radican en el tejido, estableciendo una comunicación celular de tipo paracrino y autócrino.

La funcionalidad de ambas estirpes celulares (epiteliales y fibroblásticas), se relaciona de forma directa a su capacidad de proliferación y a el 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 el 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, lo cual da como consecuencia 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, las cuales crecen y se dividen en un ciclo continuo. 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.

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 los extremos de proliferación anteriormente comparados, las células del hígado, no presentan mitosis de manera normal en los organismos adultos, no obstante,

retienen la capacidad de entrar en mitosis si las condiciones 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. Por tal razón, la división celular es de 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 visible al microscopio; 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 así 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 imperceptible durante la fase de crecimiento del ciclo celular, que recibe el nombre de interfase. Ya que una célula pasa la mayor parte de su vida en interfase, y sólo períodos ocasionales en la fase de división celular.

La mayoría de los componentes celulares se forman continuamente a lo largo de todo el período interfásico, entre dos divisiones celulares. Por ello resulta difícil de establecer fases estrictas en la progresión de la célula en crecimiento durante la interfase. 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 incluye la división nuclear (mitosis) y la división citoplásmica (citocinesis) que se produce a continuación. Toda la fase de división celular recibe el nombre de fase M (M= Mitótica). Quedan por lo tanto el período comprendido entre la fase M y el comienzo de la síntesis de ADN, que 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 que recibe el nombre de fase G₂. Por consiguiente, la interfase está compuesta por sucesivas fases G₁, S y G₂, y normalmente abarca un 90% o más del tiempo total del ciclo celular. Por ejemplo, en las células eucariotas superiores que se dividen rápidamente, las divisiones celulares (fase M) sucesivas que interrumpen la interfase se producen únicamente cada 16-24 horas, y cada fase M sólo dura 1 ó 2 horas. Un ciclo celular típico con sus cuatro fases sucesivas, se ilustra en la figura 1.

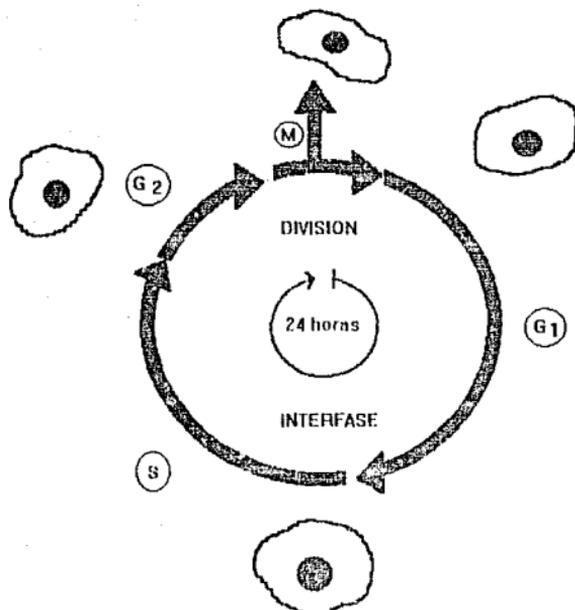


Fig.1 Las cuatro fases sucesivas del ciclo celular. Después de la fase M, que consiste en la división nuclear (mitosis) y la división citoplásmica (citocinesis), las células hijas inician la interfase de un nuevo ciclo. La interfase comienza con la fase G1 en la que las células, cuyas actividades biosintéticas 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 "cromátidas hermanas" idénticas). La célula pasa entonces a la fase G2, que termina cuando empieza la mitosis. La fase M comienza con la mitosis (de ahí la "M") y termina con la citocinesis. Durante la primera parte de la fase M, los cromosomas replicados se condensan desde su estado interfásico 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 cromátidas hermanas cuando se divide el contenido nuclear. Se forman dos nuevas envolturas nucleares, y el citoplasma se divide generando dos células hijas, cada una con un sólo núcleo. El proceso de citocinesis termina la fase M y marca el comienzo de la interfase del ciclo celular siguiente.

En los organismos unicelulares, tales como las bacterias y los protozoarios, existe una intensa presión de selección para que cada célula individual crezca y se desarrolle lo más rápidamente posible. Por tal 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 distinta, los diferentes tipos celulares han perdido, en diversos grados, su capacidad de división rápida, de modo que su número pueda mantener el nivel que resulte óptimo para el organismo en conjunto: lo principal es la supervivencia del organismo, no la supervivencia de cualquiera de sus células individuales. Como consecuencia, las 10^{13} células del cuerpo humano se dividen a diferentes velocidades. Algunas células como las neuronas, las fibras del músculo esquelético y los eritrocitos, no se dividen en absoluto después de diferenciarse. 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. El ciclo de crecimiento y división de algunas células es tan sólo de ocho horas. Sin embargo, el comportamiento de la mayoría de las células animales se encuentra entre estos dos límites: aunque pueden dividirse sólo lo hacen raramente. Los tiempos observados del ciclo celular (denominados también tiempos de generación) oscilan entre las 8 horas y los 100 días o más.

La principal diferencia entre las células que se dividen rápidamente y las que se dividen con lentitud reside en el período 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 proliferando en cultivo, ya que su medio ambiente 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 protéicos básicos de crecimiento, añadiendo concentraciones bajas de inhibidores de la síntesis protéica, o permitiendo que las células lleguen a ser demasiado numerosas. En cualquiera de estos casos, el ciclo celular se detiene en la fase G1. Este hecho implica que, una vez superada la fase G1, la célula completa las fases S, G2 y M. 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 pasado dicho punto, las células completarán el resto del ciclo a su velocidad normal, independientemente de las condiciones externas (6).

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 estimulador o inhibidor de tal mecanismo. Dentro de la gama de factores reportados se citan 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 (7).

Los factores reguladores del crecimiento, definidos como polipéptidos que estimulan o inhiben la proliferación celular en cultivo y probablemente también para las células *in vivo*, son generalmente glicoproteínas de bajo peso molecular que se encuentran interactuando con la membrana celular, sitio donde se unen a sus receptores.

Dentro de los factores que regulan la proliferación celular, existen dos grupos, los que presentan una actividad reguladora positiva y los que presentan una actividad reguladora negativa. Con base en el hecho de que existe una fuerte interrelación entre los fibroblastos y las células epiteliales, y debido a la participación directa de ambas estirpes en la regulación del mecanismo de la división celular y ya que son los dos tipos celulares implicados en el cáncer cérvico uterino (CaCu), se describen en particular los factores que intervienen en el mecanismo regulador de la división celular de estas dos estirpes celulares.

En la década de los 80s, el estudio de factores estimuladores e inhibidores de la división celular, presentó gran auge, dando como consecuencia el reporte de diversos factores con tal actividad. En 1983, Nagao y colaboradores reportan un factor inhibidor para la formación de fibroblastos humanos de médula ósea, producido por células leucémicas (8); mientras que en ese mismo año, Lemaire y Dubois encuentran que los leucocitos mononucleares de sangre periférica estimulados con concanavalina A (Con A) o Fitoheماغlutinina (PHA) producen un factor soluble que inhibe la síntesis de DNA y el crecimiento de fibroblastos de pulmón, referido como Factor Inhibidor del Crecimiento de Fibroblastos (FGIF: por sus siglas en inglés Fibroblast Growth Inhibitory Factor) (9).

Destacando el trabajo del grupo de Iype y McMahon quienes reportaron un inhibidor de la proliferación hepática, de naturaleza protéica y con un peso molecular de 26,000 daltons (d), con un punto isoelectrico de 4.65, el cual inhibe específicamente la división celular y la síntesis de ADN en células epiteliales normales de hígado de rata y no presenta efecto sobre células transformadas de hígado o células de hepatomas en cultivo (10). Ya en tales trabajos se observa que la inhibición de la proliferación es regulada de manera parácrina así como autócrina. De manera similar, Mordan y Toback, aportan evidencias para el control autócrino del

crecimiento de células epiteliales de riñón, trabajando con la línea epitelial de riñón BSC-1 y apoyando la hipótesis que establece que productos autócrinos con efecto opuesto sobre el crecimiento pueden regular la proliferación de células epiteliales renales (11). 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 ser mediado en parte por una proteína celular secretada de manera autócrina (12).

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. Los monocitos secretan al medio de cultivo cuando son estimulados con PHA un factor denominado **Factor de Activación de Fibroblastos-producido 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 (13); 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 (14). Esto sugiere que la regulación parácrina de la proliferación de fibroblastos puede ser regulada tanto de manera positiva como negativa.

Estudios llevados a cabo por Harel y col., en la línea celular normal de fibroblastos de pulmón de ratón denominada 3T3, la cual presenta como característica primordial una inhibición de la proliferación por densidad, establecen que tal inhibición está relacionada con la secreción de un factor protéico de 40,000d denominado **Factor Difusible Inhibidor de células Normales (IDFN:** del inglés **Inhibitory Diffusible Factor Normal**) (15). Estudios paralelos sobre la misma línea realizados por Hsu y col., purifican del medio condicionado de células 3T3 normales en fase de confluencia un inhibidor de la proliferación con acción autócrina, con un peso molecular de 13,000d denominado **FGR-B** (del inglés: **Regulator Growth Factor**), cuya actividad es inhibida por anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente al factor purificado, demostrando que porta la actividad inhibidora de la proliferación para las células antes referidas (16). Por otro lado, Betsholtz y Westermarck, muestran que la proliferación de fibroblastos de neonato humano inducida por el **Factor de Crecimiento Epidermal (EGF)** y el **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 (17).

En el año de 1985, ya no sólo se encuentra una actividad inhibidora de la proliferación de fibroblastos y células epiteliales en los medios condicionados, sino que además se presenta en suero de rata, ratón y conejo. La caracterización del factor que presenta la actividad inhibidora en el suero de rata, revela que se trata de un **factor protéico**

libre de lípidos con un peso molecular de 220,000d, cuyo efecto es observado en células epiteliales de hígado de rata bufalo (BRL) no transformadas, mientras que las mismas células transformadas con el virus del sarcoma de Rous son insensibles al inhibidor (18). En el mismo año, Sladen y col. reportan la presencia de una actividad inhibidora en sueros de dos pacientes que han presentado falsas aneurismas repetidas, seromas e injertos no adecuados después de 18 meses de haberles realizado un injerto aortobifemoral, estableciendo la presencia de tal actividad inhibidora con relación a una respuesta inmune o proceso inflamatorio ocasionado por el rechazo del injerto (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. El inhibidor es secretado al medio de cultivo y presenta un peso molecular de 24,000 d, muy activo con las mismas células pero no con otras, 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 el factor denominado inhibidor del crecimiento (GI del inglés: Growth inhibitor), estimula o inhibe el crecimiento dependiendo del tipo y características de las células y las condiciones del crecimiento (20). El mismo grupo de investigadores estableció que el IG transforma un estímulo mitogénico a un estímulo hipertrófico para células tubulares proximales renales, con relación a la actividad antiporte de Na^+/H^+ (21).

El análisis de algunos de los factores anteriormente mencionados, reveló que algunos de ellos presentaban características similares o idénticas, concluyendo que se trata de un sólo factor. Uno de estos casos es el Factor de Crecimiento Transformante tipo beta (TGF-beta del inglés: Transforming Growth Factor-beta) el cual anteriormente era referido como factor de inhibición de la diferenciación (DIF: del inglés Differentiation-inhibiting factor), inhibidor del crecimiento de células BSC-1 (GI: del inglés growth inhibitor), etc. El estudio sobre dicho factor fue de mucho interés, desarrollando trabajos sobre su mecanismo de acción. Shipley y col., 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 seguían reportándose, como el que describe Eckert, Lubbe, Schon y Grosse quienes mostraron que el TGF y un inhibidor del crecimiento de células epiteliales mamarias coexisten en glándulas mamarias bovinas como factores de crecimiento separados (23).

El TGF-B ha sido ampliamente estudiado, se ha reportado un efecto antagónico comparado 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 ha asociado al factor inhibidor de la proliferación de células epiteliales de tráquea alteradas con carcinógenos, producido por células epiteliales de tráquea normal en cultivo, secretado al medio de manera óptima en

la tercera-cuarta semana, cuyas propiedades bioquímicas son similares a las del TGF-B (25); además, se encontró que junto con el EGF ejerce un efecto opuesto y selectivo sobre la producción de proteínas secretadas por las células 3T3 murinas y por fibroblastos humanos (26). Se han reportado otros factores inhibidores diferentes, tal es el caso del **Inhibidor de Crecimiento Epidermal (EGI)** obtenido de plaquetas humanas, una proteína que es capaz de inhibir el crecimiento de células no malignas de epitelio derivado de hígado de rata bufalo (BRL). El EGI es específico para células epiteliales, durante su purificación, el EGI fue separado del TGF-beta, en cuyo caso particular estimula a las células fibroblásticas de riñón de rata bufalo (NRK) en agar, en presencia del factor de crecimiento epidermal (EGF). El EGI purificado mostró un peso molecular de 27,000 d, compuesto de dos subunidades de peso idéntico, y resultó ser estable al calor a 90°C por 3 minutos, pero sensible a ditiotreitól, 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, presentando un punto isoeléctrico de 5.7 en ambos 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: peso molecular menor de 2,000d, resistente a proteasas y ácidos y estable al calor (29). 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 inhibidor 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). De los factores reportados, todos ellos son producidos y secretados por las células, sin embargo, Stein y Atkins caracterizaron un inhibidor de la síntesis de DNA asociado a membrana de células de fibroblastos diploides humanos senescentes, cuyas características bioquímicas son sensibilidad a tripsina, calor y periodato, sugiriendo que se trata de una glicoproteína (31).

La investigación de los factores inhibidores para 1987, consistió en estudios más profundos de factores ya establecidos, como es el caso del TGF así como el descubrimiento de otros.

En el caso del TGF, en este año se reportó 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 probados en células epiteliales. Sin embargo el TGF-B1, presenta

una gran actividad inhibidora de la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas, mientras que para el TGF-B2 su actividad en tales células no es muy significativa (32); en otro estudio, se le asocia al TGF-Alfa en células transformadas con el virus Ad2 y SV40, que inducen la secreción de un factor similar al TGF-Alfa, el cual inhibe la unión del EGF a sus receptores. En el mismo trabajo se muestra que las células transformadas con el virus SV40 pero no las transformadas con el virus Ad2, secretan un poderoso inhibidor mitogénico (MI), que actúa sobre células transformadas y no transformadas de manera citostática, presenta un peso molecular de 24,000 d y difiere del TGF-B por ser lábil al calor y tener una especificidad blanco diferente para su actividad antimitogénica, además de inhibir la incorporación de timidina en linfocitos de bazo estimulados con CoA (33). El EGI previamente citado (27), por el mismo grupo de investigadores, reportó que los inhibidores podrían ser la causa predominante para la adquisición de tumorigenicidad, ya que encontraron que las células BRL presentan un 50% de inhibición en su proliferación cuando son expuestas a 20pg/ml del EGI, pero no cuando son transformadas con el virus RSV (34).

El factor difusible inhibidor (IDF) producido por la línea celular 3T3, (8), decrece la síntesis de ADN en fibroblastos de embrión de pollo así como su proliferación, sin embargo, cuando los fibroblastos son infectados por el virus Ny68 (un mutante del RSV), el IDF no inhibe su proliferación, sugiriendo que la expresión del oncogén en los fibroblastos, induce una disminución o pérdida en su sensibilidad al IDF, lo que podría explicar porque las células transformadas escapan al factor inhibitorio, apoyando la hipótesis de que los factores inhibidores podrían ser la causa predominante de tumorigenicidad al no ejercer su efecto sobre las células transformadas (34, 35).

Los reportes de investigadores en este año, también citaron el descubrimiento de nuevos factores, como el que reporta Huggett y col., quienes caracterizan un factor inhibidor de la proliferación hepática, obtenido de hígado de rata adulta, con una actividad inhibidora 1000 veces mayor que los previamente reportados, presenta un rango de peso molecular de 17-19 Kd y no es afectado al adicionar anticuerpos contra TGF-B (36). El reporte del grupo de Mashima y col., resultó de particular interés, ya que aislaron un factor del suero de conejo con actividad inhibidora de la proliferación, lo interesante del factor es que presenta mayor efecto anti-tumorigénico sobre células BRL transformadas por el virus RSV que sobre células BRL no transformadas, y sus propiedades son que no pasa a través de una membrana de 10K, sensible a tripsina y ditiotretitol y fue separado en dos especies con pI de 7.5 y 9.5 (37). La relación de los factores con los virus, presentó un campo nuevo en el estudio de la malignidad celular, y no sólo se asoció a la insensibilidad adquirida por las células normales al ser infectadas por virus oncogénicos, sino que también, los virus son capaces de codificar proteínas con actividad inhibidora de la actividad de factores de crecimiento, y que dicha inhibición ocurre en parte por la inhibición competitiva de la interacción

del receptor para el factor de crecimiento, con 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 inhibidor 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 tales inhibidores puedan definir una nueva familia de moléculas reguladoras del crecimiento (39). El grupo de Feltham, reporta un factor que inhibe el crecimiento de fibroblastos, derivado de los mismos (FDGI, del inglés: fibroblast derived growth inhibitor), cuyas características son: es secretado únicamente cuando los fibroblastos son estimulados con ácido poliribonucleosómico ó ácido poliribocitidílico, con un peso molecular de 12 Kd, inhibe el crecimiento de células fibroblásticas diploides humanas en cultivo, células derivadas de tumores y células L derivadas de ratón (40). Un factor que en un principio fue conocido por su capacidad para permitir que las células resistieran un crecimiento viral, denominado interferón (INP) (41), y que es considerado como una parte importante en el sistema de defensa de los vertebrados, presenta otras funciones además de la acción antiviral, ya que juega un papel fisiológico en la regulación de la respuesta inmune por interacción con células del sistema inmune así como con sus células blanco, también funciona como factor diferenciador, 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 el momento no es suficiente para entender el mecanismo que regula la proliferación de estas estirpes celulares, por lo que es necesario desarrollar trabajos con un mayor grado de información. Para 1988, se mantiene el nivel de investigación para dicho fenómeno, no obstante, se obtiene información más detallada, reportando nuevas funciones para factores ya conocidos ó la descripción de nuevos factores comparados con los ya conocidos, por ejemplo, se muestra que el TGF-B es capaz de regular la transcripción de los ARNs mensajeros para el inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1, fibronectina y procolágena tipo-1, sugiriendo que el TGF-B puede funcionar también como un regulador de actividad proteolítica extracelular (44). También se mostró que es un inhibidor potencial del crecimiento con acción autócrina en líneas celulares de cáncer de mama humana con receptores negativos a estrógenos, sin afectar el crecimiento de las líneas celulares con receptor positivo a estrógenos, presentando la posibilidad de que pueda funcionar

como un inhibidor autócrino de la proliferación ó como un factor de crecimiento de acción parácrina para células tumorales estromales (45). Además puede ser 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 del crecimiento autócrino negativo para células tumorales, la cual establece que una producción reducida o una producción deficiente del inhibidor del crecimiento 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 de el 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 otros tipos celulares, y que el 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 el 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 más sensibles unas que otras, fenómeno que aún no queda claro. No obstante, Spriggs y colaboradores, muestran que de 14 líneas epiteliales tumorales, la mayoría presenta receptores suficientes para TNF y presentan resistencia a el efecto inhibidor de el 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 para un tipo celular, sino que al parecer, están involucrados diferentes tipos celulares, como es el inhibidor obtenido de el medio condicionado de células provenientes de leucemia mielomonocítica aguda, cultivadas con 12-O-tetradecanoil forbol acetato (TPA, del inglés: tetradecanyl phorbol acetate), el cual presenta una masa molecular de 70,000 d con actividad inhibidora de fibroblastos, pero no de monocitos, y con un efecto reversible, además de estimular la formación de colonias de macrófagos y granulocitos, y estimular la diferenciación de células leucémicas hacia macrófagos (49). Además de la producción de los factores inhibidores por células normales, algunas células malignas son capaces de secretar inhibidores de la proliferación. Un ejemplo es el inhibidor del crecimiento de células transformadas (CGIF, 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, secretado al

medio de cultivo y se presentan dos fracciones con dicha actividad, cuyo peso molecular es de 110,000 y 55,000 d, (50).

Los factores inhibidores o proliferadores, se obtienen de diversos tejidos y tipos celulares, cuyas características generales son las de presentar su efecto sobre células tumorales y normales, escaseando los factores que sólo afecten a células tumorales. Shirazuna y colaboradores, describen un factor que inhibe la proliferación de células epiteliales y promueve su diferenciación cuando es aplicado en células epiteliales (HSGc-C5) provenientes de un adenocarcinoma salivar. El factor es secretado por fibroblastos normales provenientes de la línea no tumorigénica WI-38 y no presenta efecto sobre sí misma (51). Relevante fue la aportación de evidencias sobre la malignidad celular, las cuales tienden a sugerir que ésta es mediada o causada por la alteración en las vías de transducción de la señal y receptores para moléculas reguladoras de la proliferación celular (52).

Nueva información sobre factores reguladores ya conocidos caracteriza los trabajos del área en estos últimos años.

Noda y Vogel mostraron que el FGF básico puede incrementar la expresión del gen que codifica para el TGF-B en células similares a osteoblastos cuando son estimuladas con el factor (53). Por otro lado, Sharma y Dahiya, determinan que la señal mitogénica del FGF básico no se inicia por la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos en células epiteliales PC12, sugiriendo además, que la señalización mediada por el receptor para FGF básico no es transmitida 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). Sin embargo, Presta y colaboradores, al trabajar con células FBAEAG 7680 normales y transformadas químicamente FBAE GM 7373, encontraron que las células transformadas mostraron un nivel basal alto de actividad de proteína cinasa C (PKC:del inglés Protein Kinase C). Esta cinasa es activada por el FGF básico, la cual interviene 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 células normales como en transformadas (55, 56).

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-B1 (57,58). Por otro lado, el efecto del TGF-B sobre el crecimiento de células epiteliales intestinales y del hígado es también marcadamente inhibidora, desempeñando un papel regulador del crecimiento para este tipo celular en ambos órganos (59,60).

Plouet y Gospodarowicz, buscando la interacción existente entre el TGF-B1 y FGF básico, encontraron que el TGF-B1 modula positivamente la bioactividad del FGFb en células endoteliales de córnea, sugiriendo que el TGF-B1 podría actuar a través de la regulación de síntesis del FGFb en células endoteliales de córnea bovina (61). McPherson y colaboradores, muestran que el inhibidor de crecimiento encontrado en las células BSC-1 del mono verde africano es

similar al TGF-B1 y 2 (62). En cuanto a información sobre el mecanismo de señalización molecular que presenta el TGF-B, el grupo de Mtoh y Chen, establecen que es capaz de inhibir la actividad de adenilato ciclasa en células endoteliales de arteria humana *in vitro* (63). Con respecto a situaciones patológicas, se ha encontrado una sobre expresión de TGF-alfa en epidermis sorriática actuando como estimulador mitogénico de queratinocitos, estableciendo que no se debe a una expresión deficiente de un inhibidor del crecimiento como lo es el TGF-B1 (64).

De algunos factores ya conocidos, se ha obtenido poca información, por ejemplo se determinó la actividad inhibitoria de la proliferación ejercida específicamente por el INF-beta contra líneas celulares obtenidas de carcinoma colorectal (65). Se ha mostrado que el factor difusible inhibidor tiene una actividad bifuncional ya que actúa como un inhibidor de crecimiento celular y como un factor de crecimiento similar a insulina (66). El factor inhibidor derivado de hígado de rata presenta una acción moduladora positiva y negativa del crecimiento en diferentes sistemas celulares, efecto ejercido de manera diferente al TGF-B1 y el TNF-alfa en algunos tipos celulares (67). El grupo de Lehmann, continuando con el estudio del MDGI, determina que es un factor proteico de peso molecular de 14.5 Kd y que su actividad inhibitoria no es restringida exclusivamente a las células epiteliales del tumor ascítico de Ehrlich (68). También se encontró que el MDGI está relacionado con un antígeno de 70 Kd encontrado en el núcleo de células epiteliales mamarias bovinas, indicando que el MDGI y el antígeno localizado en núcleo, podrían estar regulando la expresión génica del factor, teniendo un papel regulador de la proliferación celular que actúa a nivel génico (69).

El descubrimiento de nuevas propiedades en moléculas conocidas, fue un trabajo que despertó interés entre los investigadores. Un ejemplo de ello fue la demostración de que la interleucina-6, tiene la capacidad de funcionar como un polipéptido regulador del crecimiento para células del hígado *in vivo* (70). Por otro lado, surgieron moléculas aparentemente nuevas que presentaban propiedades reguladoras de la proliferación; tal es el caso de un inhibidor de fibroblastos y células epiteliales cuya acción es bloquear el efecto del EGF y PDGF, dicho inhibidor actúa 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 (71). También se encontró que las células epiteliales confluentes de tráquea de rata normal, producen un inhibidor que afecta la proliferación de células epiteliales de forma negativa. Esto muestra que las células epiteliales podrían, en su generalidad sin importar el órgano del cual se obtuvieron, ser capaces de producir un inhibidor de la proliferación como parte de su mecanismo regulador de la división celular (72). Así mismo se encontró un inhibidor presente en el extracto intestinal de ratón, que inhibe la proliferación de células epiteliales de colon, lo cual apoya lo anterior y señala que tales inhibidores presentan una acción parácrina (73). Por último, se

encontró que el leucotrieno D₄ estimula la proliferación de células epiteliales glomerulares, respuesta que es mediada por un intercambio de Na⁺/H⁺ y de la proteína cinasa C (74).

Para 1990 y 1991, la aportación de nueva información rebasó el nivel celular, abordando estudios bioquímicos y moleculares, aunque sin olvidar los estudios a nivel celular. Se iniciaron estudios para caracterizar, de manera más completa a los factores de crecimiento ya conocidos, estableciendo no sólo su peso molecular, sino caracterizando su secuencia génica y la vía de transducción de la señal que siguen algunos de ellos.

Por ejemplo, se encontró que el ARNm para el TGF-β1 se incrementa en el hígado durante la carcinogénesis, y en el estadio temprano del proceso, las células ovales pero no los hepatocitos, contienen el ARNm del factor de crecimiento. Sin embargo, células ovales no tumorigénicas inmortalizadas (línea celular LE/6) continuaron produciendo los niveles de ARNm del factor en cultivo; el mensajero del TGF-β1 decreció marcadamente durante 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 tumorigénicas fue una disminución o pérdida de la sensibilidad al efecto del factor. Además las células tumorales fueron capaces de unirse al TGF-β1 con capacidad similar a las normales, teniendo el mismo tipo de receptor (peso molecular: 280, 85 y 65 Kd), indicando que la pérdida de la sensibilidad al TGF-β1 en células epiteliales de hígado transformado involucra mecanismos posteriores a la unión del receptor. Evidencias sólidas muestran que c-myc no es blanco para el TGF-β1 en células epiteliales de hígado, lo que es consistente con la hipótesis de que el TGF-β1 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 responden al factor (75). La actividad inhibitoria del TGF-β, se ejerce en la fase G1 del ciclo celular de células epiteliales, deteniéndolas en dicha fase y se ha visto que está asociada con la fosforilación de una proteína cinasa (76). También se le asocia como un regulador del activador de plasminógeno en células epiteliales normales y neoplásicas (77), además inhibe el efecto del PDGF a través de un bloqueo en la generación de segundos mensajeros (IP₃ del inglés: Inositol trisphosphate) en células de osteosarcoma humano (78); es producido por diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran los fibroblastos y macrófagos de pulmón (79, 80), células epiteliales normales mamarias de rata (81), linfocitos, miocitos, condrocitos, células leucémicas y endoteliales entre otras. Al TGF-α se le adjudicó un papel diferenciador en dos líneas celulares de carcinoma de colon (82), se le asoció con la carcinogénesis de piel y con la proliferación de epitelio inmortalizado de tráquea de rata (83, 84).

Se ha demostrado que el FGF-básico, es almacenado como componente de la matriz extracelular para apoyar la

proliferación y diferenciación celular. Este factor se encuentra ligado a heparinsulfato en la matriz extracelular y se libera en forma activa cuando el heparinsulfato de matriz extracelular es degradado por la heparinasa, sugiriendo que se trata de un mecanismo nuevo de regulación de la proliferación (85). En subpoblaciones de células derivadas de cáncer de mama se encontraron dos receptores para miembros de la familia del FGF-básico amplificados (86) y en conjunto con la interleucina-1 beta (IL-1 beta), es capaz de activar fibroblastos dérmicos humanos (87), también mostró estar relacionado con la transformación celular (88, 89), con la producción de la mielopoyésis en cultivos de médula ósea humana cultivada (90) y como un factor multifuncional para células neuroectodérmicas (91).

Los estudios realizados acerca del INF-alfa establecieron que inhibe la proliferación de la línea epitelial obtenida de un carcinoma de próstata humana PC-3, cuyo efecto es dosis dependiente y es mediado parcialmente por el incremento en los niveles celulares de AMP cíclico (92). En lo correspondiente al INF-gama, se demostró que 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 humana (93).

El estudio de los factores anteriormente descritos, absorbieron la atención de la mayoría de los investigadores que trabajan en el área, sin embargo, el reporte de otros factores, conocidos o no, fueron registrados; para el EGF, se mostró que existe una relación entre la expresión de receptores y la respuesta al mismo en células de epitelio ovárico normal y en células epiteliales tumorales de ovario (94). Se descubrió que la IL-1 es un regulador autócrino del crecimiento de células endoteliales humanas (95), 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 (96, 97). Se reportó una proteína con efecto similar al factor de crecimiento nervioso (NGF), que modula la interacción parácrina entre una línea celular epitelial neoplásica y las células estromales de próstata humana (98). Se determinó que el fenotipo transformado está asociado con la expresión de receptores para insulina en fibroblastos y células de ovario (99), y se probó que los estrógenos inducen la proliferación y diferenciación de células epiteliales de endometrio (100, 101). En el mismo año se realizaron estudios sobre factores inhibidores no muy conocidos, como fue el estudio hecho por el grupo de Douzinas y colaboradores quienes reportan el efecto de un inhibidor de epitelio de intestino delgado humano, que actúa sobre el epitelio de la mucosa intestinal. Ese factor ha demostrado ser no citotóxico y específico para el tracto digestivo y, particularmente, para el intestino delgado, con una acción reversible y dependiente de la dosis. La purificación del factor obtenido del medio condicionado de tales células epiteliales, dió como resultado una proteína de bajo peso molecular de aproximadamente 15 Kd, denominada PII (por sus siglas en inglés Purified Intestinal Inhibitor). Se

probó también, que la acción del factor provoca la detención de las células en la fase G1 del ciclo celular. Los datos apoyan la hipótesis que establece que la regulación de la proliferación celular es mediada por inhibidores endógenos a nivel epitelial (102, 103). Por otro lado, el grupo de Shoji establece que los fibroblastos de pulmón producen un factor con actividad estimuladora del crecimiento sobre células epiteliales bronquiales, el cual es sensible a proteasas, estable en ácido, sugiriendo que es de naturaleza proteica, y al ser cromatografiado presenta una masa molecular de 6,000 d (104).

Se ha observado la relación de otros factores con la transformación maligna, y se ha asociado a diferentes causas. Se asoció a oncogenes tales como el K-fgfst, c-Ha-ras, v-raf y v-mos (105, 106, 107); a virus, como papilomavirus (108), virus SV40 de mono (109) y a andrógenos (110), entre otros.

Los trabajos sobre factores de crecimiento han ido disminuyendo conforme se avanza en su caracterización, al surgir nuevos factores y ser debidamente estudiados, se encontró que presentaban características muy similares con los ya estudiados, estableciendo una homogeneidad entre ellos. Esto sugirió que los factores podrían ser agrupados en familias dependiendo de sus propiedades funcionales, bioquímicas y moleculares, aunque no quiere decir que todos se agruparon dentro de estas familias, ya que algunos no pudieron ser clasificados por sus características específicas, o por ser particulares de algún órgano específicamente, o su masa molecular varía a pesar de ser secretado por el mismo tipo celular, sugiriendo que son factores similares funcionalmente pero de estructura diferente.

Para 1992, el estudio sobre factores de crecimiento se basa en análisis bioquímicos y moleculares de los factores ya establecidos. Sin embargo, los estudios bioquímicos y moleculares no son suficientes para comprender el mecanismo de acción de los mismos, por lo que en los últimos años, comenzaron a realizarse estudios enfocados a dilucidar los mecanismos de traducción de la señal que implican dichos factores.

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 (111). Weiss y Nuccitelli, revelan que la inhibición de la fosforilación en 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 (112). Por otro lado, se reporta que la señal de transducción para el FGF-b pero no para el TGF-B1, involucra el metabolismo del ácido araquidónico en células endoteliales (113), 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 en células endoteliales aórticas transformadas de bovino fetal (114). El 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 (115).

No basta la caracterización molecular y bioquímica de los factores para comprender el mecanismo de acción. Muestra de ello es el estudio que realizó Hannocks y colaboradores en el que describen la existencia de una regulación proteolítica para el FGF-b, IL-1 y TGF-B en células estromales de médula ósea humana (116), sugiriendo que la interacción de tales moléculas con la matriz extracelular son uno de los tantos mecanismos de regulación para los factores.

A pesar de la gran cantidad de factores estimuladores o inhibidores de la proliferación, aún se desconoce cuál es el mecanismo de acción de los mismos.

Besner y Klagsbrun, en 1991, reportan un factor obtenido del medio condicionado de macrófagos, el cual presenta actividad inhibidora de células endoteliales, denominado MD-ECI (del inglés: *macrophage-derived endothelial cell inhibitor*), el cual es distinto del TGF-B y el TNF-alfa. Este inhibidor detiene la proliferación de células endoteliales basales así como el crecimiento de células endoteliales estimuladas con el FGF, siendo su efecto dosis dependiente, no tóxico y reversible (117). En la tabla 1 se muestran los factores más importantes reportados entre los años de 1983 y 1992 con actividad estimuladora o inhibidora de fibroblastos y células epiteliales.

TABLA I
FACTORES ESTIMULADORES E INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE CELULAS
EPITELIALES Y FIBROBLASTICAS MAS IMPORTANTES REPORTADOS ENTRE
1983 Y 1992.

FACTOR	ACTIVIDAD	PESEO MOLECULAR en daltons (d)
Factor inhibidor para la formación de fibroblastos de médula ósea humana. ⁸	INHIBIDOR DE FIBROBLASTOS	ND
Factor inhibidor del crecimiento de fibroblastos (FGIF). ⁹	INHIBIDOR DE FIBROBLASTOS	ND
Inhibidor de la proliferación hepática. ¹⁰	INHIBIDOR DE EPITELIO	26,000
Factor de activación de fibroblastos producido por monocitos (FAF-M) ¹³	ESTIMULA LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS	38,000 Y 10,000
Factor difusible inhibidor de células normales (IDFN) ¹⁵	INHIBE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS	40,000
Factor regulador del crecimiento (FGR-s) ¹⁶	INHIBE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS	13,000
Factor de crecimiento epidermal (EGF) ¹⁷	ESTIMULA LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS Y EPITELIOS	6,000
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) ¹⁷	ESTIMULA LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS	31,000 Y 28,000
Factor inhibidor de la proliferación presente en suero de rata. ¹⁸	INHIBE LA PROLIFERACION DE CELULAS EPITELIALES	220,000
Inhibidor del crecimiento (IG) ²⁰	INHIBE LA PROLIFERACION DE CELULAS EPITELIALES	24,000

Inhibidor del crecimiento de células epiteliales mamarias. ²³	INHIBE LA PROLIFERACION DE EPITELIO DE MAMA.	ND
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) ²⁴	ESTIMULA LA PROLIFERACION DE EPITELIO Y FIBROBLASTOS	16,000
Inhibidor del crecimiento epidérmal (EGI) ²⁷	INHIBE LA PROLIFERACION DE EPITELIO	27,000
Factor de crecimiento derivado de cerebro (BDGF-A y B) ²⁸	ESTIMULA LA PROLIFERACION DE EPITELIO Y FIBROBLASTOS	16,000 Y 17,000
Factor con actividad inhibidora del crecimiento de fibroblastos. ²⁹	INHIBE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS	2,000
Inhibidor de la síntesis de ADN asociado a membrana. ³¹	INHIBE LA SINTESIS DE ADN EN FIBROBLASTOS	ND
Factor inhibidor de la proliferación hepática. ³⁶	INHIBE LA PROLIFERACION DE EPITELIO	17-19,000
Factor de suero de conejo con actividad inhibidora. ³⁷	INHIBE LA PROLIFERACION DE EPITELIO	> 10,000
Factor inhibidor derivado de glándulas mamarias de boyino lactante (MDGI). ³⁹	INHIBE LA PROLIFERACION DE EPITELIO MAMARIO	14,500
Inhibidor del crecimiento derivado de fibroblastos (FDGI). ⁴⁰	INHIBE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS	12,000
Interferón ⁴¹	INHIBE LA PROLIFERACION DE EPITELIO Y FIBROBLASTOS	19-26,000

Inhibidor derivado de células de leucemia mielomonocítica aguda. ⁴⁹	INHIBE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS	70,000
Inhibidor del crecimiento de células transformadas (TGIF). ⁵⁰	INHIBE LA PROLIFERACION DE CELULAS DE CARCINOMA DE MAMA	110,000 Y 55,000
Interleucina-6 ⁷⁰	ESTIMULA LA PROLIFERACION DE EPITELIO	26,000
Interleucina-1 ⁹⁵	INHIBE LA PROLIFERACION DE EPITELIO DERIVADO DE UN CARCINOMA OVARICO HUMANO	17,000
Inhibidor intestinal purificado (PII) ^{102,103}	INHIBE LA PROLIFERACION DE EPITELIO DE LA MUCOSA INTESTINAL	15,000
Estrógenos ^{100,101}	ESTIMULAN LA DIFERENCIACION Y PROLIFERACION DE EPITELIO ENDOMETRIAL.	

BIOLOGIA DEL CANCER

Normalmente la tasa de división celular en los tejidos es 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 que se eliminó una 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 que 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 para reemplazar las células muertas en los tejidos que normalmente experimentan una pérdida continua de células (como el tejido epitelial). Mecanismos reguladores similares también son importantes para el desarrollo ordenado de células y tejidos durante la embriogénesis (118). Las células del cáncer muestran un número de propiedades que las hacen peligrosas para el huésped incluyendo a menudo su habilidad para invadir otros tejidos y para inducir crecimiento interno vascular, lo cual asegura que las células proliferantes del cáncer tengan un suministro adecuado de sangre (119). Sin embargo, una de las características que definen a las células cancerosas es que responden anormalmente a los mecanismos de control que regulan la división de las células normales, y que continúan dividiéndose de una manera incontrolada hasta que matan al huésped.

Hasta hace poco tiempo, se proponía que 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, por mencionar unos cuantos (120). Mientras que los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis aún se desconocen, es claro que las células cancerosas están menos sujetas a la mayoría de los mecanismos de retroalimentación que controlan la división celular normal, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, las células cancerosas continúan dividiéndose en cultivo más allá del punto en el que las células normales se detienen por inhibición por contacto, proliferando y apilándose una sobre otra (121). Además las células cancerosas requieren menos cantidad de factores de crecimiento que las células normales para poder sobrevivir y dividirse en cultivo, incluso en algunos casos puede ser porque producen sus propios factores de crecimiento (122).

Una segunda diferencia fundamental importante entre las células normales y cancerosas es que las células cancerosas, como población pueden dividirse indefinidamente (123). 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 dividirán entre 20 y 50 veces en promedio, dependiendo del animal del que fueron extraídos. Conforme avance el cultivo, las células

individuales tardarán cada vez más tiempo para dividirse, es decir alargan su ciclo celular, y eventualmente toda la población cesará de dividirse y morirá. En general, las células tomadas de animales viejos se dividirán menos veces en cultivo que 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 integro. 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 el crecimiento desenfrenado de una célula en particular. Lo que significa 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 (118). Las células cancerosas proliferan fácilmente con niveles bajos de suero y son en muchas ocasiones, capaces de crecer mientras están suspendidas en gel agar; además, en general no detienen su proliferación cuando ya han cubierto la caja de cultivo, como lo hacen las células normales, sino que continúan apilándose hasta que alcanzan una gran densidad. 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 (124). 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 tumor, tal como el virus del sarcoma de Rous (125). 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. Recientemente se ha demostrado que el producto del gene src es una cinasa con una especificidad poco común. La cinasa cataliza la fosforilación en residuos tirosina en un subgrupo particular de proteínas celulares, siendo la más interesante desde el punto de vista del citoesqueleto la vinculina. Esta proteína está asociada con las placas de adhesión y se piensa que es importante en el anclaje de los filamentos de actina a la membrana plasmática. La 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 mediante el citoesqueleto celular organizado (126,127).

CANCER CERVICO UTERINO

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) está asociado con una etiología viral. Es el de mayor incidencia en nuestro país, ocupando el primer lugar como causa de muerte entre las enfermedades neoplásicas de la mujer (128).

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 anomalías 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 (129) 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 tal fenómeno las pacientes que no han recibido tratamiento, o que no han respondido a éste, mueren usualmente en un período de 3 a 5 años (130).

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 (131).

FACTORES DE RIESGO Y ETIOLOGIA

La etiología 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 como el Virus del Papiloma Humano (VPH).

Algunos experimentos han mostrado la presencia de algunos componentes del cigarro en la mucosa cervical (132). Dichos estudios sugieren que podría existir alguna relación entre el desarrollo de CaCu y el tabaquismo, ya sea directo o pasivo (133).

Se ha encontrado también que entre las mujeres que han consumido anticonceptivos orales por largos períodos existe una mayor tendencia a generar CaCu (134, 135). Sin embargo, estudios más amplios han permitido comprobar que los anticonceptivos orales pueden actuar como un co-carcinógeno en conjunción con agentes infecciosos (136).

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 (137). Entre éstas quizá la de mayor peligrosidad es la causada por el VPH.

Los VPH son una familia de virus con DNA que inducen tumores epiteliales y fibroepiteliales de la piel o mucosa en vertebrados. Estos tumores, conocidos con el nombre de papilomas, son generalmente benignos, muestran un crecimiento limitado y frecuentemente sufren una regresión espontánea (138, 139). Sin embargo, algunos miembros de la familia de los VPH inducen tumores que pueden evolucionar produciendo carcinomas malignos, usualmente después de un largo período de latencia.

Los VPH comparten la característica de ser exclusivamente epiteliotrópicos, pero el rango de epitelios susceptibles, así como el tipo de lesión causada difiere entre los tipos de virus. Por ejemplo el VPH tipo 1 (VPH 1) es responsable de los papilomas plantares, mientras que el VPH 6 es el causante de lesiones benignas de laringe y mucosa anogenital (140, 141).

El reconocimiento del potencial oncogénico de los VPH ha provocado un creciente interés, y el hecho de que el DNA y RNA virales persistan en algunos carcinomas hace sospechar que éstos juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del estado maligno de las células infectadas.

La primera asociación de un VPH con un cáncer humano fue reportada en pacientes con epidermodisplasia verruciforme, algunos de los cuales mostraron ser altamente susceptibles a cánceres cutáneos (142, 143). Recientemente los VPH tipo 16, 18 y 33 han sido catalogados como los agentes causales de los cánceres genitales, y sus ácidos nucleicos han sido detectados en un 90% de las biopsias de estos tipos de cáncer (144, 145). En el caso de los VPH oncogénicos se han encontrado secuencias especiales de DNA viral integradas en el genoma celular, mientras que los DNA virales de los tipos no malignos persisten en un estado episomal (146).

Por otro lado, un gran número de estudios epidemiológicos, clínicos, patológicos y moleculares realizados 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 (147, 148, 149).

Quizá cada uno de los factores hasta aquí mencionados toma parte en la transformación maligna de las células cervicales humanas, aunque es claro que los VPHs tipo 16 y 18, son los agentes de más alto riesgo para el desarrollo del CaCu (150). Su presencia en los tumores, sin embargo, podría transformarse en un elemento favorable cuando pensamos en la posibilidad de implementar terapias inmunológicas, ya que éstas técnicas pueden ser más efectivas cuando existe un material antigénico potente, que en este caso sería el antígeno viral expresado en la membrana de las células tumorales.

TRATAMIENTO DEL CANCER CERVICO-UTERINO.

El tratamiento que se da a las pacientes con CaCu en los hospitales de nuestro país depende del estado de desarrollo del tumor. La primer alternativa es la cirugía. Esta 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 (151). Hoy en día se aplica con buenos resultados en los estadios clínicos tempranos. Existen actualmente dos modalidades de radioterapia, la primera es la exposición a radiaciones externas, dirigidas estratégicamente hacia la zona ocupada por la neoplasia, producidas por una bomba de cobalto. La segunda es la braquiterapia (radiaciones producidas *in situ*), donde se aplica Radio o Cesio intracavitario (152).

Los dos tipos de radiaciones son aplicados de manera combinada para la obtención de mejores resultados. 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 (153).

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 ribosómica. 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 diagnóstica 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 ésto posible es necesario desarrollar programas de investigación a nivel celular y molecular que aporten conocimientos que permitan una mejor comprensión de la enfermedad, que en base a ellos se establezcan terapias más adecuadas para este tipo de patología.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La división celular es un mecanismo muy complejo, el cual es regulado por diversos factores, que pueden ser físicos (temperatura), químicos (compuestos mitogénicos y antimitogénicos) o biológicos (factores producidos por las mismas células que regulan la proliferación de ellas mismas o de otras células).

Anteriormente se creía que las células epiteliales o fibroblásticas, eran capaces de regular su proliferación por la densidad, fenómeno conocido como inhibición de la proliferación por contacto *in vitro*, en la cual se detiene la división celular tan sólo por el contacto que hay entre las membranas plasmáticas de dos o más células en cultivos que presentan una alta densidad celular. Recientemente se ha reportado que tal inhibición está relacionada con un factor de naturaleza protéica, secretado por las mismas células, a lo que se le conoce como regulación autócrina. El caracterizar el o los factores biológicos que regulan la división celular, permitirá comprender el mecanismo que regula la división, así como su funcionamiento en células normales. La información producida, generará el conocimiento que permita dar respuesta a preguntas tales como: qué factor o factores participan en la regulación de la división celular, tanto positiva (inducción), como negativamente (inhibición) y cuáles son las condiciones microambientales en las que actúa el o los factores. Cuál es el efecto que tienen tales factores sobre células que presentan un desequilibrio en dicho mecanismo, así como determinar si es el factor par. 22 o su receptor el causante del desequilibrio (estado patológico). También es importante saber si es una consecuencia de una alteración genética que no permite la síntesis adecuada del receptor o del factor, o si existe un desequilibrio en el mecanismo de señal de transducción para el o los factores, etc.

En este trabajo se estudió la existencia de un factor que inhibe la proliferación de células epiteliales o fibroblásticas normales producido por ellas mismas y cuál es el efecto del factor sobre células provenientes de tumores de CaCu.

HIPOTESIS

Es conocido que en el control de la proliferación celular, participan diferentes tipos de factores humorales de naturaleza glicoprotéica, los cuales controlan de manera autócrina o parácrina la división celular. Un efecto poco estudiado, es el relacionado con los factores que regulan de manera negativa la división celular. Tomando en consideración que las células normales producen factores estimuladores (mitogénicos), como parte del mecanismo regulador de la división y que debe existir un equilibrio en el número celular de un organismo, entonces cabría esperar que las mismas células fueran capaces de producir y secretar factores que regulen la proliferación celular de manera negativa (inhibidores mitogénicos), como parte del mismo mecanismo regulador. Esto parece estar apoyado, al menos en lo que se ha observado *in vitro*, en la inhibición por contacto o densidad en células epiteliales y fibroblásticas. Por otro lado, si la ausencia del factor inhibidor de la proliferación secretado por las células normales fuera la causa que produce la inmortalidad de las células epiteliales o fibroblásticas *in vitro*, se esperaría que las células tumorales, en principio, no secretaran este factor, favoreciendo su proliferación indefinida. Se podría esperar entonces que la adición del factor inhibidor de la proliferación producido por células normales, a un cultivo de células tumorales produciría una inhibición de la proliferación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

DETERMINAR LA PRESENCIA DE UN FACTOR INHIBIDOR DE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES EN MEDIOS CONDICIONADOS POR CELULAS NORMALES, ASI COMO SU EFECTO EN CELULAS TUMORALES PROVENIENTES DE CaCu.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Caracterizar las condiciones de cultivo que permitan establecer estirpes celulares de fibroblastos y células epiteliales humanas, provenientes de cérvix normal.
- 2.- Determinar si existe un factor inhibidor de la proliferación de fibroblastos y células epiteliales en los medios condicionados de estas células.
- 3.- Purificación del factor a través de una separación cromatográfica de exclusión molecular y separación electroforética.
- 4.- Caracterizar bioquímicamente el factor inhibidor de la proliferación de fibroblastos o células epiteliales, presente en cultivos confluentes.
- 5.- Evaluar el efecto del factor inhibidor sobre la proliferación de células malignas provenientes de CaCu.

METODOLOGIA

OBTENCION DE CELULAS EPITELIALES Y FIBROBLASTICAS NORMALES A PARTIR DE BIOPSIAS DE CERVIX.

Las células epiteliales y fibroblásticas son obtenidas de una muestra de tejido normal de cervix, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a cáncer cérvico uterino (CaCu). Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en medio de cultivo Eagle Medium (EM) al 20% de suero fetal de bovino (SFB) o suero fetal de caballo (SFC) a 4°C 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 con tripsina al 0.05%. Esta consiste en colocar los trozos de tejido en un matraz de fondo plano de 50 ml, con 30 ml de tripsina a 37°C en un baño con agitación durante 60 minutos. Una vez concluido el tiempo el disgregado es decantado a un tubo de centrifuga de 50 ml y resuspendido en 1 ml de SFB y centrifugado a 500g en una centrifuga de mesa. El paquete celular obtenido de la disgregación es resuspendido en EM al 10% de SFB, de tal manera que las células del paquete sean sembradas en cajas de cultivo de 5 ml (COSTAR), con una densidad celular de 5×10^3 células por caja. Por otro lado, se añade nuevamente a la muestra de tejido remanente 20 ml de tripsina y se continúa durante 30 minutos más con agitación suave a 37°C. La mezcla se vierte a través de una malla de nailón que permite sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. Las células obtenidas del disgregado son cultivadas en cajas de cultivo de 5 ml y se mantienen en una incubadora (Scientific) al 5% de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante dos días máximo. Después de este tiempo de incubación, se realiza el cambio de medio (totalmente), de tal manera que sean removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10% y se continúa así hasta obtener un buen número de células proliferando. En este momento se obtienen poblaciones (fibroblásticas o epiteliales), las cuales son utilizados para llevar a cabo resiembras, que permitan obtener poblaciones de un sólo tipo celular, para obtener los medios condicionados (MC) de epitelios y fibroblastos y son estas mismas células las que se utilizan en los diferentes ensayos. La resiembra consiste en separar las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo que se encuentra en un 70% de saturación, con ayuda de una proteasa (tripsina al 0.1% 3 a 5 minutos). Las células obtenidas son lavadas por centrifugación (500g) dos veces y posteriormente son contadas con la ayuda de un hemocitómetro y sembradas nuevamente con la densidad celular requerida para cada ensayo o cinética.

OBTENCION DE CELULAS TUMORALES A PARTIR DE BIOPSIAS DE CaCu.

Las células tumorales son obtenidas de biopsias de pacientes con CaCu, la muestra tumoral es fragmentada en trozos pequeños (3 a 5 mm) y sometido a disgregación enzimática con tripsina al 0.025 % durante 20 minutos. El disgregado y el cultivo de las células es procesado de manera similar al descrito para las muestras de tejido normal.

CULTIVO DE LINEAS CELULARES TUMORALES.

Las células tumorales tipo epitelial T-3 y Calo, provienen de carcinoma de cérvix humano, mientras que la línea celular establecida HEP-2, proviene de un carcinoma de laringe humana. Las células son sembradas en cajas de cultivo de 5 ml (COSTAR), en EM al 10 % de SFB y mantenidas en una incubadora (Scientific) a 37 °C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío, durante 5 o 6 días en promedio dependiendo de la línea.

OBTENCION DE MEDIOS CONDICIONADOS.

Los medios condicionados de cada uno de los tipos celulares normales y tumorales, se obtienen formando agregados de cultivos confluentes o saturantes respectivamente, formando agregados para cada uno de ellos (pools), los agregados son centrifugados a 1,000g para retirar detrito celular o células, de tal manera que se obtienen medios condicionados de células normales y tumorales en fase confluyente o saturantes. Los medios condicionados son almacenados a 4°C en recipientes de plástico o vidrio, hasta el momento de su uso.

INCORPORACION DEL COLORANTE CRISTAL VIOLETA PARA DETERMINACION DE PROLIFERACION CELULAR.

La determinación de la proliferación celular fue evaluada, utilizando la técnica de incorporación del colorante cristal violeta a los núcleos celulares (154). Esta técnica consiste en:

- a) fijar las células con glutaraldehído al 1.1 %.
- b) dejar secar los platos de cultivo fijados al aire.
- c) añadir el colorante cristal violeta al 0.1 %.
- d) lavar sutil y exhaustivamente las cajas de cultivo con agua desionizada o bidestilada, de tal manera que el colorante no asimilado sea retirado de las cajas de cultivo.
- e) dejar secar las cajas al aire libre.
- f) añadir ácido acético al 10 %, dejando en agitación durante 20 minutos a temperatura del cuarto.
- g) tomar lecturas en un espectrofotómetro a 590 nm del sobrenadante de las cajas de cultivo teñidas.
- h) correlacionar a través de una gráfica o utilizando el procedimiento de regresión lineal, 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 de la caja de cultivo con tripsina al 0.05 %, durante 5 a 10 minutos para células normales y 2 a 5 minutos para células tumorales, a una temperatura de 37 °C. Son colectadas en tubos para centrífuga y son centrifugadas a 500g para formar un paquete celular. Una vez centrifugadas, se retira el sobrenadante, y se añade un volumen específico, donde 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 1 ml de EM. El pozo donde están las células se homogeniza y se realizan diluciones sucesivas en los demás pozos. Posteriormente, se incuba por un período de 3 horas 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 con el colorante cristal violeta para determinar su densidad óptica y su respectiva correlación con el número celular.

CINETICAS DE PROLIFERACION:

Las células se siembran en cajas de cultivo de 2.5 ml, en EM al 10 % de SFB, con una densidad de 50, 000 células por caja si son normales y de 30,000 si son tumorales. El período de incubación es de 15 a 17 días para las células normales y de 5 a 6 días para las tumorales. Durante este período de tiempo se fijan cuatro cajas diarias con glutaraldehído, se tiñen con cristal violeta para determinar su número celular. De este modo puede establecerse el tiempo de doblaje y el comportamiento de estas células a través del tiempo.

EFEECTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS:

La actividad inhibidora presente en los MC, es determinada mediante ensayos experimentales, en los que se prueban cada uno de los medios sobre el cultivo de células normales o tumorales en fase exponencial, determinando el número celular para cada cultivo inducido por estos medios, comparado con un control normal.

TRATAMIENTO DEL MC CON TRIPSINA:

El MC de fibroblastos confluentes, fue tratado con tripsina al 0.05 % en verseno, incubándose a 37°C durante 30 minutos y posteriormente neutralizado con SFB. La actividad inhibitoria de este medio es probada en células tumorales en fase exponencial, comparando su efecto con el MC de fibroblastos confluentes sin ser tratado con tripsina.

CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL FACTOR:

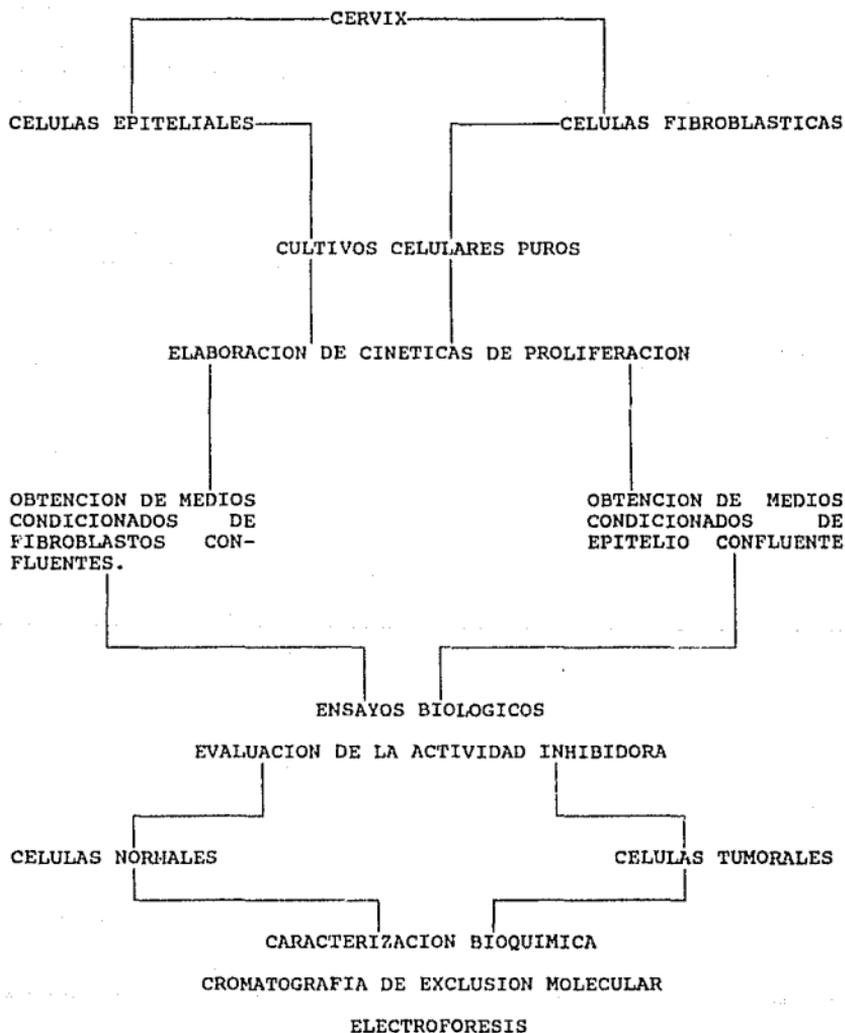
Cien ml de MC de fibroblastos confluentes fue concentrado por liofilización. El concentrado fue resuspendido en 2 ml de agua destilada. La muestra fue separada por cromatografía en una columna de sephadex G-75 (cromatografía de exclusión molecular), de 1m de altura por 1.2 cm de diámetro interno, en solución salina isotónica de NaCl 0.9% equivalente a 0.15 molar, con una velocidad de flujo de 8ml/hr previamente calibrada con marcadores conocidos: Azul dextrán, Albúmina sérica bovina y Citocromo C, en una concentración de 5mg/ml, y las fracciones colectadas fueron leídas a 280 nm en un espectrofotómetro. Las fracciones que registraron lecturas significativas de

proteínas fueron probados en ensayos biológicos, para determinar actividad inhibitoria.

La fracción cromatográfica que presentó actividad inhibitoria fue liofilizada nuevamente para concentrarla, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford (155) y usada para separación electroforética, en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes y revelado por la técnica de tinción con plata.

La electroforesis empleada fue la desarrollada por el método de Laemmli, electroforesis en gradiente de 5 a 20% en geles de poliacrilamida y realizada en un amortiguador tris glicina pH 8.6 SDS 1% (156).

El gel de poliacrilamida en el cual se realizó la electroforesis, fue teñido mediante la técnica ultrasensitiva de tinción de geles con plata (157).

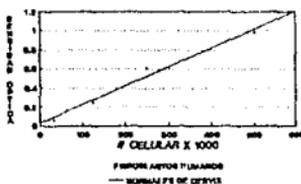
DIAGRAMA DE FLUJO

RESULTADOS.

Las técnicas de cultivo de tejidos han permitido el estudio de la división celular en condiciones controladas *in vitro*, determinando la participación de elementos de naturaleza protéica secretados al medio por las células. Las células epiteliales y fibroblásticas se encuentran en una estrecha asociación *in vivo*, participan en mecanismos comunes como el de reparación de la piel, en la hematopoyésis, etc. Se han reportado factores que secretan los fibroblastos con un efecto sobre las células epiteliales y viceversa (15, 16, 20). Para estudiar *in vitro* el mecanismo que regula la proliferación de ambas estirpes celulares, es necesario determinar y caracterizar las condiciones en las cuales estas células proliferan y establecer qué tanto proliferan en un tiempo y área determinada, es decir, realizar una cinética de proliferación que nos permita establecer cuando dichas estirpes celulares se encuentran en la fase de crecimiento exponencial (fase proliferativa), y cuando se encuentran en la fase de confluencia (fase donde hay un paro de la división celular). Para ello, se requiere de una técnica que permita determinar el número celular de forma precisa y fácil. Se eligió la técnica de incorporación de cristal violeta, la cual se basa en la relación que hay entre la densidad óptica y el número celular cuando se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm (Ver materiales y métodos). Se obtuvo una curva patrón para cada una de las estirpes celulares empleadas en este trabajo, tanto para células normales como para células provenientes de tumor de cérvix y líneas celulares establecidas, mostrando ser una técnica muy sensible dada la estrecha relación encontrada entre la densidad óptica y el número celular, confirmado por el coeficiente de correlación determinado para cada una de las curvas (Fig. 1).

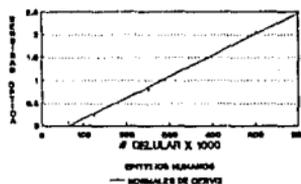
CURVAS DE CALIBRACION

FIBROBLASTOS HUMANOS



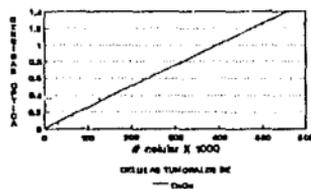
coeficiente de correlación de 0.99%

EPITELIOS HUMANOS



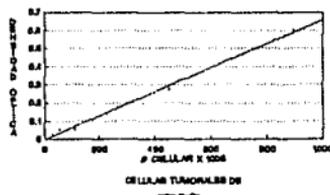
coeficiente de correlación de 0.98%

CELULAS CALO



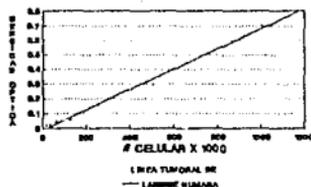
coeficiente de correlación de 0.99%

CELULAS T-3



coeficiente de correlación de 0.99%

CELULAS HEP-2



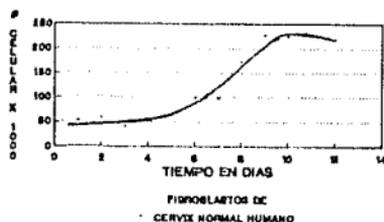
coeficiente de correlación de 0.99%

fig. 1. Curvas de calibración para células normales (epitelios y fibroblastos provenientes de cervix normal humano), tumorales "Calo" y "T-3" (epitelios tumorales provenientes de biopsias de cancer cervico uterino) y para la línea celular "HEP-2" (proveniente de un cancer de laringe humana).

Una vez realizadas las curvas patrón de cada una de las estirpes celulares, se procedió a realizar las cinéticas de proliferación, con el objeto de determinar el comportamiento de cada una de éstas en cultivo, tanto para células normales y tumorales provenientes de CaCu, así como para la línea epitelial HEP-2 proveniente de un tumor de laringe humana (Figura 2 y 3).

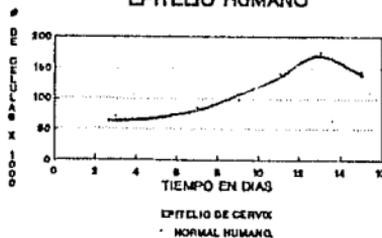
CINETICAS DE PROLIFERACION

FIBROBLASTOS HUMANOS



PLATOS DE 2.5 ml.

EPITELIO HUMANO

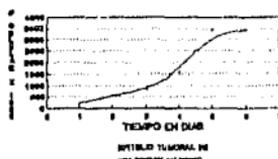


PLATOS DE 2.5 ml.

Figura 2: Cinéticas de proliferación de células epiteliales y fibroblásticas de cérvix normal humano.

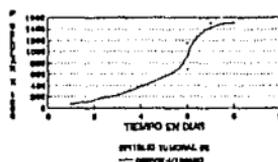
CINETICAS DE PROLIFERACION

CELULAS TUMORALES T-3



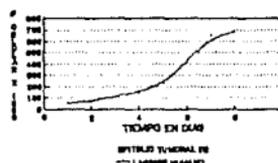
PLATOS DE 2.5 ML

CELULAS TUMORALES CALO



PLATOS DE 2.5 ML

LINEA TUMORAL HEP-2



PLATOS DE 2.5 ML

Figura 3: Cinéticas de proliferación de las células tumorales provenientes de biopsias de cáncer cérvico-uterino ("Calo" y "T-3") y la línea tumoral proveniente de laringe humana "HEP-2".

Las células epiteliales y fibroblásticas normales, provenientes de cérvix, presentan un comportamiento característico, es decir, presentan cuatro fases; una fase denominada de latencia, la cual representa el tiempo que toman las células para adaptarse a las condiciones de cultivo, con una duración de tres o cuatro días; una fase de crecimiento exponencial (fase proliferativa) que dura entre seis y siete días; una fase de confluencia que inicia a partir del décimo ó undécimo día y dura de tres a cuatro días; la cuarta fase se caracteriza por la disminución del número celular a causa de la muerte provocada por las condiciones de toxicidad acumulada 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 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 debida al acumulamiento de desechos celulares y al agotamiento de elementos nutricionales (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 (Tabla 2).

TIPO CELULAR	TIEMPO DE DOBLAJE (días)
Calo	1.3
T-3	1.2
HEP-2	1.4
Fibroblastos normales humanos	2.8
Epitelios normales humanos	5.5

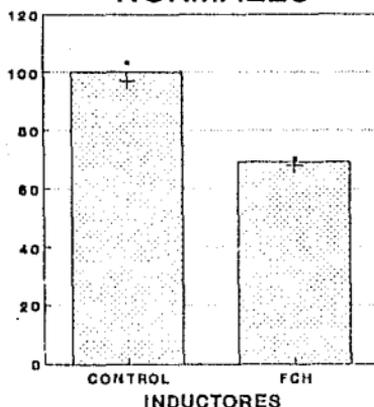
Tabla 2. Tiempo de doblaje para las células epiteliales y fibroblásticas normales de cérvix, así como para las tumorales provenientes de CaCu (Calo y T-3) y de laringe humana (HEP-2).

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 estén en contacto unas con otras para inhibir su proliferación. Es importante mencionar que el tipo de confluencia obtenida es diferente al normalmente encontrado en este tipo de células, en donde estas cubren la totalidad de la superficie de cultivo pues aparecen espacios vacíos que no son llenados por las células. Esto sugiere que hay otro factor que interviene en la detención de la división celular, producido por las propias células y secretado al medio de cultivo (medio condicionado MC), con un efecto autócrino. Para determinar la posible existencia de este factor, es necesario colectar los MCs donde proliferan las células y probar su efecto en células del mismo tipo en fase exponencial. Las cinéticas encontradas para estas células en nuestras condiciones de cultivo muestran que la división celular se detuvo a partir del undécimo día, lo cual quiere decir que el posible efecto de un factor inhibidor de la proliferación se encuentra en concentraciones adecuadas para llevar a cabo su efecto, por lo que se colectó el medio de cultivo entre el undécimo y décimo tercer día de cultivo (Figura 2).

Las células epiteliales tumorales, tanto las provenientes de CaCu, como la línea tumoral HEP-2, presentaron una tasa de proliferación muy similar (Tabla 2). Todas mantienen una fase exponencial continua, sin embargo, la fase de confluencia no se presenta, 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. Presentan una saturación total del área de cultivo que crea un artefacto de detención de la proliferación cuando sólo se observa el número de células adheridas al sustrato que evidentemente se mantiene constante (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 (Tabla 2 y Figura 2 y 3).

Una vez que se colectaron los MCs en fase de confluencia de las células normales, se determinó si tales MCs presentan una actividad inhibidora de la proliferación de células normales, por lo que se llevó a cabo un ensayo que consistió en cultivar células fibroblásticas normales provenientes de cérvix en presencia y en ausencia del MC de células confluentes, evaluando su efecto en la fase exponencial (Figura 4).

INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS NORMALES



(-) (CONTROL)
FGH (MC. de fibroblastos normales)

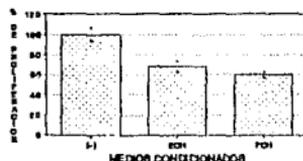
Figura 4: Ensayo de la actividad Inhibidora presente en el medio condicionado de fibroblastos confluentes normales, sobre la proliferación de fibroblastos normales humanos en fase de crecimiento exponencial.

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

Una vez demostrada la existencia de una actividad inhibidora presente en el MC de fibroblastos normales confluentes, se realizó un ensayo para determinar el posible efecto del MC sobre las células tumorales y si el MC proveniente de las células epiteliales confluentes tiene el mismo efecto, en particular sobre células epiteliales provenientes de CaCu. Para esto, 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, en presencia y ausencia de los MCs de epitelio y fibroblastos normales confluentes (Figura 5).

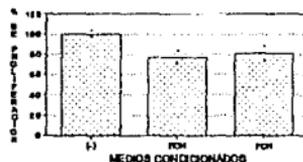
ENSAYOS DE INHIBICION

INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS CALO



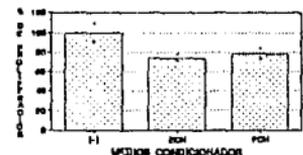
(-) (CONTROL)
 ECH (MC. de epitelios confluente)
 FCH (MC. de fibroblastos confluente)

INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS T-3



(-) (CONTROL)
 ECH (MC. de epitelios confluente)
 FCH (MC. de fibroblastos confluente)

INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS HEP-2



(-) (CONTROL)
 ECH (MC. de epitelios confluente)
 FCH (MC. de fibroblastos confluente)

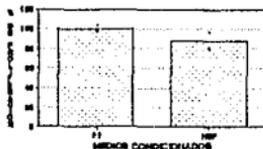
Figura 5: Ensayo de la actividad inhibidora presente en los medios condicionados de epitelios y fibroblastos confluente sobre la proliferación de las células tumorales "Calo" y "T-3", provenientes de biopsias de CaCu y la línea tumoral de laringe humana "HEP-2".

La actividad inhibidora de la proliferación presente en los MC de epitelios y fibroblastos normales confluentes, inhibe parcialmente la proliferación de células tumorales provenientes de CaCu así como la de células de laringe humana. Su mayor efecto fue observado en las células de CaCu "Calo", las cuales presentan una inhibición del 40 % con el MC de fibroblastos humanos y el menor efecto lo presentan las células "T-3" y HEP-2 con el mismo medio condicionado (Figura 5).

Ante las evidencias de que las células epiteliales y fibroblásticas normales, son capaces de detener su proliferación *in vitro* de manera natural con la intervención de un factor inhibidor, como parte de su mecanismo de regulación de la división, cabría pensar que las células tumorales de CaCu "Calo", "T-3" y la línea tumoral HEP-2, son células que al no inhibir su proliferación *in vitro* presentan una anomalía en el mecanismo de regulación de esta. Esta anomalía podría estar dada por la incapacidad de producir el factor inhibidor de la proliferación, que se presenta en los MCs de células normales del mismo tipo. Para aclarar 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).

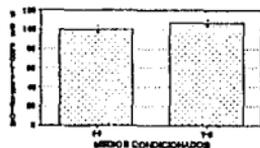
INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS HEP-2.

INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS HEP-2



C (CONTROL)
MC (MEDIO CONDICIONADO)

INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS T-3



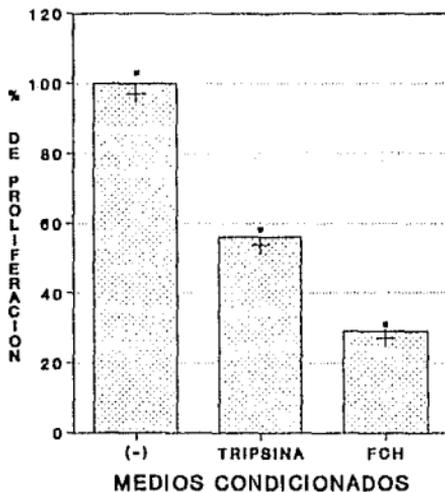
C (CONTROL)
MC (MEDIO CONDICIONADO)

Figura 6: Ensayo del efecto del medio condicionado de células "T-3" y "HEP-2" en saturación, sobre sí mismas.

Los resultados obtenidos muestran que el MC de células tumorales no presenta ningún efecto sobre ellas mismas, indicando, 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, así como de diferente naturaleza bioquímica, ya sea que se trate de una proteína, un lípido, o un azúcar. Como se mencionó en el marco teórico, se han reportado factores que estimulan e inhiben la proliferación, la mayor parte de éstos son de naturaleza protéica. Con el objeto de saber si la actividad inhibidora presente en los MCs ensayados es una proteína, se trató al MC proveniente de fibroblastos normales confluentes con tripsina al 0.05%. La tripsina se utilizó ya que rompe el enlace peptídico de residuos de lisina o arginina del lado carboxílico 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).

EFECTO DE LA TRIPSINA EN EL MC. DE FIBROBLASTOS



Los resultados muestran que disminuyó la actividad inhibitora del MC tratado con la proteasa, con respecto al MC no tratado, lo cual indica que puede tratarse de un factor de naturaleza proteica.

Una vez que se identificó la naturaleza bioquímica del factor, se procedió a purificarlo. Cien mililitros de MC de fibroblastos confluentes fueron concentrados por liofilización. El concentrado fue sometido a una separación cromatográfica en una columna de sephadex G-75, previamente calibrada con azul dextran (peso molecular (PM) 2,000,000 d), albúmina sérica bovina (PM 68,000 d) y citocromo C (PM 10,400 d) (Tabla 3).

Las fracciones obtenidas de la cromatografía del MC de fibroblastos confluentes, fueron leídas en un espectrofotómetro a 280 nm de longitud de onda, para determinar la posible presencia de proteínas en estas fracciones (Figura 8 y Tabla 3).

PROTEINA	PESO MOLECULAR (Kd)	VOL. DE EXCLUSION (ml)
AZUL DEXTRAN	2×10^3	30
ALBUMINA SERICA BOVINA	68	36
CITOCROMO C	10.4	94
PI	73.5	28.8
PII	23.5	83.2

Tabla 3. Proteínas usadas para calibrar la columna de sephadex G-75 y el volumen de exclusión en el cual fueron obtenidas, así como los volúmenes correspondientes a las fracciones de proteínas obtenidos de la separación cromatográfica del MC de fibroblastos confluentes (PI y PII).

DETERMINACION DE PROTEINAS PRESENTES EN EL MC DE FIBROBLASTOS HUMANOS

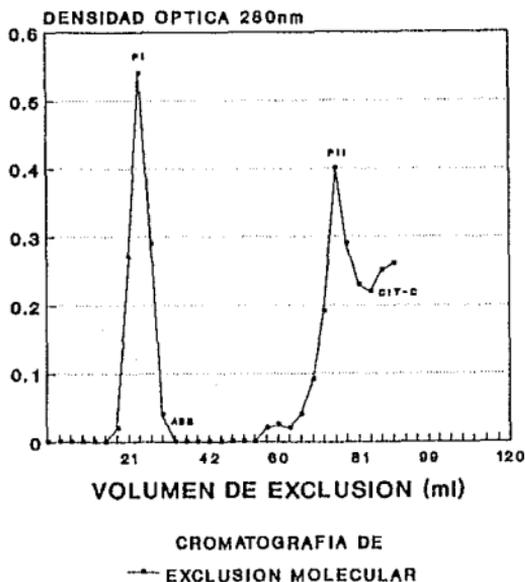


Figura 8: Determinación de proteínas en las fracciones cromatográficas del medio condicionado de fibroblastos humanos confluentes normales, a través de lecturas espectrofotométricas a 280 nm de longitud de onda. PI: Pico I; PII: Pico II; ASB: Albúmina Sérica Bovina; CIT-C: Citocromo C.

Las lecturas de las fracciones obtenidas (figura 8), revelan la aparición de dos picos de proteínas y una zona de interpicos. Las fracciones en los picos fueron denominados como: "PI" y "PII" y a la zona que se encuentra en medio de éstos, se le denominó interpicos "I.5". Como la actividad inhibidora del MC de fibroblastos confluentes podría estar en cualquiera de las fracciones de los picos o en la zona de interpicos, se evaluó el efecto de cada uno de ellos, sobre la proliferación de células epiteliales de la línea tumoral HEP-2 (Figura 9).

La determinación del peso molecular de los picos de proteínas en base a la gráfica de calibración, reveló que el PI corresponde a un peso de 73.5 Kd, mientras que el PII presenta un peso de 23.5 Kd (Tabla 3).

EFFECTO DE LOS PICOS CROMATOGRAFICOS DEL MCFH SOBRE CELULAS TUMORALES

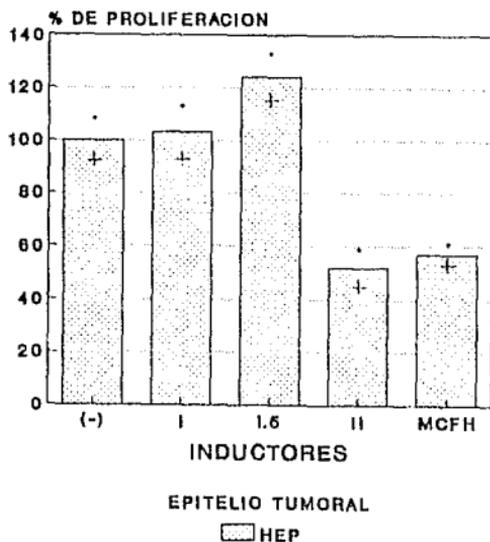


Figura 9: Efecto de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del medio condicionado de fibroblastos confluentes humanos, sobre la proliferación de células tumorales "HEP". (-): Control; I, I.5, II: Fracciones cromatográficas del medio condicionado de fibroblastos confluentes; MCFH: Medio condicionado de fibroblastos humanos.

La actividad inhibitora presente en el MC de fibroblastos confluentes, fue encontrada en la fracción PII, siendo el efecto muy semejante al producido por el medio condicionado de fibroblastos humanos. Esto indica que dicha actividad es ejercida por una proteína de aproximadamente 23.5 Kd. Para determinar de forma más precisa la pureza de la proteína y obtener mayor información sobre el número de proteínas en este pico, se realizó una electroforesis del PII en condiciones no reductoras, en gel de poliácridamida al 10 % y revelado mediante tinción de plata. La separación del PII mediante electroforesis se realizó utilizando 2, 4 y 6 microgramos de proteína total por carril (Figura-10).

Al realizar la separación del PII mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, se observó una proteína de aproximadamente 43.5 Kd. Dicho peso no concuerda con el obtenido en la separación cromatográfica (23.5), sin embargo, debido a que el peso molecular de 43.5 es muy similar al doble del peso de 23.5, indica que la proteína es capaz de dimerizarse, ya sea de manera natural o por causa de los procedimientos de purificación. También se observa una proteína del mismo peso que la albúmina sérica, que puede representar una contaminación con proteínas presentes en las soluciones o más probablemente puede representar un artefacto de revelado, ya que la banda se registra en todos los intercarriles, siendo que sólo se les puso muestra a los carriles marcados con 2, 4 y 6 microgramos.

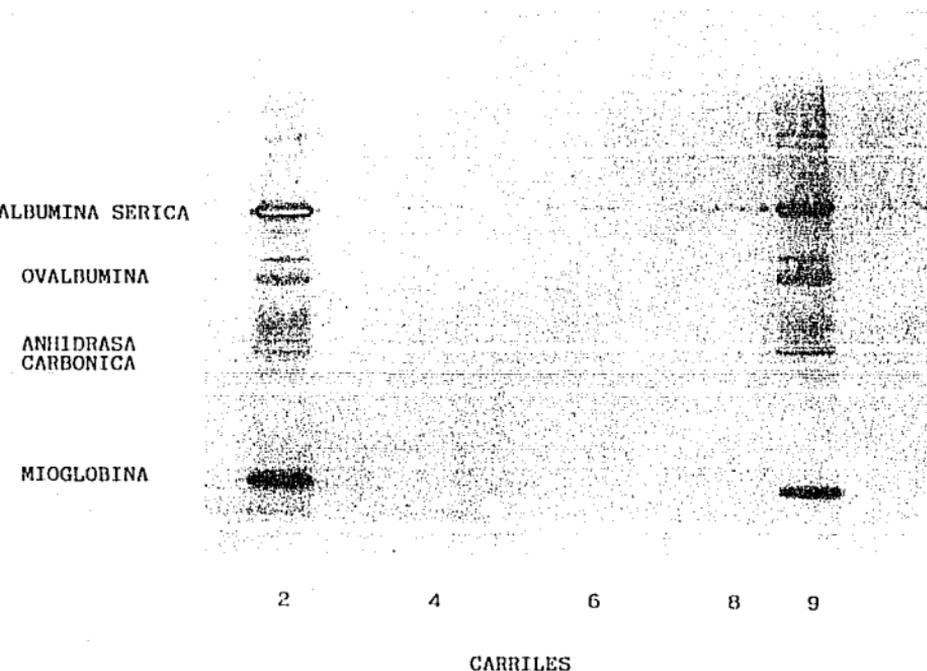


Figura 10: Separación electroforética de la fracción denominada PII, en un gel de poliacrilamida al 10%. La fracción cromatográfica presenta una sólo banda a la altura de la ovalbúmina. Los carriles 2 y 9 contienen a las proteínas de peso molecular conocido (Calibradoras); los carriles 4, 6 y 8 contienen 6, 4 y 2 microgramos de proteína obtenida de la fracción PII respectivamente; a los carriles restantes no se les añadió nada.

El hecho de haber obtenido una sola banda, establece que la proteína se encuentra muy pura, lo cual permite realizar una caracterización bioquímica más profunda. El factor fue caracterizado en el Laboratorio de química biológica (UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE FRANCIA), donde se le realizó una determinación de aminoácidos y azúcares (Tabla 4 y 5).

DETERMINACION DE AMINOACIDOS			
AMINOACIDO	MOL / %	AMINOACIDO	MOL / %
Asp	3.0	Pro	9.0
Glu	12.4	Tyr	0.1
Ser	22.3	Val	4.1
Gly	21.3	Met	0.3
Hys	2.9	Ile	2.9
Arg	1.8	Phe	2.7
Thr	5.0	Cys	1.0
Ala	8.5	Leu	4.5
Lys	4.4		

Tabla 4. Determinación de aminoácidos del factor protéico con actividad inhibidora de la proliferación proveniente de medios condicionados de cultivos de fibroblastos confluentes.

DETERMINACION DE AZUCARES	
TIPO DE AZUCAR	CANTIDAD DE RESIDUOS POR CADA 3 MANOSAS
MANNOSA	3.0
GALACTOSA	2.7
ACIDO NEURAMINICO	0.8
N-ACETIL GLUCOSAMINA	1.0

Tabla 5. Determinación de azúcares del factor protéico con actividad inhibidora de la proliferación proveniente de medios condicionados de cultivos de fibroblastos confluentes.

La determinación de aminoácidos y de azúcares para el factor con actividad inhibidora, revela que se trata de una glicoproteína que es secretada al medio extracelular. De los aminoácidos que constituyen a ésta proteína, se encuentran en un mayor porcentaje los residuos de serina y glicina, pero muy poca cantidad de tirosinas y treoninas. También se observa que la cantidad de residuos de aminoácidos que son capaces de establecer enlaces disulfuro se encuentran en una muy baja proporción.

ANALISIS DE RESULTADOS.

El desarrollo adecuado de un país o población está basado en parte en la buena salud de los individuos que la integran. Cuando una población es asediada por enfermedades, éstas repercuten de manera significativa en su estabilidad económica y social, ya que se requerirá de un mayor recurso económico para atender de forma adecuada cualquier enfermedad. Sin embargo, existen patologías que se les desconoce su causa, mecanismo de acción y diversos factores que impiden el adecuado control de la misma.

La incidencia de enfermedades varía dependiendo de la zona geográfica, las condiciones medioambientales en las que se desarrollan los individuos, la edad y el sexo entre otros factores. Dentro de estas enfermedades, el cáncer es una patología que ha mostrado tener dependencia de todos estos factores además de presentar un incremento en el índice de mortalidad a través del tiempo. En México por ejemplo, junto con las enfermedades gastrointestinales y respiratorias las neoplasias presentan un problema de salud. Debido a ello continuamente se están desarrollando estudios sobre dicha patología. Este trabajo trata de aportar nueva información sobre propiedades inhibitorias de factores secretados por células normales sobre el crecimiento del cáncer cérvico-uterino (CaCu), una neoplasia de alta incidencia en la población femenina de nuestro país.

Nuestro estudio aporta evidencia experimental sobre la ausencia de un factor inhibidor de la proliferación en el desarrollo del CaCu, el cual sí es secretado por las células normales como parte del mecanismo de control de la división de células epiteliales y fibroblásticas normales.

En los últimos diez años el interés en la existencia de factores reguladores de la proliferación celular se ha incrementado. Se han reportado aproximadamente ocho factores biológicos con actividad inhibidora de la proliferación de fibroblastos, otros diez inhibidores de epitelio, dos más que son estimuladores de la proliferación de fibroblastos, cuatro estimuladores para epitelio, dos que inducen a ambos tipos a proliferar y sólo uno que inhibe la proliferación en ambos tipos celulares (Tabla 1). La mayor parte de los factores antes descritos son producidos por células epiteliales o fibroblásticas, los cuales inciden sobre sí mismas o en ambos tipos celulares. En esta lista de factores no están contemplados los factores con actividad inhibidora o estimuladora de la proliferación, producidos por otros tipos celulares, como es el caso de las células ematopoiéticas que actualmente se sabe que los factores de crecimiento ematopoiético ejercen un efecto estimulador de la proliferación de células epiteliales o fibroblásticas. Algunos de estos factores han sido caracterizados parcialmente a nivel molecular y bioquímico.

El estudio de los factores que constituyen el mecanismo que modula la división celular es de importancia, ya que una comprensión detallada de éstos respecto a cómo participan, y sus mecanismos y su modo de acción, contribuirá a comprender mejor diferentes patologías.

Las células epiteliales y fibroblásticas normales, presentan *in vitro*, etapas o fases de crecimiento específico que se expresan de manera secuencial a través del tiempo, estableciendo un comportamiento característico. Este comportamiento no sólo se basa en la velocidad con que proliferan las células, sino también en la producción de moléculas con una función específica con acción autócrina o parácrina.

En la literatura se ha reportado que las células epiteliales y fibroblásticas son capaces de secretar al medio de cultivo moléculas con actividad mitogénica o inhibidora de la proliferación, ejerciendo así una acción autócrina. También se sabe de la estrecha relación entre ambas estirpes celulares, pues los fibroblastos secretan moléculas que afectan a las células epiteliales tanto positiva como negativamente sobre su división celular.

Los resultados de este trabajo mostraron la existencia de una actividad inhibidora presente en el medio condicionada (MC) de fibroblastos confluentes, con una acción autócrina. Dicha actividad es capaz de ejercer su efecto inhibidor sobre fibroblastos que se encuentran en fase de crecimiento exponencial. El hecho de que esta actividad se dé en la fase de confluencia de los cultivos, indica tanto que este factor sólo se presenta en una concentración adecuada a este nivel, como que posiblemente exista alguna señal que se genera cuando los fibroblastos alcanzan la confluencia. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el factor esté presente en la fase exponencial, aunque en concentraciones mínimas incapaces de ejercer su efecto de manera significativa.

El hecho de que los fibroblastos normales humanos secreten un factor que inhibe la proliferación de células epiteliales (acción parácrina), como lo muestran nuestros resultados, confirma la existencia de una estrecha interrelación entre ambos tipos celulares, sugiriendo que quizás su proliferación sea regulada de una manera bilateral a través de factores secretados al medio por ellas mismas.

La carencia de la fase de confluencia en las células tumorales en cultivo, que las lleva a una división continua y rápida, puede explicarse considerando que las células normales secretan al medio de cultivo un factor que inhibe la proliferación de sí mismas en la fase de confluencia, y ya que las células tumorales no presentan dicha fase, indicaría que no secretan dicho factor. Es decir, la fase de confluencia en células normales estaría dada por la secreción de un factor con actividad inhibidora de la proliferación, y que podría ser dependiente de la concentración del factor dada por la densidad celular. Es necesario analizar el porqué las células tumorales adolecen de una fase de confluencia, ya que podría deberse ya sea a que no son capaces de secretar o producir el factor con actividad inhibidora similar al encontrado en los MC de células normales, o bien, podría ser por una alteración en el receptor para este factor.

Las células tumorales provenientes de cérvix y la línea epitelial HEP de tumor de laringe, mostraron una inhibición en su proliferación en presencia del factor inhibidor de la

proliferación presente en los MC de células epiteliales y fibroblásticas normales, indicando por tanto que las células tumorales presentan receptores para tal factor con actividad inhibitoria. Entonces se podría pensar que no son capaces de producir o de secretar el factor de manera adecuada para regular su división como lo hacen las células normales. Esto último es apoyado por nuestros resultados en donde las células provenientes de tumor de cérvix no presentan una inhibición de la proliferación cuando son expuestas a su propio medio obtenido en fase de saturación. Además, el hecho de que las células HEP al igual que las provenientes de tumor de cérvix respondan de la misma manera al factor inhibitorio, indica que quizá el factor tenga un efecto común sobre células epiteliales, independientemente del órgano del cual sean obtenidas.

Nuestros resultados muestran la existencia de un factor inhibitorio presente tanto en los MCs de células epiteliales como fibroblásticas normales. El hecho de que resultó ser más fácil cultivar fibroblastos que epitelio de cérvix, nos llevó a tomar la decisión de caracterizar únicamente al factor proveniente de fibroblastos. Aunque sería conveniente en un futuro el obtener el factor inhibitorio secretado por células epiteliales con fines comparativos.

En el MC de fibroblastos saturantes se puede encontrar una diversidad de moléculas de diferente naturaleza bioquímica. Para determinar si el factor inhibitorio era de naturaleza proteica el MC que contiene tal factor se incubó en presencia de una proteasa. Es conocido que la mayoría de los factores que intervienen en el mecanismo de regulación de la división son moléculas de naturaleza proteica de bajo peso molecular, por lo que se esperaba que el factor con actividad inhibitoria fuera de naturaleza proteica. Cuando el MC de fibroblastos confluentes fue expuesto a una proteasa (tripsina), se observó que su efecto inhibitorio fue afectado significativamente por la enzima, indicando por tanto que el factor es de naturaleza proteica. El que no se haya abatido totalmente el efecto, puede deberse, a que no se utilizó la concentración adecuada de la proteasa o que existe un sinergismo con alguna otra molécula presente en el MC.

El haber obtenido evidencias de que el efecto inhibitorio presente en el MC de fibroblastos confluentes es ejercido por un factor de naturaleza proteica, nos permite emplear técnicas propias de este tipo de biomoléculas para su caracterización molecular, ya que en el MC existe gran variedad de proteínas secretadas por las células además de las proteínas presentes en el SFB. Para caracterizar dicho factor, se realizó una separación cromatográfica del MC de fibroblastos confluentes. Después de la separación se encontró que la actividad inhibitoria del MC estaba presente en la fracción correspondiente a los 23,500 d. También, se observó que podría existir una proteína en las fracciones que constituyen la zona de interpicos con actividad estimuladora de la proliferación, lo cual no sería raro ya que se sabe que estas células son capaces de secretar moléculas con dicha actividad.

Para determinar la pureza del factor, se realizó una separación de la fracción que contenía a la proteína inhibitoria

mediante electroforesis. La separación mostró que se trata de una sola proteína puesto que sólo se observó una banda de aproximadamente 43,500 d (Figura 10). Sin embargo, el peso molecular de dicha proteína no corresponde con el peso de la proteína obtenida en la separación cromatográfica. El peso molecular obtenido mediante la electroforesis fue de 43,500 d, el cual es aproximadamente el doble del peso de 23,500 d de la separación cromatográfica. Esto sugiere que la proteína obtenida en la fracción cromatográfica, tiene la capacidad de dimerizarse. Es necesario realizar una electroforesis en condiciones reductoras para determinar si en realidad se trata de un dímero que fue agregado por los procedimientos de concentración (liofilización). Lo que es claro, es que se trata de un factor protéico, que es secretado por las células fibroblásticas normales provenientes de cérvix normal, y cuyo efecto es dependiente de la densidad celular. El hecho de haber aislado un factor protéico con actividad inhibitora de la proliferación de células epiteliales y fibroblásticas, genera otras cuestiones, tales como: si se trata de un factor nuevo que debe añadirse a la lista de factores inhibidores ó se trata de un factor ya descrito. En el caso de tratarse de un factor ya reportado, podría proponerse como un agente terapéutico para el tratamiento del CaCu, sólo o en combinación con otras terapias. En el caso de tratarse de un factor nuevo, tendría que ser caracterizado bioquímica y molecularmente para proponerlo como un candidato terapéutico en el tratamiento del CaCu. De cualquier manera, se abren expectativas para establecer nuevas terapias para el tratamiento del CaCu, cuya incidencia es alta en nuestro país.

La caracterización parcial, realizada en este trabajo del factor inhibidor establece que se trata de una glicoproteína. La comparación de esta glicoproteína con los factores inhibidores reportados y caracterizados hasta su secuenciación aminoácida, sugiere que esta glicoproteína contiene un porcentaje muy bajo de cisteínas y metioninas, rasgo por demás relevante ya que los factores inhibidores caracterizados como el TGF-Beta, el INF, TNF, presentan un número determinado de cisteínas como parte de su constitución aminoácida (42), sugiriendo que el factor inhibidor secretado por fibroblastos provenientes de cérvix normal podría ser un factor diferente.

El hallazgo de un factor de naturaleza protéica secretado por células normales con actividad inhibitora de la proliferación sobre células tumorales, podría implicar que el estado transformado de las células tumorales de CaCu está relacionado de manera directa con la falta de producción del inhibidor.

La generación de un factor inhibidor endógeno sería de mucha utilidad en el diseño de terapias antitumorales, es por ello que debe continuarse con el estudio y caracterización del mecanismo de acción de este tipo de inhibidor de la proliferación celular, para proceder a su purificación y clonación para su producción recombinante con posibilidades de aplicación clínica.

CONCLUSIONES

- 1.- Las células epiteliales y fibroblásticas normales provenientes de cérvix normal son capaces de secretar un inhibidor de la proliferación celular.
- 2.- El factor inhibidor de la proliferación actúa tanto en las células normales que lo producen, como en células derivadas de tumores de cérvix y las provenientes de la línea tumoral de laringe humana "HEP-2".
- 3.- El efecto inhibidor de la proliferación presente en el medio condicionado por fibroblastos normales de cérvix, está asociado a una glicoproteína de 23,500 d.
- 4.- Los medios condicionados de células tumorales provenientes de cáncer cérvico-uterino y de la línea tumoral "HEP-2", no presentan una actividad inhibidora de la proliferación sobre si mismas ni entre ellas.

APENDICES

APENDICE 1

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO EAGLE

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, utilizando para ello dos matraces. Se adicionan 13.4 g/l de medio de Eagle en polvo (Gibco Laboratories U.S.A.) agitándose suavemente, se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin. Se completa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del que se desea, que es de 7.2 (con ácido clorhídrico) y se esteriliza por filtración con membrana de poro de 0.22 u.

Composición del Medio Mínimo Esencial de Eagle

Aminoácidos	Concentración (mg)
L-Arginina.....	84.00
L-Cistina.....	62.57
L-Glutamina.....	584.00
Glicina.....	30.00
L-Histidina HCl, H ₂ C.....	42.00
L-Isoleucina.....	105.00
L-Leucina.....	105.00
L-Lisina, HCl.....	146.00
L-Metionina.....	30.00
L-Fenilalanina.....	66.00
L-Serina.....	42.00
L-Treonina.....	95.00
L-Triptofano.....	16.00
L-Tirosina (sal disódica).....	104.00
L-Valina.....	94.00
Vitaminas	
D-Ca Pentotenato.....	4.00
Cloruro de Colina.....	4.00
Acido Fólico.....	7.20
Inositol.....	7.20
Nicotinamida.....	4.00
Piridoxal.....	4.00
Rivoflavina.....	0.40
Tiamina.....	4.00
Sales Inorgánicas	
Cloruro de Calcio Anhidro.....	200.00
Nitrato de Hierro III Nonhidratado.....	0.10
Cloruro de Potasio.....	400.00
Sulfato de Magnesio Anhidro.....	97.67
Cloruro de Sodio.....	6400.00
Fosfato monosódico monohidratado.....	125.00
Otros compuestos	
L-Glucosa.....	4500.00
Rojo Fenol.....	15.00

APENDICE 2

PREPARACION DE LA SOLUCION DE GLUTARALDEHIDO EN SAF

La solución amortiguadora de fosfatos (SAF) se prepara añadiendo a un volumen de 950 ml de agua destilada a 4 °C los siguientes reactivos.

Cloruro de sodio.....	8.0 g
Fosfato de potasio diácido.....	0.2 g
Fosfato de sodio dibasico (dodecahidratado).....	2.9 g
Cloruro de potasio.....	0.2 g

Posteriormente se agita vigorosamente, se ajusta el pH a 7.2, se afora a 1 litro y se esteriliza a 20 lb de presión durante 20 min.

La solución de glutaraldehido en SAF se prepara adicionando 0.090 ml de glutaraldehido al 50 % de pureza en 90 ml de SAF, se afora a 100 ml y se filtra con membrana de poro de 0.22 μ .

APENDICE 3

PREPARACION DEL COLORANTE CRISTAL VIOLETA

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6.0, la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 ml de ácido fórmico aforados a 500 ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución de cristal violeta es filtrada y posteriormente usada.

APENDICE 4

PREPARACION DE LA SOLUCION DE TRIPSINA 0.05%

La solución de tripsina se prepara añadiendo 0.05 g de tripsina (Sigma Chemical U.S.A) en 100 ml de Solución de verseno.

APENDICE 5

PREPARACION DE SOLUCION DE VERSENO

A 800 ml de agua bidestilada se adicionan las siguientes sustancias:

Compuestos	Concentración (g/L)
Tris base.....	3.04
Cloruro de Sodio.....	8.00
Cloruro de Potasio.....	0.40
Etilén-diamín-tetra-acético (EDTA).....	0.20

Posteriormente se disuelven perfectamente los compuestos con el agua, y se afora a un litro con agua bidestilada, ajustandose el pH a 7.7 con ácido clorhídrico 10 N y se esteriliza por medio de autoclave a 20 lb durante 20 minutos.

APENDICE 6

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales fueron sometidos a dos pruebas estadísticas, una denominada ANDEVA o análisis de varianza que establece un valor medio denominada "Gran Media" con una distribución de los datos de una manera normal y nos dice que tan alejadas están los valores promedios de las muestras de nuestros ensayos con respecto a la gran media, lo que determina si la muestra presenta un comportamiento de distribución normal o no; la segunda prueba denominada prueba de diferencia significativa mínima (DSM) de Fisher se realiza cuando el análisis de varianza indica que existe diferencia entre las medias de dos o más poblaciones, indicandonos entre que pares de medias existe esta diferencia.

La DSM se define como la diferencia mínima que puede existir entre dos medias de muestras significativamente diferentes.

De este análisis se obtuvo que en los ensayos mostrados en las figuras 4, 5 y siete, existe una diferencia de las muestras con respecto al control. El ensayo de la figura seis, las muestras no presentan diferencia significativa con respecto al control. En el ensayo de la figura 9, todas las muestras fueron diferentes con respecto al control excepto la muestra denominada FHI que es igual al control. El análisis estadístico fue realizado con una probabilidad del 95% o $p = 0.05$

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kruse, P.F. and Patterson, M.K. Jr. (1973). Tissue Culture: Methods and Applications. Academic Press. New York. 868pp.
- 2.- Norman, J.T., Kujubu, D. and Fine, L.J. (1989). Regulation of epithelial cell growth *in vitro*. In: functional epithelial cells in culture. Alan R. Liss Ed. New York. pp. 165-191.
- 3.- Ham, A.W. (1987). Histology. 9a ed. J.B.Lippincott Company. New York. pp. 189-228.
- 4.- Lippmant, M.E. and Dickson, R.B. (1989). Mitogenic regulation of normal and malignant breast epithelium. Yale J. Biology and Medicine. 62:459-480.
- 5.- Leeson, C.R., Leeson, T.S. y Paparo, A.A. (1987). Histologia. 5a. ed. Nueva Editorial Interamericana. México. pp. 102-156.
- 6.- De Robertis, E., Saez, F.A. and De Robertis, E.M.F. Jr. (1975). Cell Biology. Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, E.U.A. 615 pp.
- 7.- Waterfield, M.D. (1989). British Medical Bulletin: Growth Factors. Ed. British Council. London. 45(2): 600 pp.
- 8.- 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(6):1261-1265.
- 9.- Lemaire, I. and Dubois, C. (1983). In vitro suppression of fibroblast growth inhibitory lymphokine production by asbestos. Clin. Exp. Immunol. 53(1):239-248.
- 10.- Iype, P.T. and McMahon, J.B. (1984). Hepatic proliferation inhibitor. Mol. Cell. Biochem. 59(1-2):57-80.
- 11.- Mordan, L.J. and Toback, F.B. (1984). Growth of kidney epithelial cells in culture: evidence for autocrine control. Am. J. Physiol. 246(3):C351-C354.
- 12.- 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(3):793-796.
- 13.- Dohlman, J.G., Payan, D.G. and Goetzl, E.J. (1984). Generation of a unique fibroblast-activating factor by human monocytes. Immunology. 52(3):577-584.

14.- Gaffney, E.V., Tsai, S.C., Lingenfelter, S.E., Dell-Aquilla, 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(5):489-500.

15.- 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(1):101-106.

16.- 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(7):2107-2111.

17.- 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(2):203-210.

18.- 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 nonmalignant rat liver cells when compared with Rous sarcoma virus-transformed rat liver cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 21(1):62-66

19.- Sladen, J.G., Mandl, M.A., Grossman, L. and Denegri, J.F. (1985). Fibroblast inhibition: a new and treatable cause of prosthetic graft failure. *Am. J. Surg.* 149(5):587-590.

20.- Holley, R.W., Baldwin, J.H., 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(18):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 os AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicative interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82(12):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(4):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(34):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(2):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(23):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(3):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(25):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(3):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(4):653-658.
- 31.- Stein, G.H. and Atkins, L. (1986). Membrane-associated inhibitor of DNA synthesis in senescent human diploid fibroblasts: characterization and comparison quiescent cell inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(23):9030-9034.
- 32.- Ohta, M., Greenberger, J.S., Anklesaria, P., Bassols, A. and Massague, J. (1987). Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature.* 329(6139):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(15):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(3):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(4):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-tomorigenic ones: its species, and mode of existence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148(3):1215-1222.
- 38.- Strayer, D.S. and Leibowitz, J.L. (1987). Inhibition of epidermal growth factor-induced cellular proliferation. *Am. J. Pathol.* 128(2):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(3):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(5):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(3):275-284.

- 44.- Keski-Oja, J., Raghov, 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(7):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(14):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(2):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(2):455-460.
- 49.- Rogalsky, V., Svet-Moldavsky, I., Arlin, Z., Dent, T. and Holland, J.F. (1988). Fibroblast growth inhibitor. *Biomed. Pharmacother.* 42(8):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(2):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(10):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(5):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(7):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(3):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(4):1877-1884.
- 57.- Hubbs, A.F., Hahn, F.F. and Thomassen, D.G. (1989). Increased resistance to transforming growth factor beta accompanies neoplastic progression of rat tracheal epithelial cells. *Carcinogenesis.* 10(9):1599-1605.
- 58.- Rollins, B.J., O'Connell, T.M., Bennett, G., Burton, L.E., Stiles, C.D. and Rheinwald, J.G. (1989). Environment-dependent growth inhibition of human epidermal keratinocytes by recombinant human transforming growth factor-beta. *J. Cell. Physiol.* 139(3):455-462.
- 59.- 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(5):1578-1582.
- 60.- Carr, B.I., Huang, T.H., Itakura, K., Noel, M. and Marceau, N. (1989). TGF beta gene transcription in normal and neoplastic liver growth. *J. Cell. Biochem.* 39(4):477-487.
- 61.- 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(2):393-399.
- 62.- 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.
- 63.- Mich, H. and Chen, J. (1989). Transforming growth factor-beta inhibits cellular adenylate cyclase activity in cultured human arterial endothelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25(1):101-104.
- 64.- Elder, J.T., Fisher, G.J., Lindquist, P.B., Bennett, G.L., Pittelkow, M.R., Coffey, R.J. Jr., Ellingsworth, L., Derynck, R. and Voorhees, J.J. (1989). Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science.* 243(4892):811-814.

- 65.- 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(3):526-530.
- 66.- 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(21):12449-12454.
- 67.- 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(1):247-257.
- 68.- 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(1):143-151.
- 69.- 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(2):415-423.
- 70.- 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(1):83-89.
- 71.- 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(2):795-801.
- 72.- 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(6):967-971.
- 73.- 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(1):79-82.
- 74.- Baud, L., Pérez, J., Cherqui, 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(2):C232-C239.

- 75.- 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(3):103-111.
- 76.- 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(3):1185-1194.
- 77.- 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(3):123-128.
- 78.- 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(3):488-495.
- 79.- Kellery, J., Kovacs, E.J., Nicholson, K. and Fasibisiak, J.P. (1991). transforming growth factor-beta production by lung macrophages and fibroblasts. *Chest.* 99(3):S85-S86.
- 80.- Kelley, J., Fabisiak, J.P., Hawes, K. and Absher, M. (1991). Citokine signaling in lung - transforming growth factor-beta secretion by lung fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 260(2):L123-L128.
- 81.- 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(1):15-20.
- 82.- Watkins, L.F. and Levine, A.E. (1991). Diferential role of transforming growth fator-alpha in two human colon-carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 47(3):455-460.
- 83.- Krieg, P., Schnapke, R., Furstenberger, G., Vogt, I. and Marks, F. (1991). TGF-beta1 and skin carcinogenesis - antiproliferative effect *in vitro* and TGF-beta1 messenger RNA expression during epidermal hyperproliferation and multistage tumorigenesis. *Mol. Carcinogenesis.* 4(2):129-137.
- 84.- 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(1):166-175.
- 85.- 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. *Can. Met. Rev.* 9(3):203-226.

- 86.- 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(4):659-663.
- 87.- 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(1-2):111-114.
- 88.- Goldfarb, M., Deed, R., Macallan, D., Walter, W., Dickson, C. and Peters, G. (1991). Cell transformation by int-2 - a member of the fibroblast growth factor family. *Oncogene*. 6(1):65-71.
- 89.- Yayon, A. and Klagsbrun, M. (1990). Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Can. Met. Rev.* 9(3):191-202.
- 90.- Wilson, E.L., Rifkin, D.B., Kelly, F., Hannocks, M.J. and Gabrielove, J.L. (1991). Basic fibroblast growth factor stimulates myelopoiesis in long-term human bone marrow cultures. *Blood*. 77(5):954-960.
- 91.- Westermann, R., Grothe, C. and Unsicker, K. (1990). Basic fibroblast growth factor (bFGF), a multifunctional growth factor for neuroectodermal cells. *J. Cell Sci.* 45:97-117.
- 92.- 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(1):73-80.
- 93.- 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(1):64-68.
- 94.- Rodríguez, 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(3):745-750.
- 95.- Cozzolino, F., Torcia, M., Aldinucci, D., Ziche, M., Almerigogna, F., Bani, D. and Stern, D.M. (1990). Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(17):6487-6491.

- 96.- Kilian, P.L., Kaffka, 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 (NIH:OVCAR-3). *Cancer Research*. 51(7):1823-1828.
- 97.- 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(4):2415-2422.
- 98.- 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(12):3304-3310.
- 99.- 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. *Mol. Endocrinol.* 5(3):452-459.
- 100.- Osteen, K. and Anderson, T.L. (1991). Effect of estrogen on human endometrial epithelial cell growth and differentiation *in vitro*. *Steroids*. 56(5):279-283.
- 101.- Uchima, F.D.A., Edery, M., Iguchi, T. and Bern, H.A. (1991). Growth of mouse endometrial luminal epithelial cells *in vitro* functional integrity of the oestrogen receptor system and failure of oestrogen receptor system and failure of oestrogen to induce proliferation. *J. Endocrinology*. 128(1):115-120.
- 102.- 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*. 2:170-176.
- 103.- Lavagna, C., Douzinas, E., Nano, J.L. and Rampal, P. (1990). Purification and biological properties of an epithelial intestinal cell growth inhibitor from a human small intestine. *Biochim. Biophys. Acta*. 1051(3):259-265.
- 104.- 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(2):433-439.
- 105.- 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. *Mol. Cell. Biol.* 11(2):1138-1145.

- 106.- 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. *Mol. Carcinogen.* 4(1):25-35.
- 107.- Scully, J.L. and Edwards, P.A.W. (1991). Transformation of a mammary epithelial cell line by the v-ras and v-mos oncogenes. *International J. Cancer.* 48(1):128-135.
- 108.- 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(3):673-685.
- 109.- 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(1):55-62.
- 110.- 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(11):2797-2802.
- 111.- 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(34):22968-22974.
- 112.- 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(8):5608-5613.
- 113.- 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(2):277-283.
- 114.- 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(9):719-726.
- 115.- 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(33):22661-22670.

- 116.- 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(5):1178-1184.
- 117.- Besner, G.E. and Klagsbrun, M. (1991). Macrophages secrete a heparin-binding inhibitor of endothelial cell growth. *Microvasc. Res.* 42(2):187-197.
- 118.- Bruce, A., Bray, D., Watson, I.D., Lewis, J., Raff, M. and Roberts, K. (1989). *Molecular biology of the cell*. Ed. Garland Publishin, New York, pp.618.
- 119.- 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.
- 120.- Abelson, J. (1979). RNA procession and the intervening sequence problem. *Annu. Rev. Biochem.* 48:1035-1069.
- 121.- Stoker, M., G. (1973). Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. *Nature*. 246:200-203.
- 122.- Pierce, G.B., Shikes, R. and Fink, L.M. (1978). *Cancer: A problem of developmental biology*. Ed. Englewood Cliffs. N. Jersey.
- 123.- Ponten, J. (1976). The relationship between *in vitro* transformation and tumor formation *in vivo*. *Biochem. Biophys. Acta.* 458:397-422.
- 124.- 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.
- 125.- Hunter, T. (1980). Proteins Phosphotylated by the RSV transforming function. *Cell*. 22:647-648.
- 126.- Dustin, P. (1980). Microtubules. *Sci. Amer.* 243:59-69.
- 127.- 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.
- 128.- Stern, P. (1991). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. From: Paterson Simposium No. 26. 28-30 th October 1991. Manchester, England.
- 129.- Rommery, S.L., et.al. (1980). *Gynecology and Obstetrics: The Healt Care of Women*. 2a. Mc.Graw-Hill.

- 130.- Krupp, M.A. and Chatton, M.J. (1982). *Diagnóstico Clínico y Tratamiento*. 17a. Ed. El manual Moderno, S.A. 1324 pp.
- 131.- Thorn, G.W., Adams, R.D., et.al. (1979). *Medicina Interna de Harrison*. 5a. Ed. La Prensa Médica Mexicana S.A. 2499 pp.
- 132.- Haley, N.J., Hoffmann, D. and Wynder, E.L. (1986). Uptake of tobacco smoke components. In: Hoffmann, D., Harris, C.C., eds. *Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 186:3.
- 133.- 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.
- 134.- 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. p.930.
- 135.- Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptive. (1985). Invasive cervical cancer and combined oral contraceptives. *Brit. Med. J.* 290:961
- 136.- 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.
- 137.- McNab, J. (1991). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. From: Paterson Symposium No. 26. 28-30th October, 1991. Manchester, England.
- 138.- Rulison, R.H. (1942). Spontaneous regression of human papillomas. *Arch. Dermatol. Syphilol.* 46:66.
- 139.- Massing, A.M. and Epstein, W.L. (1963). Study of human papilloma virus lesions. *Arch. Dermatol.* 87:306.
- 140.- Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K. and Howley, P.M. (1988). Benignant human larynx lesions and human Papilloma Virus type 6. *Cell*. 53:539.
- 141.- Kanda, T., Watanabe, A. and Yoshiike, K. (1988). Different human lesions are caused by the family of human Papilloma Virus. *Virology*. 165:321.
- 142.- Orth, G., Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., Jablonska, S., Obalek, S., Jarzabek-Chorslezka, M. and Rzeska, G. (1980). Skin cancer and human Papilloma Virus. Cold Spring Harbor Conf. Cell proliferation. 7:259.
- 143.- Orth, G. (1986). Human Papilloma Virus is a high risk factor in skin cancer. *Ciba Fund. Symp.* 120:157.

- 144.- Zur Hausen, H. (1988). Prevalence of human Papilloma Virus type 16 and 18 in cervical cancer. *Mol. Carcinogenesis*. 8:147.
- 145.- Walboomers, J. and Schiffman, M. (1991). Human Papillomaviruses and Cervical cancer. From: Paterson Symposium No. 26. 28-30th October, 1991. Manchester, England.
- 146.- Sousa, R., Dostanti, N. and Yaniv, M. (1990). Control of Papillomavirus gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1032:19.
- 147.- Peto, R. and Zur Hausen, H. (1986). Viral Etiology of cervical cancer. 21, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 148.- 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*, p. 11. CRC Press, Boca Raton.
- 149.- 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.
- 150.- Morrison, E., Ho, G., Vermund, S., Goldberg, G., Kadish, A., Kelley, K. and Burk, R. (1991). Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int. J. Cancer*. 49:6.
- 151.- 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(1):29.
- 152.- Prempre, T., et.al. (1982). Radiation treatment of carcinoma of the cervix with extension into the endometrium. *Cancer*. 49:20.
- 153.- 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(1):1239.
- 154.- Kueng, W., Silber, E. and Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry* 182:16-19.
- 155.- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- 156.- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-683.

157.- Oakley, B. R., Kirsch D. R. and Morris, N. R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. *Anal Biochem.* 105:361-363.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Benny Weiss Steider por el apoyo y las enseñanzas recibidas durante la realización del presente trabajo.

De la misma manera agradezco al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por su amistad, comprensión y enseñanzas que permitieron el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a los compañeros del laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer por sus consejos, comprensión y paciencia.

Así mismo agradezco a la Dra. Maria Isabel Soto Cruz, al Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo, al Dr. Luis Felipe Jiménez García, al Dr. Luis Felipe Montaña Estrada, a la M en C. Luisa Alvarina Alba Lois y muy en especial a la Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet por la acertada revisión y orientación de este trabajo.

Expreso mi gratitud a mis amigos el Biol. Marco Antonio Hernandez y el Biol. Hugo Alberto Barba por su amistad y comprensión brindadas.

Finalmente doy las gracias a los Srs. Ranulfo Pedraza y José Chavarria por su valioso apoyo técnico.