



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACION DEL EFECTO DEL TGF-β Y EL TNF-α SOBRE LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES CaLo, InBI Y HeLa PROVENIENTES DE CERVIX HUMANO.

29/10/09

T E S I S

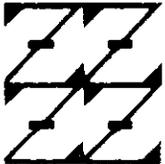
PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

FLORES GUZMAN FERNANDO

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO ES DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. LUIS SANCHEZ SANCHEZ

MEXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

El presente estudio, fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza, UNAM bajo la dirección del Dr. Luis Sánchez Sánchez.

Durante el desarrollo del presente estudio, se contó con el apoyo de becas de Fundación UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre Atanacia Guzmán González por apoyarme aún en la adversidad y porque creo me ha sabido guiar y dar consejos.

A mis hermanos Ma. Esther, Ma de Jesús y Enrique, así como a mis sobrinos Josué Ruperto, Claudia Alejandra y Dulce.

A los compañeros de la FES Zaragoza, los compañeros de la carrera de Biología, tanto a los amigos recientes y a los no tan recientes.

Al Dr. Benny Weiss Steider por ser el iniciador de este laboratorio.

Al Dr. Benny Weiss Steider, al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, al M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez, a la Biól. Cristina Alvarado Domínguez y a la Dra. Rebeca López Marure por sus valiosas aportaciones y contribuciones en la mejora de la presente tesis.

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez por dedicarle parte de su tiempo a mi formación como investigador.

A los profesores y compañeros del laboratorio; a Raulfo Pedraza por su asistencia técnica.

A :

Maricela Mojica Aviles

Selene Razo Sánchez, Daniel Rojas Alba, Luis Fernando Juárez Caballero, Marta Castro Manreza, Jesús Flores Flores, Igor Ortega Mikolaev, Fabiola Martínez Lima, Gisela Gutiérrez Iglesias, Carolina Flores Marroquín, Ma. Antonieta Chávez González.

Gisela Gutiérrez: Por ser una excelente amiga.

Una muy especial admiración a la Dra. Rebeca por nunca dejarse vencer y seguir siempre adelante.

Antonieta Chávez por ser tan directa, honesta y chambeadora.

A Alfonso Martínez Orihuela. (Mounstrón) Quién es ejemplo de vencer la adversidad.

Hugo Lira Hernández (mounstrín)

Juana Romero Serrano.

A los hermanitos Jesús (*Padrecitus-Robocopceae*)-Igor (*Petunius venadienciae*).

A mis amigos y compañeros del Museo de Ciencias *UNIVERSUM*, Beatriz Martínez, Elizabeth Moreno, Carlitos el can, Elba, al jefe de la sala de Energía Juan Ramón, a Hilda Medrano (Biodiversidad), Javier (el saiver de Biología humana), Raimundo (Química), Lupita (atención al público) y a la M. en C. Julieta Fierro (directora del museo).

A todos los miembros y amigos del CGH que dividios o no (o así fue como siempre lo intentó mostrar la prensa) siempre estaré apoyando la causa. Hasta la victoria siempre.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )	4
Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ )	8
Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- $\alpha$ )	12
Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ )	16
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	49
APÉNDICE	58

## ABREVIATURAS

$[\beta\text{-}^3\text{H}]\text{dTTP}$	Desoxirribonucleótido de Timina marcado con el isótopo tritio de emisión de partículas beta (análogo de la pirimidina Timina).
cpm	cuentas por minutos (unidad de lectura para el contador de centelleo)
ELISA	Inmunoensayo acoplado a una enzima (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)
g	gravidades
h	hora
IFN- $\gamma$	interferón gamma
IL-1 $\beta$	interleucina uno beta
IgG	inmunoglobulina cuyo isotipo es G (anticuerpo con cadena pesada $\alpha$ ).
mAb	anticuerpo monoclonal
MC	medio condicionado
MCC	medio condicionado concentrado
MCC c/s	medio condicionado concentrado con suero
MCC s/s	medio condicionado concentrado sin suero
$\mu\text{g}$	microgramos
$\mu\text{L}$	microlitros
mL	mililitro
nm	nanometros (medida longitud de onda).
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RPMI-1640	medio nutritivo 1640 (Roswell Park Mererial Institute)
rpm	revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal de Bovino
SSV	Solución Salina de Verseno
(v/v)	dilición porcentual volumen / volumen
(w/v)	dilición porcentual masa / volumen
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa (Factor NecrosisTumor alpha)
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Tranformante beta (Tranforming Growth Factor beta).

## RESUMEN

La inhibición de la división celular, es un mecanismo importante en el control de la progresión del ciclo celular en células normales. Tal regulación ocurre por la participación de citocinas que inducen la progresión del ciclo o su detención. La citocina anti-inflamatoria TGF- $\beta_1$  (Factor de Crecimiento Transformante-beta-1) y la proinflamatoria TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis tumoral alfa), han sido descritas como fuertes inhibidores de la proliferación de células normales, así como de carcinomas humanos. No obstante, se han encontrado carcinomas que han mostrado resistencia a tal inhibición por estas citocinas. En el caso particular del carcinoma cérvico-uterino (CaCu), no es claro el papel que juegan el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$ . En el presente estudio, se examinó el efecto del TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$ , sobre la capacidad proliferativa de células normales así como de las líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa, procedentes de cérvix humano. Los resultados establecen que en las células normales, el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  exógenos abatieron la proliferación de las células epiteliales, medida por la incorporación de timidina tritiada, mientras que las células fibroblásticas sólo disminuyeron con el TGF- $\beta_1$ . Sin embargo, ambas citocinas aumentaron la capacidad proliferativa en CaLo, InBl y HeLa hasta en un 110%. Este resultado generó la posibilidad de que las líneas tumorales fueran capaces de producir dichas citocinas, lo cual fue confirmado por el inmunoanálisis enzimático de ELISA, donde se detectó al TGF- $\beta_1$  y al TNF- $\alpha$  en concentraciones de picogramos/mL. Además, tales células son capaces de secretar ambas citocinas de manera bioactiva en medios de cultivo con y sin suero, a excepción de los sobrenadantes sin suero que contienen el TNF- $\alpha$  inactivo. Por último, se determinó que ambas citocinas endógenas participan en la capacidad proliferativa de las células tumorales, ya que dicho crecimiento fue bloqueado hasta en un 25% por los anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra estas citocinas. Los resultados obtenidos, sugieren que el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  endógenos son utilizados por las células tumorales para incrementar su capacidad proliferativa.

## INTRODUCCIÓN

En una célula eucarionte normal, el estricto control del ciclo celular está regulado por un amplio espectro de factores de crecimiento (moduladores biológicos) (Meager, 1991; López-Marure, 1997). Tales factores son secretados por múltiples tipos celulares, tanto normales como transformados (Lange *et al.*, 1992; Margni, 1996; Konstantopoulos & Burgess, 1997; Molema *et al.*, 1999). Entre la mayoría de los moduladores de la proliferación celular destacan las citocinas, las cuales son glucoproteínas solubles de alta homología estructural (Meager, 1991; Santos-Argumedo, 1994). Tales moduladores ejercen su actividad de manera autócrina, parácrina o endócrina, intervienen en una fase determinada del ciclo celular, son capaces de regular la diferenciación, la activación y la proliferación de varios tipos celulares, comúnmente presentan actividad pleiotrópica, redundante (diferentes citocinas son capaces de inducir el mismo efecto biológico) y sinérgica, circulan por los fluidos corporales, actúan a concentraciones extremadamente bajas (en niveles de picogramos y femtomolar), tienen un tiempo de vida media muy corta y ejercen su efecto en determinadas células blanco al interactuar con receptores de membrana específicos de alta afinidad ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) (Carl-Henrik, & Bengt, 1989; Meager, 1991; Bendzten, 1994; Santos-Argumedo, 1994; Abbas, 1996; Alberts, 1996; Chávez, 1997; Janeway-Travers, 1997; Regueiro & López, 1998).

Se ha postulado que el resultado final entre proliferar o detener el ciclo celular es consecuencia de una interacción compleja entre los procesos estimuladores e inhibidores activados por estos factores (Carl-Henrik & Bengt, 1989; Stein *et al.*, 1995; López-Marure, 1997). Dichos factores se han agrupado en tres categorías: los factores de competencia, que sacan a las células de su estado de reposo  $G_0$ ; los factores de progresión, que inician el ciclo celular, permitiendo el paso de  $G_1$  a S y los factores antiproliferativos, que aún en presencia de factores de competencia y de progresión, son capaces de interrumpir el paso de  $G_1$  a S (Murray, 1994; López-Marure, 1997; Neufeld & Bruce, 1998; Guo & Hay, 1999; Planas-Silva & Weinberg, 1999; Zhang, 1999).

Entre los factores antiproliferativos de células normales y principalmente de carcinomas, destacan los mediadores de la inflamación como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), la interleucina uno beta (IL-1 $\beta$ ), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) (Goustin *et al.*, 1986; Tabibzadeh *et al.*, 1988; Kilian *et al.*, 1991; Boente *et al.*, 1992; Malejczyk *et al.*, 1992; Zeller *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1998; Wikstrom *et al.*, 1999). La regulación negativa de la proliferación celular no está restringida a la familia de las citocinas, también se encuentran en el grupo de las hormonas. No obstante, a las citocinas se les ha atribuido un mayor espectro de actividades biológicas, destacando la promoción de la diferenciación celular, la inducción de la proliferación celular y la inhibición del crecimiento en células tumorales (Nathuan & Sporn, 1991; (Mire-Sluis & Thorpe, 1998). Sin embargo, su actividad mitogénica o inhibidora, dependerá del órgano donde cumpla su función biológica y de la célula blanco donde esta citocina actúe, además del microambiente donde la célula blanco se sitúe (Bharat & Jordan, 1992; Abbas, 1996; Janeway-Travers, 1997; López-Marure, 1997; Recchia *et al.*, 1998).

Las citocinas fueron originalmente identificadas en importantes procesos inflamatorios, en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune y en la hematopoyesis, pero ahora se han ampliado sus funciones en muchos procesos fisiológicos (Mire-Sluis & Thorpe, 1998). A continuación se describen las citocinas antes mencionadas y su relación con las células tumorales.

### Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )

#### Descubrimiento

El interferón- $\gamma$  fue descubierto por los virólogos y los inmunólogos como una proteína antiviral derivada de la célula T, y como un activador de las funciones de los macrófagos inducida por la célula T<sub>H1</sub> (subpoblación de linfocitos T cooperadores) (Abbas *et al.*, 1996). El nombre de interferón se le atribuye a que en 1930 se descubrió que ejercía un fenómeno de interferencia viral. Desde entonces, se han catalogado tres clases: el interferón

de leucocitos (IFN- $\alpha$ ), el interferón de fibroblastos (IFN- $\beta$ ) y el interferón inmune (IFN- $\gamma$ ) (Mire-Sluis & Thorpe, 1998). La razón de que el efecto protector del interferón no se limite a un solo virus estriba en que (a diferencia de un anticuerpo) no actúa con el virus atacante; el interferón interactúa con la célula a la que protege (Pestka, 1983).

La síntesis de esta proteína se induce cuando un virus introduce en la célula su material genético (ADN o ARN). La presencia del material extraño (en forma de ADN para el caso del virus del papilomavirus humano [HPV]) induce en la célula la síntesis de moléculas de IFN (Franco, 1993). El interferón segregado se une a un receptor específico de la superficie de otras células, y con ello, desencadena varios mecanismos en las células receptoras, que inician la síntesis de distintas proteínas las cuales confieren a las células resistencia contra efectos habituales de la infección viral: multiplicación del virus, lisis de la célula y liberación de la descendencia vírica (Monroy, 1991; Pestka, 1983).

Este proceso se ha demostrado en la línea epitelial de colon humano HT29, pretratada con IFN- $\gamma$  recombinante, el cual protege a las células de la infección contra varios virus de inmunodeficiencia humana, como el HIV-1 y el HIV-2. Aquí, el IFN- $\gamma$  actúa a nivel post-traducciona del mRNA al inhibir el procesamiento de las proteínas estructurales del virus ejerciendo un potente efecto anti-HIV (Yahi, *et al.*, 1992). Otro ejemplo se ha observado en la línea celular H292 procedente de epitelio bronquial, el IFN- $\gamma$  las protege de la agresión del principal causante de la enfermedad pulmonar en el humano, el virus HRV-14 (Sethi, *et al.*, 1997).

### Características bioquímicas

El IFN- $\gamma$  o IFN inmune, es una glucoproteína homodimérica de 21-24 kDa constituida por 143 residuos de aminoácidos, la cual presenta diferentes grados de glicosilación (Abbas, 1996; Margni, 1996). Cada subunidad contiene 6  $\alpha$ -hélices con la ausencia de hojas  $\beta$ -plegadas. El IFN- $\gamma$  está codificado en un gen único ubicado en el cromosoma 12 humano en la región p12.05 (Bharat & Jordan, 1992). El único receptor del IFN- $\gamma$  tiene una masa molecular de 90 kDa constituido por un heterodímero de cadenas  $\alpha$  y

$\beta$ , con dominios extracelular, transmembranal e intracitoplásmico (Mire-Sluis & Thorpe, 1998).

#### Efectos del IFN- $\gamma$ .

Es una citocina con actividad multifuncional caracterizada por sus propiedades antivirales. Los linfocitos  $T_H CD4^+$  (células T cooperadoras), los linfocitos  $T_C CD8^+$  (células T citotóxicas) y en menor grado las células asesinas naturales (NK) producen IFN- $\gamma$ , no obstante, es el principal producto de las células  $T_H 1$  (subpoblación de linfocitos  $CD4^+$  cooperadores) (Janeway & Travers, 1997; Regueiro & López, 1998). Además de ser antiviral, el IFN- $\gamma$  produce efectos antiprotozoáricos; posee acción inmunomoduladora (aumenta la expresión de moléculas MHC [Complejo Principal de Histocompatibilidad] de clase I y clase II); participa en la respuesta inflamatoria; sobre las células mononucleares (como macrófagos y monocitos) induce un efecto activador; promueve la diferenciación de los linfocitos B (células precursoras productoras de anticuerpos) hacia estadio plasmático y de las células T (células productoras de linfocinas) de modo tal se promueva la maduración de los linfocitos T citotóxicos así como la secreción de inmunoglobulinas (Ig) por las células plasmáticas; activa a los neutrófilos para promover la expresión de receptores antagonistas de la IL-1 (Patrick, *et al.*, 1998); activa las células NK; y actúa como un supresor de la proliferación en células tumorales (Margni, 1996; Roitt *et al.*, 1998).

#### Efectos del IFN- $\gamma$ sobre células tumorales.

Esta citocina ha sido empleada en los tratamientos de cáncer de vejiga (en donde los linfocitos T y los macrófagos aumentan su población). Las moléculas HLA-DR (un haplotipo del MHC humano clase II) incrementan su expresión en tales células después de ser tratados con IFN- $\gamma$  (Stavropoulos *et al.*, 1998). También ha sido administrado en cáncer de próstata (Slovin *et al.*, 1998), en tumores ováricos intraperitoneales (Roitt *et al.*, 1998).

Los interferones son importantes reguladores en la diferenciación de células epiteliales humanas y son usados en el tratamiento clínico de cáncer cervical donde el HPV

está involucrado. Se ha descrito que en líneas celulares de carcinoma cervical positivas al HPV, en su superficie membranal expresan una mayor cantidad de moléculas MHC Clase I después de exponer a las células tumorales con IFN- $\gamma$ , permitiéndose así, la interacción de la molécula MHC-péptido antigénico con el TCR (receptor de la célula T) del linfocito T citotóxico la cual secreta perforinas y granzimas y así llevar a la célula tumoral hacia la apoptosis) (Monroy, 1999). De esta manera, se ha observado que IFN- $\gamma$  ejerce actividad anti-proliferativa sobre células tumorales el cual puede emplearse en tratamientos pre-invasivos e invasivos de CaCu (Santin *et al.*, 1998).

Recientemente, han surgido evidencias de que el IFN- $\gamma$  es capaz de inhibir a las células de carcinoma procedentes de bronquios humanos, (línea BEAS-2B) (Kobayashi *et al.*, 1998). También se han presentado evidencias de que el IFN- $\gamma$  induce el paro del ciclo celular y la apoptosis en un carcinoma de ovario en la rata. Administrando diariamente IFN- $\gamma$  vía intraperitoneal, se ha logrado incrementar la vida media de tales animales de 3 a 6 veces. Con dicha citocina, ha sido posible disminuir la síntesis de ADN e inducir la apoptosis en células tumorales con un máximo efecto después de 7 a 21 días de tratamiento. Este efecto se ve acompañado con un incremento de la proteína supresora de tumores p53 (una proteína con masa molecular de 53 kDa la cual vigila la integridad del genoma) a las 48 horas de exposición. Específicamente, el IFN- $\gamma$  es citotóxico en estas células tumorales epiteliales *in vivo* (Burke *et al.*, 1997).

En lo que respecta a epitelios humanos, el IFN- $\gamma$  induce un efecto antiproliferativo en líneas de carcinoma de ovario (Boente *et al.*, 1992). En células epiteliales de endometrio y en una línea de carcinoma endometrial denominada EnCa101AE9, el IFN- $\gamma$  realiza el mismo efecto inhibitor (Atabizadeh *et al.*, 1988). También se ha documentado en las células procedentes de CaCu CasKi y HeLa portadoras del HPV-16 y HPV-18 respectivamente, al ser tratadas con 100 U/ mL de IFN- $\gamma$ , inhiben su proliferación en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Yarden *et al.*, 1986; Lizard *et al.*, 1996). En los cuadros 1 y 5 se muestra un resumen de las actividades biológicas y características generales del IFN- $\gamma$ .

**Cuadro 1. Efectos biológicos del IFN- $\gamma$  en células epiteliales**

EFECTOS BIOLÓGICOS	EN CÉLULAS EPITELIALES
-Aumenta la expresión de moléculas del MHC clase I y II. - Aumenta receptores para IgG tipo I y III en monocitos, macrófagos y polimorfonucleares. -Estimula a las células NK; linfocitos T, incrementa la producción de anticuerpos por linfocitos B; es activador de macrófagos.	-(-) línea tumoral BEAS-2B de bronquios humanos. -(-) línea tumoral de ovario de rata. -(-) de 30-40% en 4 líneas celulares de cáncer de ovario. - No afecta proliferación epitelios normales de ovario. -(-)en epitelios normales de endometrio humano <i>in vitro</i> -(-) en la línea celular EnCa101AE de carcinoma endometrial humana. -(-)con 100 U/ml en las líneas cervicales HeLa y CasKi. -(+ ) con 10-100 UI en líneas de timo de rata y ratón.

(-)= inhibición de la proliferación; (+)= inducción de la proliferación (Pestka, 1983; Yarden *et al.*, 1986; Atabizadeh *et al.*,1988; Boente *et al.*, 1992; Abbas *et al.*, 1996; Lizard *et al.*,1996; Margni, 1996; Mire-Sluis & Thorpe, 1998; Regueiro & López, 1998; Roitt *et al.*,1998; Santin *et al.*, 1998; Stavropoulos *et al.*, 1998; Slovin *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1998; Burke *et al.*, 1997).

### Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF- $\beta$ )

#### Descubrimiento

La actividad del TGF- $\beta$  fue originalmente descubierta en el medio condicionado de células de ratón transformadas con el virus del sarcoma murino de Moloney, en donde se encontró que el medio condicionado podía inducir adhesión al sustrato de tales células independientemente de su crecimiento (De Larco & Todaro, 1978).

#### Características bioquímicas

El factor reconocido como TGF- $\beta$ , es actualmente identificado como TGF- $\beta_1$ , no obstante, existe otro grupo de proteínas (isoformas) todas ellas estrechamente relacionadas, denominadas TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$ , TGF- $\beta_4$ , TGF- $\beta_5$ , las cuales poseen un 70-80% de homología estructural entre ellas (Kloen *et al.*, 1997). La proteína activa del TGF- $\beta$ , es un dímero constituido por dos cadenas de 112 residuos de aminoácidos unidas a través de un

punteo disulfuro; constituyendo así, una masa molecular aparente de 25 kDa (Meager, 1991; Karp, 1996; Margni, 1996). El gene para el TGF- $\beta$  se sitúa en el cromosoma 19 en el humano, el tamaño del gen es de >100 Kbp con un número de 6 intrones (Bharat & Jordan, 1992; Chavez, 1997; Mire-Sluis & Thorpe, 1998). El TGF- $\beta$  posee 3 receptores: el tipo I (T $\beta$ RI), el tipo II (T $\beta$ RII), y el tipo III (T $\beta$ RIII). El tipo II tiene una alta afinidad para la isoforma del TGF- $\beta_1$ . El receptor tipo I reconoce al ligando que está unido al receptor tipo II enlazándose a él para formar un complejo y así iniciar la trasducción de señales (Mire-Sluis & Thorpe, 1998; Bristow *et al.*, 1999).

### Efectos del TGF- $\beta$ .

El TGF- $\beta$  es una citocina multifuncional pleiotrópica caracterizada principalmente por su actividad anti-inflamatoria e inmunoreguladora (Richards *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999). Se encuentra en una amplia variedad de tejidos fetales y adultos, así como en el suero; las isoformas TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$  solo se encuentran en los tejidos de los mamíferos (Kloen *et al.*, 1997; Durum & Muegge, 1998). Las fuentes celulares del TGF- $\beta$  son: los linfocitos T<sub>H2</sub> y T<sub>H3</sub>, los osteoblastos, las células endoteliales, los fibroblastos, los queratinocitos, las plaquetas, las células de Sertoli, los macrófagos, las células leucémicas; en tejidos se encuentra en el pulmón, el riñón, la placenta y en el cordón umbilical y se halla en altas concentraciones en el hueso y el bazo. (Meager, 1991; Bharat & Jordan, 1992; Mire-Sluis & Thorpe, 1998) (cuadro 2).

El TGF- $\beta$  tiene acciones diversas y efectos opuestos dependiendo del tipo celular y condiciones microambientales; es capaz de controlar la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la producción y degradación de la matriz extracelular (Moses *et al.*, 1990; Chávez, 1997; Kretschmar & Massagué, 1998). Actúa sobre los monocitos/macrófagos y los precursores hematopoyéticos (Margni, 1996). El TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento y la actividad de las células NK y puede disminuir la función de las células B al inhibir su crecimiento y la secreción de IgM (anticuerpo de la respuesta primaria) e IgG (anticuerpo de la respuesta secundaria). Además se ha demostrado que las células mononucleares de sangre periférica provenientes de individuos infectados con el HIV (virus de la

inmunodeficiencia humana), son capaces de sobre-expresar el TGF- $\beta$  (Richards *et al.*, 1998).

### Efectos del TGF- $\beta$ sobre células fibroblásticas

Se ha reportado que el TGF- $\beta$  es capaz de inhibir el crecimiento de fibroblastos procedentes de embrión de ratón, así como de fibroblastos cardíacos de conejo y de humano (Herrera *et al.*, 1996; Agocha *et al.*, 1997). Además, el TGF- $\beta$  logra abatir el crecimiento de fibroblastos de médula ósea humana (Bryckaert *et al.*, 1988) y en la línea fibroblástica de ratón NIH3T3 (del mesenquima) inhibe el crecimiento (Dkhissi *et al.*, 1999). Sin embargo, también se ha destacado que el TGF- $\beta$  tanto en su isoforma 1 y 2 estimula la proliferación de fibroblastos de ojo humano en cultivo de tejido entre 1000 y 100 pg/mL (Cunliffe *et al.*, 1996). Asimismo, se ha descrito que el TGF- $\beta_1$  a una concentración de 100 pM estimula la síntesis de elastina en fibroblastos de pulmón de rata y en fibroblastos dermales humanos, la misma isoforma a una concentración de 10 ng/mL, induce la expresión de la colágena tipo I. (McGowan, 1992; Grimbacher *et al.*, 1998). También se ha asociado que el TGF- $\beta_1$ , favorece a los fibroblastos dermales humanos normales en cultivo a proliferar, y al mismo tiempo, es capaz de promover la producción de fibronectina (Clark *et al.*, 1997); pero en fibroblastos de pulmón humano, el TGF- $\beta_1$  induce proliferación por una ruta indirecta al aumentar la respuesta mitogénica del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs) (Thannickal *et al.*, 1998).

### Efectos del TGF- $\beta$ sobre células tumorales

Se ha demostrado la producción autócrina del TGF- $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  en los sobrenadantes de tumores derivados de queratinocitos dermales humanos; el límite mínimo de detección fue de 39.0 pg/mL para el TGF- $\beta_1$ , 78.0 pg/mL para el TGF- $\beta_2$  y 1.9 ng/mL para el TGF- $\beta_3$ . (Fahey *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha comprobado que las varias isoformas del TGF- $\beta$  entre ellas el TGF- $\beta_1$ , son potentes inhibidores del crecimiento en células epiteliales normales (Landesman *et al.*, 1997; Azuma *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Esta inhibición

en el crecimiento se demuestra en epitelios normales de mama de rata (1-10 ng/mL), en cultivos de epitelios de traquea de rata (1-50 pM), en epitelios de mama de ratón y en epitelios normales de próstata humana (líneas PN1 y PN2) (Arteaga *et al.*, 1996; Antoshina & Ostrowski, 1997; Cipriano & Chen, 1998; Viegas *et al.*, 1999; Wikstrom *et al.*, 1999).

Las varias isoformas del TGF- $\beta$  se han documentado como potentes inhibidores del crecimiento de células epiteliales tumorales (Landesman *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1999; Azuma *et al.*, 1999). El TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento de carcinomas de tiroides, queratinocitos orales humanos (línea HaCaT), células de carcinoma gástrico (líneas SNU-16 y SNU-620), células de carcinoma de mama (líneas MCF-7 y ZR-751), células epiteliales intestinales de rata (líneas RIE-1 Y IEC-6) y a las líneas de epitelio de visón MvILu y CCL64 (Longstreet *et al.*, 1992; McGee *et al.*, 1995; Mark *et al.*, 1995; Danforth & Magdalene, 1996; Wu *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 1999). Asimismo, en la línea ectocervical humana ECE16-1 inmortalizada con el HPV-16, con concentraciones de 10-100 pg/mL-48 h con TGF- $\beta_1$  suprime su crecimiento y a concentraciones mayores de 100 pg/mL, la lleva a la muerte por apoptosis (Rorke & Jacobberger, 1995). Además inhibe el crecimiento e induce la apoptosis en epitelios inmortalizados de esófago humano (línea HET-1 transflectada) (Okamoto *et al.*, 1994). En los cuadros 2 y 5 se muestra un resumen de las propiedades biológicas y generales del TGF- $\beta$ .

**Cuadro 2.** Efectos biológicos del TGF- $\beta$  en células epiteliales y en fibroblastos

EFECTOS BIOLÓGICOS	EN CÉLULAS EPITELIALES DONDE ACTÚA	EN CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS
-Regula la proliferación y diferenciación celular. -Induce la producción y degradación de la matriz extracelular. -Está involucrado en la respuesta inmune e inflamatoria. -Actúa sobre las células NK, los monocitos-macrófagos y en los precursores hematopoyéticos	- (-) epitelios normales de mama de rata - (-) epitelios normales de traquea de rata - (-) epitelios normales de mama de ratón. - (-) epitelios normales de próstata humano. - (-) carcinoma tiroides humano. - (-) queratinocitos orales humano - (-) carcinoma de mama humano - (-) carcinoma de intestino humano - (-) epitelios inmortalizados de visón. - (-) queratinocitos de carcinogénesis orales de rata <i>in vitro</i> (línea tumoral 4NOQ). - (-) epitelios intestinales tumorales de rata. - (-) epitelios de bazo de rata <i>in vitro</i> . - (-) epitelios inmortalizados ectocervicales humano. - (-) carcinoma de esófago humano. - (-) epitelios normales de cérvix humano. - (-/+) epitelios transformados de hígado de rata. - (-/+) epitelios de esófago humano no tumorigénicos.	- (-) fibroblastos primarios de embrión de ratón. - (-) fibroblastos primarios cardíacos de conejo <i>in vitro</i> . - (-) en fibroblastos normales de corazón humano. - (-) fibroblastos de médula ósea humano - (+) las isoformas 1 y 2 en fibroblastos de ojo humano. - (+) en fibroblastos dermales normales humanos <i>in vitro</i> . - (+) fibroblastos de ratón NIH3T3.

(-)= inhibición de la proliferación; (+)= inducción de la proliferación; (-/+) resistencia a la inhibición. (Bryckaert *et al.*, 1988; Longstreet *et al.*, 1992; McGowan, 1992; Grimbacher *et al.*, 1994; Mark *et al.*, 1995; Arteaga *et al.*, 1996; Cunliffe *et al.*, 1996; Danforth & Magdalene, 1996; Fahey *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 1996; Okamoto *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996; Agocha *et al.*, 1997; Antoshina & Ostrowski, 1997; Clark *et al.*, 1997; Landesman *et al.*, 1997; Cipriano & Chen, 1998; Ko *et al.*, 1998; Thannickal *et al.*, 1998; Azuma *et al.*, 1999; Dkhissi *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Viegas *et al.*, 1999; Wikstrom *et al.*, 1999).

## Factor de Necrosis Tumoral-alpha (TNF- $\alpha$ )

### Descubrimiento

A principios de siglo, se descubrió que ciertos agentes infecciosos y sus productos presentaban efectos anticancerosos en animales; en particular, se demostró que la inyección de pequeñas cantidades de bacterias gram-negativas (el bacillo Calmette-Guérin [BCG], una cepa atenuada de *Mycobacterium tuberculosis*), vivas o muertas, podía provocar la

necrosis hemorrágica de tumores de ratones: los tumores se desangraban, se oscurecían y se secaban (Wright *et al.*, 1992; Lejeune *et al.*, 1998). Posteriormente, en 1970 se identificó y se purificó el componente activo de las bacterias gram-negativas y se estableció que se trataba de un complejo de lípidos y azúcares: los lipopolisacáridos (LPS) constituyentes de la pared celular, las cuales estimulaban la liberación de un factor antitumoral, causante de la destrucción del cáncer. Ante los efectos que dicho factor producía sobre los tumores se le llamó factor de necrosis tumoral (TNF) (Carswell *et al.*, 1975; Lloyd, 1988). Entre los años 1985-1989 se logró fabricar por primera vez rhTNF (TNF recombinante humano) (Lejeune *et al.*, 1998).

### Características bioquímicas

El TNF está constituido por dos especies moleculares, el TNF- $\alpha$  y el TNF- $\beta$  (Abbas *et al.*, 1996), solo que el TNF- $\alpha$  (caquexina) es producido por macrófagos activados y el TNF- $\beta$  (linfotóxina) por linfocitos activados (Aiyer & Aggaewal, 1988; Beutler & Ceram, 1989; Meager, 1991). En la actualidad se sabe que el TNF- $\alpha$  es la principal citocina elaborada en respuesta contra infecciones bacterianas y por agentes gram-negativos (Kovacs *et al.*, 1988; Margni *et al.*, 1996).

El TNF- $\alpha$  humano es un polipéptido constituido por 157 residuos de aminoácidos, que fue aislado a homogeneidad como una glicoproteína a partir del medio condicionado de la línea celular promielocítica HL-60, la cual había sido previamente tratada con ésteres de forbol. Su estructura primaria fue determinada a partir de la proteína pura y la secuencia obtenida es idéntica a la que predice la secuencia de nucleótidos del ARNm. En su forma activa, el TNF- $\alpha$  es un homotrímero unido por interacciones no covalentes con una masa molecular de 17 kDa. Estudios cristalográficos han corroborado su naturaleza trimérica donde cada subunidad resulta de un arreglo en dos hojas  $\beta$ -plegadas, cinco hebras  $\beta$ -antiparalelas en cada subunidad. Cada sitio activo formado entre dos subunidades, corresponde a un dominio que se enlaza al receptor, implicando por lo tanto, que hay tres sitios de unión (dominios) en la molécula del TNF- $\alpha$  (Mire-Sluis & Thorpe, 1998). El TNF- $\alpha$  es muy sensible a la actividad de proteasas, perdiendo su funcionalidad biológica

rápidamente, lo que sugiere una estructura terciaria poco compacta (Ibarra, 1997; Estrada, 1998). Tal citocina se origina de una proteína precursora de 25 kDa con un dominio hidrofóbico y otro hidrofílico, se inserta en la membrana celular y luego es modificada para originar la forma soluble de 17 kDa a nivel extracelular (Abbas *et al.*, 1996; Margni *et al.*, 1996). El gen del TNF- $\alpha$  se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (Kelso, 1989).

El TNF- $\alpha$  se puede unir a distintos receptores tales como CD40, CD27, CD30 OX40, y 4-1BB sugiriendo que cada receptor induce un ruta de señalización diferente (Armitage, 1994). Sin embargo, al parecer los principales receptores involucrados en la vía de señalización del TNF- $\alpha$  son el p55 (CD 120a) y el p75 (CD 120b). La mayoría de las respuestas conocidas inducidas por el TNF- $\alpha$  (activación del NF $\kappa$ B, citotoxicidad, inducción de la IL-6, proliferación de fibroblastos) ocurre por activación del p55. El receptor p75 parece estar involucrado también en la citotoxicidad. Tanto el p55 como el p75 tienen un tiempo de vida media sobre la membrana de 0.5-2 h. Estudios recientes confirman que en efecto, el TNF- $\alpha$  (estructura trimérica) es capaz de unirse a tres receptores al mismo tiempo (Mire-Sluis & Thorpe, 1998).

### Efectos del TNF- $\alpha$

El TNF- $\alpha$  es una citocina multifuncional que ha sido caracterizada por su actividad proinflamatoria e inmunorreguladora (Abbas, 1996; Margni, 1996). Dicha citocina también puede ser producido por las células NK, linfocitos T, células linfoblastoides B, fibroblastos, células tumorales de mama, células tumorales del ovario y células epidermales; no obstante como ya se mencionó, es producida en altas concentraciones por los macrófagos, y ahora sabe que también es secretado en altas cantidades por los monocitos (Meager, 1991; Bharat & Jordan, 1992; Lange *et al.*, 1992; Ferdy *et al.*, 1998). Dicha glucoproteína, induce una gran variedad de respuestas celulares: promueve o inhibe la proliferación, induce citotoxicidad, e induce o previene la diferenciación celular, entre otras funciones (Bharat & Jordan, 1992; Abbas *et al.*, 1996; Margni *et al.*, 1996; López-Marure, 1997).

En células endoteliales humanas normales (epitelios especializados) y en epitelios de tráquea de rata, el TNF- $\alpha$  inhibe el crecimiento (López-Marure, 1997). En contraste, hace proliferar a los epitelios glomerulares de rata. Además de estas actividades, el TNF- $\alpha$  ha sido descrito como un fuerte inductor de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales que revisten la luz de las venas y las arterias, mecanismo que explica la concentración de los leucocitos en el proceso inflamatorio durante la infección (Vanhée *et al.*, 1996; Bazzoni *et al.*, 1999; Harunobu *et al.*, 1999; Troyanovsky, 1999).

#### Efectos del TNF- $\alpha$ sobre células fibroblásticas

Se ha documentado que el TNF- $\alpha$ , induce la proliferación de fibroblastos primarios de prepucio humano, fibroblastos de piel humana y fibroblastos de hueso (Yanagisawa *et al.*, 1994; Freitag *et al.*, 1996; Aggarwai & Ni, 1998; Kwon *et al.*, 1998). Sin embargo, los fibroblastos normales de córnea humana inhiben su crecimiento con 50 U/mL de TNF- $\alpha$  (Chen *et al.*, 1994).

#### Efectos del TNF- $\alpha$ sobre células tumorales

El TNF- $\alpha$  ha sido descrito como un poderoso inductor de muerte por necrosis en varios tumores malignos y benignos, e inclusive puede matarlos por apoptosis (Giora *et al.*, 1991; Bogin *et al.*, 1998). Se ha demostrado, que con 100 ng/mL de TNF- $\alpha$  se reduce la expresión del gene c-myc en células HeLa y las detiene en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Yarden *et al.*, 1986). Las líneas de carcinoma de pulmón MRC-5 y de mama MCF-7, han mostrado resistencia a la inhibición de la proliferación al ser tratadas con el TNF- $\alpha$ . (Jian *et al.*, 1998). Sin embargo, Gerritsen *et al.*, (1998) han encontrado que el TNF- $\alpha$  es capaz de inhibir el crecimiento de las células MCF-7. La inhibición del crecimiento en las células tumorales inducido por el TNF- $\alpha$  se observa en cáncer de páncreas humano (Tsutomu *et al.*, 1998).

También se ha documentado que el TNF- $\alpha$  es capaz de inhibir el crecimiento de células epiteliales de cérvix normal humano en cultivo (Woodworth *et al.*, 1995). En contraste, esta citocina estimula la proliferación de cinco líneas celulares cervicales transfectadas con ADNs del HPV 16 o 18 (líneas CXT-1, CXT-2, CXT-3) y de siete líneas derivadas de carcinomas cervicales (entre ellas las líneas SiHa y Caski). La estimulación del crecimiento con el TNF- $\alpha$ , se ve acompañado por un incremento de 6 a 10 veces del ARNm de la anfirregulina (un factor de crecimiento polipeptídico) (Woodworth *et al.*, 1995). Esta respuesta proliferativa inducida por el TNF- $\alpha$  también ha sido demostrada por Liu *et al* (1998) en células leucémicas megacarioblásticas humanas (líneas Mo7e, Meg-01 y Dami/HEL). En los cuadros 3 y 5 se muestra un resumen de las propiedades y características del TNF- $\alpha$ .

**Cuadro 3.** Efectos biológicos del TNF- $\alpha$  en células epiteliales y en fibroblastos

EFFECTOS BIOLÓGICOS	EN CÉLULAS EPITELIALES EN DONDE ACTUA	EN CELULAS FIBROBLÁSTICAS
Tiene actividad proinflamatoria e inmunorreguladora.	- (-) endotelios de cordón umbilical humano normales. - (-) epitelios normales de traquea de rata. - (+) epitelios glomerulares de rata normales.	- (-) fibroblastos de córnea humano. - (+) fibroblastos primarios de prepucio humano.
Induce o previene la diferenciación celular.	- (-) carcinoma de páncreas humano. - (-/+) carcinoma de mama humano. - (-/+) carcinoma de pulmón. - (+) epitelios cervicales inmortalizados y tumorales humanos. - (-) HeLa con 100 ng/mL	- (+) fibroblastos normales de piel humano <i>in vitro</i> - (+) fibroblastos de hueso.

(-)= inhibición de la proliferación; (+)= inducción de la proliferación; (-/+) resistencia a la inhibición. (Yarden *et al.*, 1986; Giora *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994; Yanagisawa *et al.*, 1994; Woodworth *et al.*, 1995; Freitag *et al.*, 1996; Vanhée *et al.*, 1996; Bogin *et al.*, 1998; Gerritsen *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 1998; Tsutomu *et al.*, 1998; Harunobu *et al.*, 1999).

## Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ )

### Descubrimiento

La interleucina-1 (IL-1) fue descubierta por los bacteriólogos como un mediador endógeno de la fiebre (un pirógeno) producido en respuesta a infecciones bacterianas, y por inmunólogos, como un co-estimulador de la proliferación de los timocitos. Una importante hipótesis generada en ese momento, fue que las citocinas eran sintetizadas principalmente

por leucocitos y actuaban básicamente sobre otros leucocitos, y por ello podrían denominarse interleucinas (comunicación entre leucocitos). En 1941 se caracterizó la proteína obtenida de los exudados de una inflamación aguda; era lábil al calor y con la propiedad de producir fiebre después de su inyección en animales y humanos, razón por la cual se le denominó pirógeno endógeno (Dinarelli *et al.*, 1977; Kelso, 1989; Meager, 1991; Santiago, 1996).

No obstante, la IL-1 puede ser producida por una variedad de tipos celulares que incluyen queratinocitos de la piel, células endoteliales, fibroblastos, células mesangiales renales, astrocitos, células gliales, células ciliares neuronales, células NK, células del epitelio córneo, dendríticas y células de Kuffer. Sin embargo, la principal fuente de producción de la IL-1 son los monocitos/macrófagos en respuesta a una variedad de estímulos que van desde productos bacterianos tales como LPS, o la acción de otras citocinas, por ejemplo, el TNF o la misma IL-1 (Palmer *et al.*, 1995; Margni *et al.*, 1996; Guangren & Garden, 1998).

### Características bioquímicas

Tanto la IL-1 humana como la de ratón existen en dos formas funcionalmente activas, la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . Cada una de ellas son codificadas en el cromosoma 2 en el humano (posición 2q13) en la misma región de sus propios receptores. Ambas interleucinas son sintetizadas como precursores de 31-33 kDa, los cuales son modificados por enzimas citoplasmáticas específicas para generar la molécula activa que posee 15-17 kDa (Meager, 1991). El gen para la IL-1 $\beta$  es de 7.8 kb (kilobases), la cual codifica una secuencia de 269 residuos de aminoácidos (Margni *et al.*, 1996). La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  se unen al mismo receptor además, existe otra molécula (ligando) diferente a las dos anteriores capaz de unirse al mismo receptor, pero a diferencia de las primeras, no despierta ninguna actividad biológica; por estas características se le ha dado el nombre de antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1-Ra) (Santiago, 1996). Los receptores a los que se enlaza la IL-1 $\beta$  son el tipo I (IL-1RI) y el tipo II (IL-1RII) los cuales usualmente se coexpresan, sin embargo, el tipo I se expresa predominantemente en los fibroblastos y en las células T; en contraste, las células

B, los monocitos y los PMN (células polimorfonucleares) expresan preferencialmente al tipo II. No obstante, la IL-1 $\beta$  tiene una mayor afinidad hacia el IL-1RII ( $k_d = 10^{-9}$ - $10^{-10}$ M) (Mire-Sluis & Thorpe, 1998).

### Efectos de la IL-1 $\beta$ .

La IL-1 $\beta$  es una citocina potente con una amplia variedad de actividades pro-inflamatorias. Como el TNF, juega un papel central en regular al sistema inmune y procesos inflamatorios en respuesta a infecciones microbianas y lesiones tisulares. La fuente celular de la IL-1 $\beta$  proviene de una gran variedad de células normales las cuales inducen su transcripción de forma natural, pero principalmente es producida por el macrófago en su forma precursora inactiva. Los macrófagos responden a la IL-1 $\beta$  liberando PGE<sub>2</sub> (prostaglandina) y produciendo TNF. La PGE<sub>2</sub> puede inhibir la producción de la IL-1 $\beta$  por parte del macrófago y regular negativamente la expresión de productos del MHC clase II. La IL-1 $\beta$  actúa como un regulador autócrino del crecimiento en células endoteliales humanas disminuye los niveles de zinc y hierro en el plasma, causa neutrofilia, aumenta la respuesta de células T a mitógenos y antígenos *in vitro* (Cozzolino *et al.*, 1990). Asimismo, dicha citocina induce la secreción de IL-6 en cultivos de células epiteliales de intestino humano (Parikh *et al.*, 1998). Algunas actividades de la IL-1 $\beta$  podrían ser de significado patológico dado que conduce a una inflamación o choque séptico. La IL-1 $\beta$  aumenta la expresión de moléculas de adhesión sobre células del endotelio vasculante. *In vivo*, este efecto conlleva a un aumento en el tráfico de linfocitos y neutrófilos hacia el sitio de inflamación (quimiotaxis). Además, la IL-1 $\beta$  está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades inmunológicas e inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, la diabetes y la arteriosclerosis (Guangren & Garden, 1998).

### Efectos de la IL-1 $\beta$ sobre células fibroblásticas

La IL-1 $\beta$  induce la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena de los tipos I, III y IV (Margni *et al.*, 1996); no obstante, se ha demostrado que en fibroblastos cardiacos de

rata neonatal funge como modulador negativo de la proliferación (Palmer *et al.*, 1995). En fibroblastos de pulpa dental humana, la IL-1 $\beta$  inhibe su crecimiento, mientras que en fibroblastos dermales los hace proliferar y en ambos tipos celulares en cultivos primarios, la IL-1 $\beta$  estimula la producción de la colágena (Kwon *et al.*, 1998).

#### Efectos de la IL-1 $\beta$ sobre células tumorales

Se ha comprobado que la IL-1 $\beta$  exógena confiere radioprotección en tejidos normales cuando un paciente con cáncer se somete a una radioterapia. Sin embargo, es poca la información del efecto de la radioterapia sobre la producción de esta citocina de manera endógena. Se ha observado que en los tratamientos de cáncer de mama con radioterapia, la radiación local causa una significativa reducción plasmática de la IL-1 $\beta$ . Esta disminución trae como consecuencia un marcado decremento en el número de linfocitos. La radioterapia local puede tener un importante efecto sobre la concentración de citocinas sistémicas repercutiendo sobre la respuesta biológica de tejidos normales y tumorales ante un tratamiento contra el cáncer (Fenig *et al.*, 1994).

Por otro lado, se ha observado que cuando la IL-1 $\beta$  es administrado en una línea celular de carcinoma de ovario humano, ejerce un efecto antiproliferativo (Kilian *et al.*, 1991). En tanto, en células epiteliales glomerulares de rata en cultivo, a una concentración de 1-50 ng/ml es capaz de inhibir su crecimiento (Yanagisawa *et al.*, 1994). En los cuadros 4 y 5 se muestra un resumen de las características de la IL-1 $\beta$ .

**Cuadro 4.** Efectos biológicos de la IL-1 $\beta$  en células epiteliales y en fibroblastos

EFECTOS BIOLÓGICOS	EFECTO EN CÉLULAS EPITELIALES	EFECTO EN CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS
- Actúa como un factor quimiotáctico de células T y B. -Incrementa la citotoxicidad de macrófagos. - activa linfocitos T y B. -Estimula al sistema inmune y procesos inflamatorios.	-(-) con 1-50 ng/ml epitelios glomerulares de rata <i>in vitro</i> . -(-) en una línea celular de carcinoma de ovario humano. -(+) epitelios cervicales inmortalizados humano.	-(-) fibroblastos de pulpa dental humano. -(-) fibroblastos de rata neonatal. -(-) fibroblastos de corazón humano. -(+) fibroblastos dermales humano.

(-)= inhibición de la proliferación; (+)= inducción de la proliferación; (-/+) resistencia a la inhibición. (Cozzolino *et al.*, 1990; Kilian *et al.*, 1991; Fenig *et al.*, 1994; Yanagisawa *et al.*, 1994; Margni *et al.*, 1996; Guangren & Garden., 1998; Lertchirakarn *et al.*, 1998).

**Cuadro 5. Nombres alternativos, características bioquímicas y fuentes celulares del IFN- $\gamma$ , el TGF- $\alpha$ , el TNF- $\alpha$ , y la IL-1 $\beta$ .**

CITO-CINA	NOMBRES ALTERNATIVOS	PESO MOLE-LAR	PUNTO ISOELECTRICO	LOCALIZACIÓN CROMOSÓ-MICA	RECEPTO RES	FUENTES CELULARES
IFN- $\gamma$	Interferón inmune. factor antiviral.	21-24 kDa	8.3 - 8.5	- en el humano en el 12. - en el ratón en el 16.	Un tipo.	- linfocitos T <sub>H</sub> 1 (CD4 <sup>+</sup> ) -células "Natural Killer" (CD8 <sup>+</sup> ).
TGF- $\beta$ <sub>1</sub>		25 kDa		en el humano en el 19  y 7 en el ratón.	tipo I (69 kDa)  tipo II (92 kDa).  Tipo III	Las isoformas 1,2 y 3 sólo se encuentran en los tejidos de los mamíferos. - Está en altas concentraciones en plaquetas, hueso y baso. -En esteoblastos, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, macrófagos y en leucemias.
TNF- $\alpha$	Caquectina  Citotoxina de macrófagos  Necrocina.	17 kDa	5.6	Los genes que codifican para el TNF- $\alpha$ se encuentra en la región 6p23-6q12 dentro de la región del MHC en el cromosoma 6 humano.	Tipo I (p55)  tipo II (p75).	-Principalmente por los macrófagos activados. -Por células NK, células T, células linfoblastoides-B, fibroblastos, células del músculo de la boca, células tumorales de mama y ovario, astrocitos, epidermales, y de la granulosa.
IL-1 $\beta$	mediador endógeno de leucocitos. - pirógeno endógeno. -hematopoyetina.	17.5 kDa	7	en el cromosoma 2 humano.	-IL-1RI  -IL-1RII	Queratinocitos de la piel, células endoteliales, fibroblastos, células mesangiales, renales, astrocitos, ciliares, neuronales, células NK, dendríticas, monocitos, macrófagos.

Tomado de: Dinarello *et al.*, 1977; Pestka, 1983; Campion & Kelly, 1986; Aiyer & Aggaewal, 1988; Kovacs *et al.*, 1988; Lloyd, 1988; Kelso, 1989; Moses *et al.*, 1990; Meager, 1991; Monroy, 1991; Bharat & Jordan, 1992; Lange *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1992; Yahi, *et al.*, 1992; Armitage, 1994; Palmer *et al.*, 1995; Abbas *et al.*, 1996; Karp, 1996; Margni, 1996; Santiago, 1996; Chávez, 1997; Ibarra, 1997; Kloen *et al.*, 1997; López-Marure, 1997; Sethi, *et al.*, 1997; Estrada, 1998; Ferdy *et al.*, 1998; Guangren & Garden, 1998; Kretschmar & Massagué, 1998; Lejeune *et al.*, 1998; Mire-Sluis & Thorpe, 1998; Patrick, *et al.*, 1998; Regueiro & López, 1998; Richards *et al.*, 1998; Roitt *et al.*, 1998; Bristow *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Monroy, 1999).

## JUSTIFICACIÓN

Los tumores cervicales se han constituido como la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer en el mundo (Woodworth *et al.*, 1995; Gradilone *et al.*, 1996). En nuestro país esta enfermedad ocupa el primer lugar de muerte por cáncer en la mujer y se ha estimado que fallecen por cáncer cérvico-uterino una paciente cada hora y media (Alonso, 1999; Berumen & Villegas 1997). Tal padecimiento surge generalmente en mujeres de edades entre los 25 a 65 años y una vez que lo han presentado, se estima que la sobrevivencia de una mujer con cáncer cérvical es de aproximadamente 5 años (Elkas & Farias-Eisner, 1998; Gariglio *et al.*, 1998). Además del registro en el incremento gradual de esta neoplasia, al mismo tiempo ha disminuido la edad en la adquisición de dicha enfermedad, debido a que un mayor número de mujeres más jóvenes lo contraen (Hernández-Avila, *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998; Slagle *et al.*, 1998).

Pese a los resultados obtenidos hasta el momento, la investigación básica sobre esta neoplasia ha tratado de plantear terapias alternativas, basadas en la aplicación de factores moduladores o inhibidores biológicos. Sin embargo, se ha documentado que las células tumorales no sólo se caracterizan por su división indiscriminada, sino también por la capacidad que tienen de responder a las citocinas presentes en su microambiente o inclusive a su capacidad de secretar sus propios factores de crecimiento. Hasta el momento, se han planteado algunas vías o estrategias que pretenden explicar cómo las células son capaces de obtener un estado transformado o neoplásico, o cómo éstas evaden el ataque de las células inmunológicas. Sin embargo, no es claro cuántas y cuáles citocinas son secretadas por las células tumorales ni cuál es la función que desempeñan o su relación con el estado transformante de las células. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el papel de las citocinas TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  caracterizadas como antitumorales, sobre la proliferación de células CaCu y determinar dichas células secretan tales citocinas.

## HIPÓTESIS

Se sabe que el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  se caracterizan por ejercer múltiples actividades biológicas tales como la inhibición de la proliferación, la inducción de la diferenciación e inclusive la de inducir una acción mitogénica. Tales funciones son ejercidas dependiendo del tipo celular en el que actúan y de las condiciones microambientales existentes. Actualmente se les ha adjudicado a dichas citocinas un potente papel inhibidor de la proliferación, tanto de células normales así como de tumorales. Dado que las células normales y las tumorales, son capaces de regular la división celular a través de la acción de las citocinas antes mencionadas, se espera que dichas citocinas induzcan inhibición de la proliferación en las células fibroblásticas, las epiteliales así como en las células tumorales provenientes de CaCu CaLo, InBl y HeLa. Además, dado que se ha reportado que las células son capaces de secretar sus propios factores de crecimiento, existe la posibilidad de que las células tumorales CaLo, InBl y HeLa, secreten al medio de cultivo alguna de estas citocinas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del TGF- $\beta_1$  y del TNF- $\alpha$  sobre la proliferación de células tumorales CaLo, InBl y HeLa provenientes del cérvix humano y determinar si éstas son capaces de secretar al medio de cultivo alguna de estas citocinas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS :**

- Determinar si el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  afectan la proliferación de células epiteliales, fibroblásticas y las líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa, por medio de la incorporación de timidina tritiada.
- Evaluar si las líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa secretan TGF- $\beta_1$  y TNF- $\alpha$ , a través del inmunoensayo de ELISA.
- Evaluar si los medios condicionados de las células tumorales CaLo, InBl y HeLa presentan actividad biológica de TGF- $\beta_1$  y TNF- $\alpha$ , sobre la línea celular Mv1Lu sensible a TGF- $\beta_1$  y en la línea L929 citotóxica en presencia del TNF- $\alpha$ .

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CULTIVO CELULAR:

#### Obtención de fibroblastos y epitelios normales

Los fibroblastos fueron obtenidos de biopsias de tejido de cérvix humano, de pacientes sometidas a histerectomía por presentar miomatosis uterina. Una vez obtenida la pieza quirúrgica, el fragmento de cérvix se transportó en medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Mererial Institute) (MICROLAB, MEXICO) suplementado con 15% (v/v) de SFB (Suero Fetal de Bovino) (GIBCO, BRL) manteniéndose a 4°C, y se procesó durante las siguientes 2-3 hrs.

El tejido se fragmentó en trozos pequeños (5mm) y se depositó en un matraz con 15 mL de tripsina al 0.05% (v/v) (Sigma Co., USA) en SSV (Solución Salina de Verseno) y se mantuvo a 37°C en agitación constante por 15 min. Después, el sobrenadante se decantó en un embudo con malla y se colectó en un tubo cónico con 0.5 mL de SFB.

Inmediatamente al tejido remanente, se le adicionaron otros 15 mL de tripsina al 0.05% (v/v) en SSV y se mantuvo a 37° en agitación constante por 15 min. Al término de este tiempo, la suspensión celular contenida en el sobrenadante se filtró a través de un embudo con malla y se recolectó en un tubo cónico que contenía 1 mL de SFB.

Los tubos se centrifugaron a 500 g (gravidades). durante 5 min. Se retiró el sobrenadante mediante decantación y el botón celular resultante se resuspendió en 5 mL de RPMI suplementado con 10% (v/v) de SFB. La suspensión celular se sembró en cajas de cultivo (COSTAR) a una densidad aproximada de 100 células/mm<sup>2</sup> y se mantuvieron en una incubadora Scientific al 95% aire / 5% de CO<sub>2</sub> y a una atmósfera de humedad a punto de rocío. A las 24 h, se realizó un cambio de medio por uno nuevo (RPMI al 10% (v/v) de SFB), de manera que solo permanecieron en el cultivo las células adheridas. Después de 5 a

7 días se obtuvieron cultivos celulares de fibroblastos llegando a una densidad de 2,500 células/mm<sup>2</sup> (Griffiths, 1988; Freshney, 1994).

Los epitelios fueron obtenidos mediante el mismo método, sólo que éstos fueron cultivados en medios adicionados con 0.5 mg/mL de insulina (SIGMA, USA) y 10 µg/mL de hidrocortisona (SIGMA, USA).

### Líneas Celulares

Los carcinomas CaLo (estadio IIB) e InBl (estadio IVB), provenientes de dos biopsias diferentes de pacientes con cáncer cérvico-uterino (CaCu), fueron gentilmente donadas por el Dr. Monroy (FES Zaragoza-UNAM, México) (Monroy, 1991; Rangel *et al.*, 1993). La línea de adenocarcinoma HeLa (estadio IVB metastásico), la línea epitelial de pulmón de bisón MvILu y la línea de fibrosarcoma de pulmón de ratón L929 se adquirieron del American Type Culture Collection (ATCC). Tales células fueron mantenidas en condiciones de cultivo similares a las células epiteliales y fibroblastos normales, pero al 0.5-1%(v/v) de SFB y se utilizaron para ensayos de actividad biológica cuando se encontraban en una fase de proliferación exponencial.

### **PROLIFERACIÓN CELULAR:**

#### Evaluación de la Proliferación Celular con la Técnica de Cristal Violeta

Se empleó el método previamente descrito por Kueng *et al* (1989). El colorante cristal violeta posee características alcalinas, que le permite incorporarse a los núcleos celulares. El número de núcleos teñidos aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida.

Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1%(v/v) en PBS (solución amortiguadora de fosfatos) por 10 min manteniéndose en agitación. Posteriormente, se lavaron con agua bidestilada y se secaron al aire. Se agregó una solución de cristal violeta

al 0.1% (w/v) en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6 (ver apéndice 1), manteniéndose en agitación durante 20 min. Inmediatamente, las placas de cultivo se lavaron 5 veces con agua desionizada, se secaron al aire y a temperatura ambiente. A las cajas de cultivo se les añadió ácido acético al 10% (v/v), dejándose en agitación durante 20 min., para finalmente leer la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (ELX800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC). La lectura de absorbancia es directamente proporcional al número celular. Los cultivos sin tratamiento (controles) representaron el 100 %.

### Ensayo de Proliferación con Incorporación de Timidina Tritiada

Esta evaluación consistió en la asimilación del nucleótido timidina (que es un análogo de la timina) marcada con tritio [ $\beta$ - $^3\text{H}$ ]dTTP al ADN de las células en cultivo, de manera que cuando las células se encontraron en fase de síntesis, incorporaron la timidina marcada (Conn & Stumpf, 1984; Bulbulian, 1987; Karp, 1996). En todas las evaluaciones se emplearon cultivos celulares sincrónicos para obtener una mayor representatividad de la población celular en la fase de síntesis del ciclo celular.

La población celular se sincronizó mediante la eliminación del SFB del cultivo por 36 h, posteriormente se sembró el número indicado de células (2,500) y se pulsaron con 1  $\mu\text{Ci}$  de [ $\beta$ - $^3\text{H}$ ]dTTP/mL (Amersham, actividad específica de 185 GBq/mmol). A las 48 hrs., las células fueron lavadas con PBS y se fijaron con metanol al 95% (v/v) en PBS durante 20 min. Nuevamente las células fueron lavadas con PBS y posteriormente se añadió NaOH 200 mM con el fin de lisar las células y liberar el ADN marcado. A las 24 hrs. éste lisado se depositó en viales con 2 mL de líquido de centelleo (Beckman, USA) La radiación fue evaluada en un contador de centelleo de emisión  $\beta$  (Beckman USA, modelo LS-6500) y las lecturas en cpm (cuentas por minuto) fueron convertidas a porcentaje de proliferación, en donde los cultivos sin tratamiento (controles) representaron el 100 %.

## REACTIVOS :

La concentración óptima de las citocinas administradas fue determinada mediante una curva dosis-respuesta. Con 0.01, 0.1, 1 y 5 ng/mL no hubo diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ); con 10 y 20 ng/mL hubo diferencia significativa con el control ( $p < 0.05$ ). Entre 10 y 20 ng/mL no hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). De esta forma, las células fueron tratadas con 10 ng/mL de TFG- $\beta_1$  recombinante humano (Sigma Co., USA) y 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  recombinante humano (Sigma Co., USA). Por otro lado, se emplearon anticuerpos monoclonales neutralizantes (mAb): 1  $\mu\text{g/mL}$  de anti-TGF- $\beta_1$  desarrollado en ratón (R&D systems, USA) y 0.18  $\mu\text{g/mL}$  de anti-TNF- $\alpha$  desarrollado en conejo (Sigma Co., USA).

## OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

Para la obtención de los medios condicionados (MC), las tres líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa se crecieron por separado, en botellas Falcón de tres niveles. Se cultivaron  $1.5 \times 10^7$  células /483  $\text{cm}^2$  con 150 mL de RPMI-1640 suplementado con 5%(v/v) de SFB. Cuando llegaron al 70-80% de confluencia (24-48 h, donde había cerca de  $2 \times 10^7$  células) se lavaron con 100 mL de PBS y se les sustituyó el medio de cultivo por RPMI-1640 únicamente. A las 48 horas se colectó el MC (MC sin suero). Para obtener MC con suero, se cultivaron  $1 \times 10^7$  células/483  $\text{cm}^2$  en cajas triples con 150 mL de RPMI-1640 al 5% de SFB y cuando llegaron a la confluencia (24-48 h, donde había cerca de  $1.5 \times 10^7$  células/483  $\text{cm}^2$ ), se lavaron con 100 mL de PBS y se les añadió RPMI-1640 al 1%(v/v) de SFB, dejándose en condiciones de cultivo 48 h. Al término de éste tiempo se colectó el sobrenadante (MC con suero). Ambos MC se centrifugaron a 1000 g por 5 min para eliminar el detrito celular y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

## Liofilización de los MC

Para concentrar el MC, los 150 mL de medio de cultivo se liofilizaron en un Speed-Vac (Automatic Enviromental, modelo AES2000, Savant). Se vigiló que no llegaran a

sequedad, y cuando esto ocurría, se raspó con una espátula el residuo sólido y se reconstituyó con 3 mL de agua tetradestilada (milli Q).

### Diálisis

Con el propósito de eliminar las sales en los MC liofilizados, éstos se sometieron a microdiálisis. Brevemente, ésta consistió en depositar el MC en un tubo Eppendorf de 2 mL cubierto con una membrana de diálisis de 1 KDa. El contenido se dializó en 250 mL de agua destilada en agitación por 48 hrs a 4°C, cambiándose el agua cada 12 hrs. El último cambio de agua fue de 1:4 (v/v) de PBS-H<sub>2</sub>O destilada para evitar cambios conformacionales de las proteínas presentes en los MC por ausencia de iones. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm /5 min para eliminar el precipitado (proteínas de alto peso molecular). Después de esta operación, a los MC se les denominó MCC (Medio Condicionado Concentrado). Finalmente, los MCC fueron esterilizados por filtración, a través de una membrana de un diámetro de poro de 22 µm.

### Quantificación de proteína en los MCC por el método de Bradford.

La concentración de proteína total de los MCC, fue determinada a través del método de Bradford (1976). Se realizó una curva patrón de una proteína conocida, (Albúmina de huevo de pollo; SIGMA, USA), utilizando 1, 2, 4, 6, 8, 16, 32, y 64 µg de albúmina / mL de agua grado HPLC en tubos Eppendorf. A cada tubo se le extrajo 200 µL de líquido que fueron sustituidos por 200 µL de reactivo de Bradford (BioRad). Paralelamente, se realizó el mismo procedimiento para las muestras (MCC). Los tubos fueron agitados vigorosamente y el contenido fue vertido en celdas de plástico de un mL c/u y la absorbancia se determinó con un espectrofotómetro a 590 nm (EL<sub>x</sub>800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC). El blanco consistió de 800 µL de agua grado HPLC con 200 µL de reactivo de Bradford.

Se graficó una curva de calibración (densidad óptica vs concentración de albúmina), y a través de una regresión lineal y por medio de la ecuación de la línea recta se determinó la concentración de las muestras problema (MCC). De esta manera se formó un stock de proteína total para cada una de las líneas tumorales los cuales se emplearon en los ensayos biológicos.

## **DETECCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

### **DEL TGF- $\beta$ Y TNF- $\alpha$**

#### **Inmunoanálisis enzimático de ELISA para detectar TGF- $\beta_1$ y TNF- $\alpha$ en los MCC**

200  $\mu\text{g}$  de proteína total de los MCC/pozo fueron colocados en una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNCLON, Denmark) y se dejaron sensibilizando a 37 °C por 4 h y luego estabilizándose a 4°C durante 24 hrs. Al término de este tiempo, la placa fue lavada tres veces con agua destilada y se adicionó amortiguador de bloqueo, dejándose en éste durante 30 min. Luego se lavó cuatro veces con PBS al 0.1% (v/v) de Tween<sub>20</sub> e inmediatamente se agregó 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo primario (mAb) (anti-TNF- $\alpha$  o anti-TGF- $\beta_1$  (SIGMA Co., USA) (ver apéndice 2) y la placa fue incubada a 37°C durante 1.5 hrs. Cumplido este tiempo, se lavó tres veces con PBS al 0.1% (v/v) de Tween<sub>20</sub>, después se adicionó amortiguador de bloqueo y la placa se mantuvo 10 min a temperatura ambiente y nuevamente se lavó tres veces con PBS al 0.1% (v/v) de Tween<sub>20</sub>. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo secundario (Ab)  $\alpha$ -conejo IgG (isotipo de inmunoglobulina G) conjugado con peroxidasa (SIGMA Co., USA) y se incubó una hora a 37 °C. Se repitieron tres lavados con PBS al 0.1% (v/v) de Tween<sub>20</sub> y se añadió el sustrato con 25  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno); de esta preparación se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  sustrato / pozo. Se dejó en oscuridad durante 5-10 min y la reacción fue detenida con 25  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de ácido sulfúrico 2.5 N (normal). Inmediatamente se procedió a evaluar la coloración formada en un lector de placas a 490 nm de absorbancia (EL<sub>X</sub>800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC).

Se construyó una curva de calibración del TGF- $\beta_1$  y del TNF- $\alpha$  por separado con una dilución seriada iniciada de 500 pmoles/mL y finalizada con 4 pmoles/mL. Esta curva fue considerada como control positivo. Asimismo, se emplearon controles negativos: a un pozo sin Ag (antígeno) se le dirigió el mAb y el Ab secundario; a otro pozo también sin Ag se le envió sólo el Ab conjugado; en ambas condiciones se bloqueo previamente con amortiguador de bloqueo. Esto se efectuó con la finalidad de eliminar los posibles errores originados por alguna unión inespecífica de los mAb y los Ab conjugados.

#### Evaluación de la bioactividad del TGF- $\beta_1$ en las células Mv1Lu

La línea celular Mv1Lu tiene como característica principal inhibir su crecimiento en presencia del TGF- $\beta$  (Wu *et al.*, 1996). Se cultivaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNCLON, Denmark), 2,500 células/pozo-100  $\mu$ L de medio ISCOVE'S (GIBCO, BRL) suplementado con 10% (v/v) de SFB. A las 24 hrs se sustituyó el medio por uno nuevo el cual contenía una dilución seriada iniciada con 400  $\mu$ g/mL de proteína total obtenida de los MCC (curva dosis-respuesta). Se efectuaron cuatro repeticiones por cada línea celular. Asimismo, se consideró un control positivo (2,500 células Mv1Lu con 10 ng/mL de TGF- $\beta_1$ ), y un control (células sin estímulo). Se realizaron evaluaciones de MCC con SFB (MCCc/s) y MCC sin SFB (MCCs/s) sobre dichas células. A las 48 h de cultivo se evaluó la proliferación celular con la tinción de cristal violeta.

#### Evaluación de la bioactividad del TNF- $\alpha$ en las células L-929.

El TNF- $\alpha$  es citotóxico sobre la línea celular L929, de tal forma que una unidad (U) de TNF- $\alpha$  se define como la cantidad TNF- $\alpha$  requerida para matar el 50% de dichas células. Esta citotoxicidad del TNF- $\alpha$  se potencializó con un adyuvante, la actinomicina D (Bharat & Jordan, 1992). Se evaluaron los MCCc/s y MCCs/s de las tres líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa para determinar si el TNF- $\alpha$  secretado presentó actividad biológica. Se sembraron  $4 \times 10^5$  células L-929 /0.1 mL de RPMI-1640 al 10% (v/v) de SFB en una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNCLON, Denmark) y se mantuvieron en cultivo durante

toda la noche. Después de ese tiempo, se añadió una dilución seriada iniciada con 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína total proveniente de los MCC conteniendo 0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de actinomicina D (SIGMA Co. USA). Se dejó en condiciones de cultivo 16 h a 37°C y se evaluó el índice de sobrevivencia con la técnica de cristal violeta.

#### **Bloqueo de la actividad del TGF- $\beta$ y del TNF- $\alpha$ con anticuerpos monoclonales anti -TGF- $\beta$ y anti-TNF- $\alpha$**

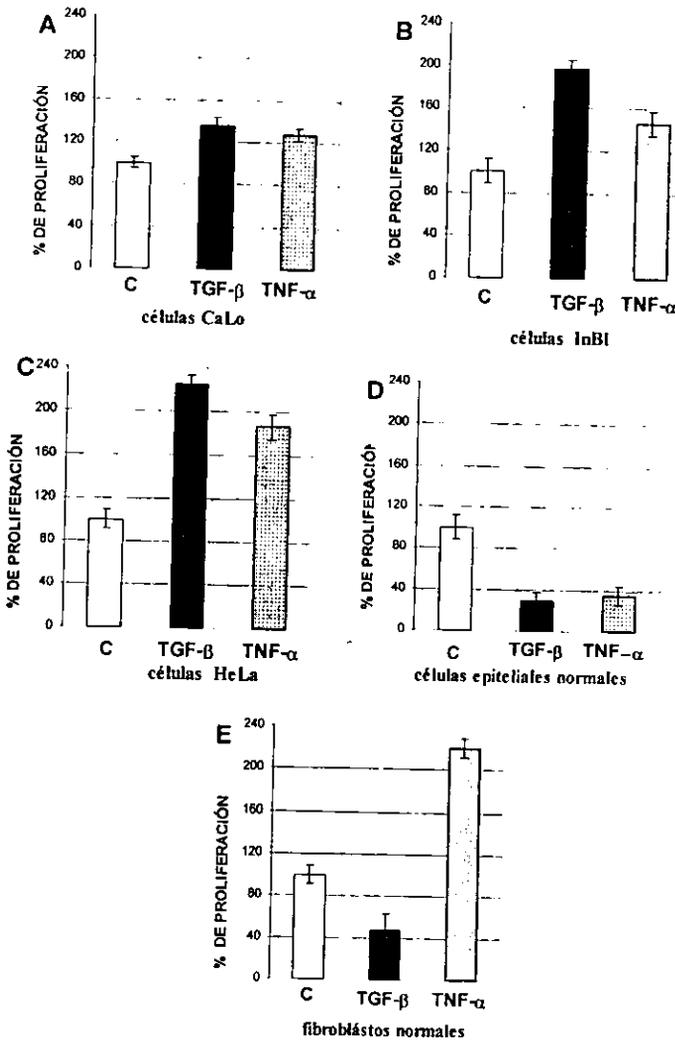
Se cultivaron en una placa de 96 pozos de fondo plano,  $5 \times 10^3$  células tumorales/pozo-100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB. A las 4 hrs se sustituyó el medio por uno fresco con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de mAb anti-TGF- $\beta_1$ . A las 48 h se evaluó la proliferación con tinción de cristal violeta. Este tratamiento fue paralelo en CaLo, InBl y HeLa por separado. Para evaluar el efecto del anti-TNF- $\alpha$  sobre las células CaLo, InBl y HeLa se emplearon las mismas condiciones de cultivo, añadiendo 0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de mAb anti-TNF- $\alpha$ .

#### **Análisis estadístico**

Los resultados provenientes de datos promediados de al menos tres experimentos independientes y de triplicados por condición, se les realizó un análisis de varianza considerando que las variancias son iguales, con una  $\alpha = 0.05$  ( $p > 0.05$ ). Tales cálculos se efectuaron en el programa EXCEL 2000.

## RESULTADOS

El TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  son poderosos inhibidores del crecimiento de células epiteliales y de varios carcinomas. Sin embargo, existen algunos carcinomas que han mostrado resistencia a tal inhibición, por lo que su papel inhibitor en este tipo celular no es claro. En el presente estudio las líneas tumorales HeLa, CaLo e InBl así como las células epiteliales y fibroblásticas normales provenientes de cérvix humano, fueron tratadas con el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  por separado. La concentración óptima del TGF- $\beta_1$  y del TNF- $\alpha$  (donde existió la máxima proliferación), fue determinada previamente a través de un ensayo dosis-respuesta. Con 0.01, 0.1, 1 y 5 ng/mL no hubo diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ); con 10 y 20 ng/mL hubo diferencia significativa con el control ( $p < 0.05$ ). Entre 10 y 20 ng/mL no hubo diferencia sigificativa ( $p < 0.05$ ). De esta forma, las células fueron tratadas con 10 ng/mL de TGF- $\beta_1$  y 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  (Figura 1).



**Figura 1.** Efecto del TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  en las líneas tumorales CaLo (A), InBI (B) y HeLa (C) provenientes de CaCu y en células epiteliales (D) y fibroblásticas (E) normales, provenientes de cérvix humano.  $2.5 \times 10^3$  células/pozo fueron sembradas en placas de 96 pozos en RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB y con  $1\mu\text{Ci/mL}$  de  $[\beta\text{-}^3\text{H}]\text{dTTP}$ . C = células sin tratamiento; TGF- $\beta_1$  = células con  $10\text{ng/mL}$  de rhTGF- $\beta_1$ ; TNF- $\alpha$  = células con  $10\text{ng/mL}$  de rhTNF- $\alpha$ . Ensayo evaluado a las 48 h de cultivo. La incorporación de  $[\beta\text{-}^3\text{H}]\text{dTTP}$  fue cuantificada en un contador de centelleo (BECKMAN) y los resultados fueron convertidos a porcentaje. Resultados promediados de tres experimentos independientes ( $p > 0.05$ ).

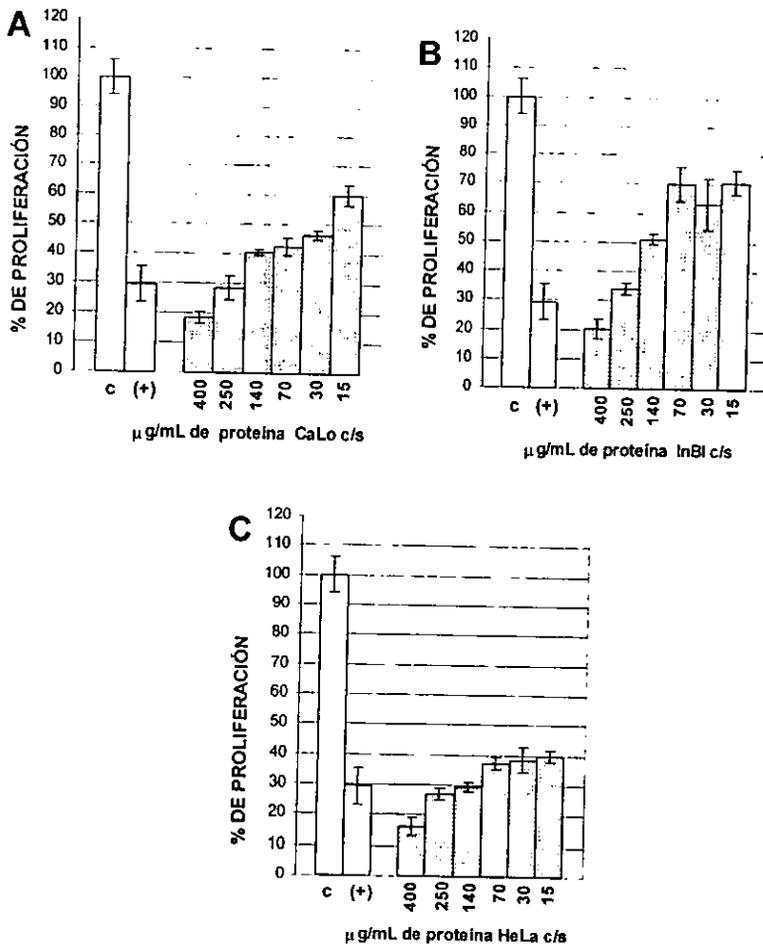
Los resultados obtenidos, indican que ambas citocinas inducen proliferación en las células tumorales (figura 1A, B, C). Sin embargo, el TGF- $\beta_1$  inhibe la proliferación de células epiteliales y fibroblásticas normales (figura 1D y E), mientras que el TNF- $\alpha$  inhibe la proliferación de células epiteliales e induce a la proliferación a las células fibroblásticas (figura 1D y E). Específicamente, el TGF- $\beta_1$  indujo en un 35% la proliferación de la línea **CaLo**, mientras que el TNF- $\alpha$  solo las indujo en un 25% (figura 1A). La línea **InBl** incrementó su proliferación en un 98% al ser tratada con el TGF- $\beta_1$  mientras que con el TNF- $\alpha$  solo se registró un incremento de un 45% (figura 1B). De manera similar, en la línea **HeLa** se observó un aumento de un 140% en la proliferación al ser estimulada con el TGF- $\beta_1$ , mientras que el TNF- $\alpha$  lo hizo en un 90% (figura 1C). Por otro lado, las células epiteliales normales inhibieron su proliferación al ser tratadas con ambas citocinas hasta en un 70% (figura 1D), mientras que las células fibroblásticas solo fueron inhibidas por el TGF- $\beta_1$  en un 55% e inducidas a proliferar en más del 100% con el TNF- $\alpha$  (figura 1E).

Dado que los tumores cervicales CaLo, InBl y HeLa, fueron inducidos a proliferar en presencia de TGF- $\beta_1$  o TNF- $\alpha$  exógeno, se genera la posibilidad de que estas citocinas puedan ser secretadas por las células tumorales. Para evaluar dicha posibilidad, se colectaron los sobrenadantes de células tumorales libres de suero a las 48 h de cultivo y se procedió a evaluar la presencia de TGF- $\beta_1$  y TNF- $\alpha$  a través del inmunoanálisis enzimático de ELISA (tabla 1).

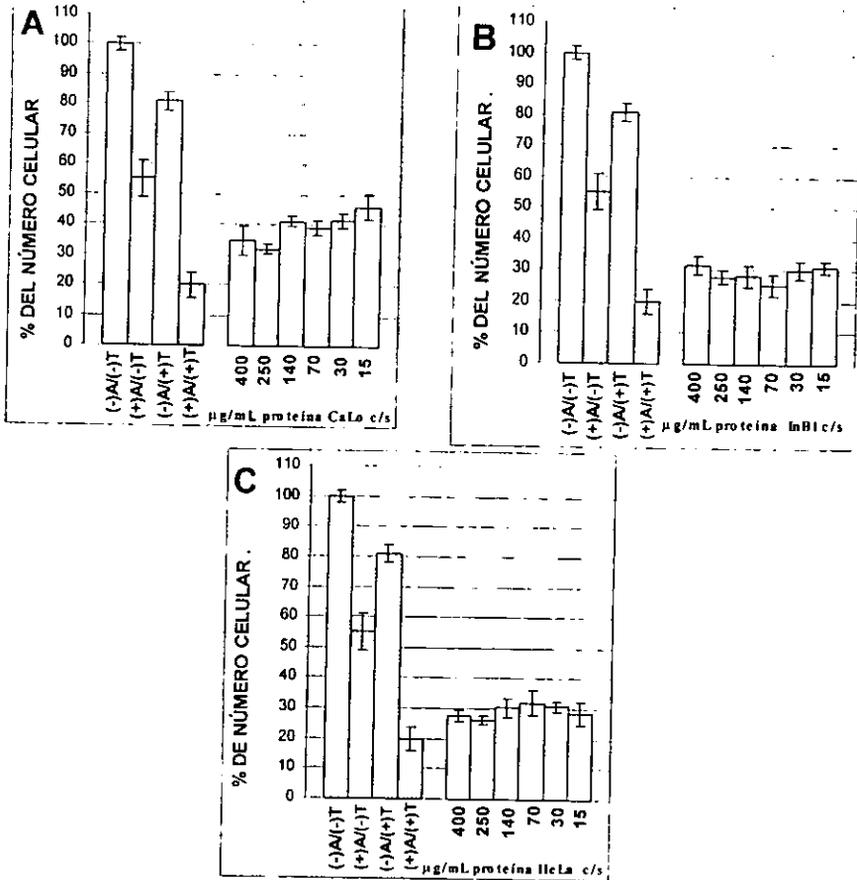
	TGF- $\beta_1$	TNF- $\alpha$
	pg/mL	pg/mL
<b>HeLa s/s</b>	39	36
<b>CaLo s/s</b>	98	682
<b>InBl s/s</b>	84	463

**Tabla 1.** Identificación del TGF- $\beta_1$  y del TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes (MCC) provenientes de las células tumorales CaLo, InBl y HeLa cultivadas sin SFB después de 48 h de cultivo, a través del inmunoanálisis enzimático de ELISA.

El inmunoanálisis de ELISA confirma que estas tres líneas tumorales son capaces de secretar el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  en concentraciones de picogramos/mL. Pese a la identificación de estas citocinas, se desconoce si éstas son funcionales. Es importante determinar su bioactividad debido a que Fahey *et al* (1996) han descrito la secreción de citocinas en células tumorales de manera latente (inactiva). Al respecto, se utilizaron dos líneas celulares, la Mv1Lu cuya particularidad consiste en que su proliferación es inhibida en presencia de TGF- $\beta$  y la L929, utilizada para detectar el efecto citotóxico del TNF- $\alpha$  en presencia del adyuvante actinomicina D. Ambas líneas fueron tratadas con los sobrenadantes provenientes de cultivos suplementados con 1% (v/v) de SFB (figura 2 y 3).



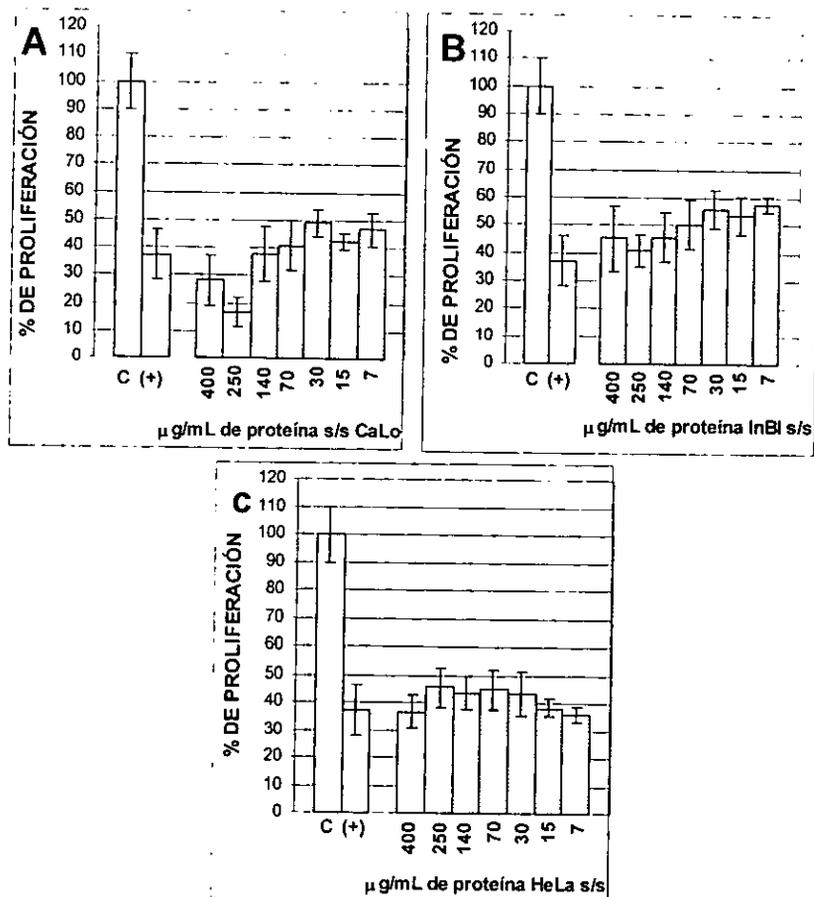
**Figura 2.** Determinación de la actividad biológica del TGF- $\beta_1$  proveniente de los MCC al 1% de SFB (MCC c/s) de las células CaLo (A), InBI (B) y HeLa (C) sobre la línea celular Mv1Lu la cual inhibe su proliferación en presencia de TGF- $\beta$ .  $2.5 \times 10^3$  células Mv1Lu/pozo fueron sembradas en placas de 96 pozos en RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB. C=control; (+)=control positivo (10ng/mL de TGF- $\beta_1$ ). Evaluación a las 48 h en condiciones de cultivo con la técnica de cristal violeta. Resultados promediados de tres experimentos independientes ( $p > 0.05$ ).



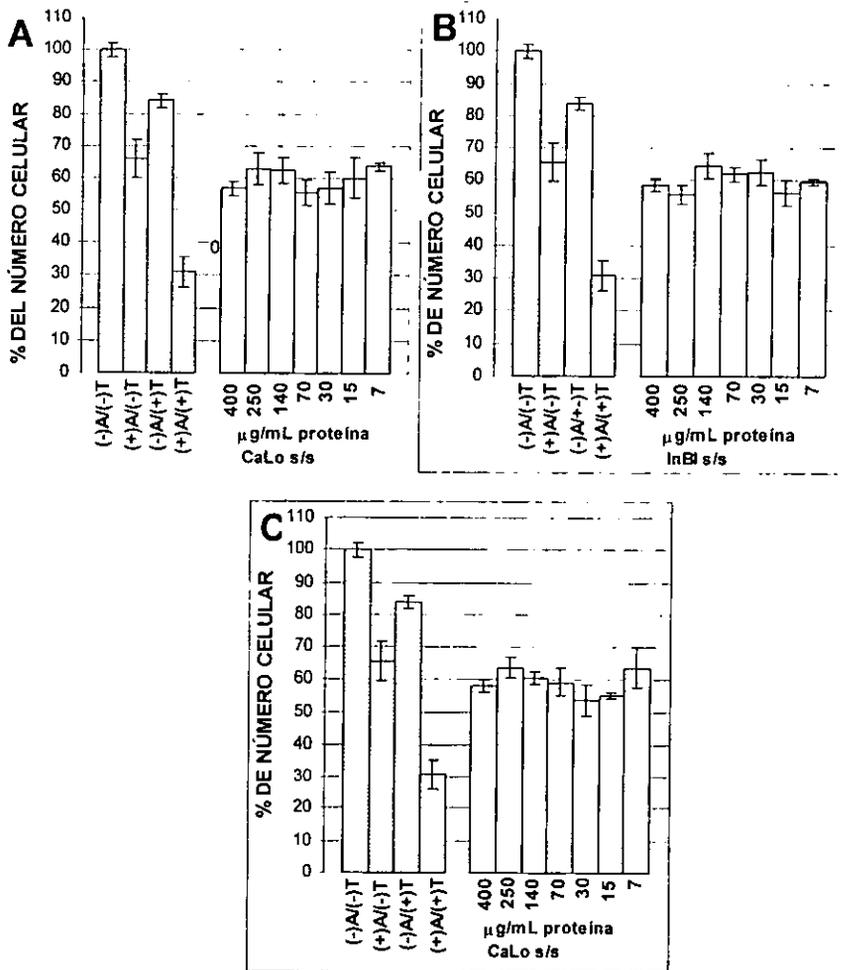
**Figura 3.** Determinación de la bioactividad del TNF- $\alpha$  proveniente de los MCC con 1% de SFB de CaLo (A), InBI (B) y HeLa (C) sobre la línea L929. El TNF- $\alpha$  es citotóxico en L929; tal actividad se potenció con 0.5  $\mu$ g/ mL actinomycin D. (-) = ausencia; (+) = presencia; A = Actinomycin D; T = 5 ng/mL TNF- $\alpha$ . Se sembraron  $4 \times 10^4$  células L929/pozo en RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB en un placa de 96 pozos y fueron mantenidas así toda la noche. Se añadió las concentraciones de proteína total procedentes de los MCC y a las 16 h se evaluó el número celular con la técnica de cristal violeta ( $p > 0.05$ ).

Los resultados presentados en las figuras anteriores, establecen que el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  secretado por las células tumorales son funcionales y tal actividad es dosis-dependiente. Sin embargo, es interesante hacer notar que mientras el efecto antiproliferativo del TGF- $\beta_1$  es muy significativo, el efecto citotóxico del TNF- $\alpha$  es

relativamente pequeño. Dado que las condiciones del ensayo son de MCC en presencia de SFB, existe la posibilidad de que el efecto registrado para ambas citocinas pueda ser interferido por algún elemento del suero, por lo que el ensayo anterior se repitió de manera similar, solo que en este caso los sobrenadantes fueron obtenidos de cultivos celulares libres de suero (Figura 4 y 5).



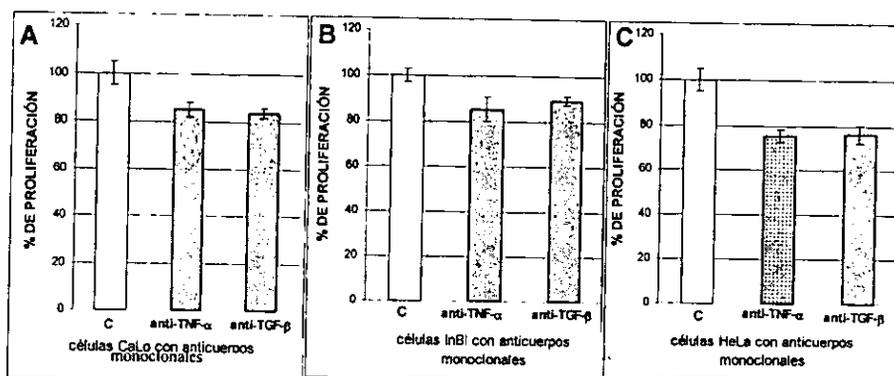
**Figura 4.** Determinación de la actividad biológica del TGF- $\beta_1$  proveniente de los MCC sin SFB (MCC s/s) de las células CaLo (A), InBI (B) y HeLa (C) sobre la línea celular Mv1Lu la cual inhibe su proliferación en presencia de TGF- $\beta$ . Se cultivaron  $2.5 \times 10^3$  células Mv1Lu/pozo en una placa de 96 pozos en RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. C = control; (+) = control positivo (10ng/ml de TGF- $\beta_1$ ). Evaluación a las 48 h en condiciones de cultivo con la técnica de cristal violeta ( $p > 0.05$ ).



**figura 5.** Determinación de la bioactividad del TNF- $\alpha$  proveniente de los MCC sin SFB (MCC s/s) de CaLo (A), InBI (B) y HeLa (C) sobre la línea celular L929. El TNF- $\alpha$  es citotóxico en L929; tal actividad se potencializa con 0.5µg/ mL actinomicina D. (-)= ausencia; (+)= presencia; A = Actinomicina D; T= 5 ng/mL TNF- $\alpha$ . Se sembraron  $4 \times 10^4$  células L929/pozo en RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB en un placa de 96 pozos y fueron mantenidas así toda la noche. Se añadió las respectivas concentraciones de proteína total procedente de los MCC y a las 16 h se evaluó el número celular con la técnica de cristal violeta ( $p > 0.05$ )

El efecto de estas citocinas observado en las figuras anteriores, muestran que el SFB no interfiere en el efecto antiproliferativo del TGF- $\beta$  de manera significativa (Figura 4), sin embargo, en el caso del TNF- $\alpha$  su pequeño efecto citotóxico mostrado en presencia de suero, se ve nulificado en ausencia de éste (figura 5).

Hasta el momento, los resultados establecen que las células tumorales son capaces de proliferar cuando son tratadas con TGF- $\beta_1$  o con TNF- $\alpha$  con exógeno. También se demuestra que las tres líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa son capaces de secretar el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$ . Sin embargo, cabe destacar que estos resultados no establecen una participación directa de estas citocinas endógenas con la capacidad proliferativa de las células tumorales, por lo que es necesario definir si el TGF- $\beta_1$  y el TNF $\alpha$  endógeno participan de forma directa en la capacidad proliferativa de las líneas tumorales. Al respecto, se adicionaron anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  a los cultivos de las células tumorales y su capacidad proliferativa fue evaluada a las 48 h en condiciones de cultivo a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta (Figura 6).



**figura 6.** Los anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha$  y anti-TGF- $\beta$  inhiben la proliferación de las células tumorales CaLo (A), InBl (B) y HeLa (C) al bloquear el TNF- $\alpha$  y el TGF- $\beta$  endógeno.  $5 \times 10^3$  células/pozo en RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB fueron cultivadas en un placa de 96 pozos y a las 4 h se añadió 0.18  $\mu\text{g/mL}$  de mAb anti-TNF- $\alpha$  y 1  $\mu\text{g/mL}$  de mAb anti-TGF- $\beta_1$  respectivamente. Evaluación a las 48 h de cultivo con la técnica de cristal violeta ( $p > 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en la figura 6, muestran que el TNF- $\alpha$  y el TGF- $\beta_1$  endógeno, tienen una participación significativa en la capacidad proliferativa de las células tumorales. En el caso del TGF- $\beta_1$ , su mayor acción proliferativa lo fue en las células HeLa con un 25% (figura 6-C) y su acción mínima fue en las células InBl con un 10% (figura 6-B). Con respecto al TNF- $\alpha$ , también tuvo una máxima acción proliferativa en las células HeLa con un 25% (figura 6-C), un 10% en CaLo (figura 6-A) y un 15% en InBl (figura 6-B).

## DISCUSIÓN

La inhibición del crecimiento, es un proceso importante en el control de la división de las células normales (Cipriano & Yong, 1998). El estudio de la participación de factores de crecimiento es de primordial importancia para la comprensión de dicho mecanismo. En el caso particular de las células tumorales provenientes de CaCu, no se conoce con certeza el papel que cumplen los factores de crecimiento en la regulación de la división celular. Los resultados obtenidos aquí indican que en las líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa, el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  son capaces de inducir las a proliferar de manera significativa (figuras 1 A, B, C). Es importante este descubrimiento, ya que los reportes existentes sobre estas citocinas, revelan que las células tumorales pueden ser inhibidas por ellas, aunque hay tumores que son resistentes a tal efecto inhibitor o citotóxico (Malejczyk *et al.*, 1992; Azuma *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 1999; Viegas *et al.*, 1999; Wikstrom *et al.*, 1999). Recientemente, Woodworth *et al* (1995) han descrito algunos tumores cervicales capaces de proliferar con 0.01-0.1M (170  $\mu\text{g/mL}$ - 1.7  $\text{mg/mL}$ ) de TNF- $\alpha$  exógeno, sin que tales células lo produzcan y en contraste, Rorke & Jacobberger (1995) han demostrado que con 100  $\text{pg/mL}$  el TGF- $\beta_1$  es capaz de inhibir el crecimiento de una línea tumoral cervical (línea ECE16-1). El hecho de que las células tumorales CaLo, InBl y HeLa respondan a estas citocinas incrementando su capacidad proliferativa, genera la posibilidad de que el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  estén relacionados con el estado transformante de estas células. Por otro lado, ambas citocinas causaron inhibición de la proliferación en las células epiteliales cervicales normales (figura 1D), lo cual concuerda con lo establecido por Woodworth *et al* (1995) quienes mencionan que el TNF- $\alpha$  exógeno inhibe el crecimiento de epitelios cervicales normales.

La diferencia de respuesta entre las células epiteliales normales con respecto a las tumorales podría ser originada en éstas últimas, por una carencia en el número de receptores o a la presencia de receptores mutados para estas citocinas, e inclusive estén participando receptores distintos, como es el caso del receptor para el EGF (Factor de Crecimiento Epidermal), el cual puede enlazar a otras citocinas (como el IFN- $\gamma$ , el TGF-

$\alpha$ , incluyendo al TNF- $\alpha$ ) para inducir la proliferación en carcinomas (Woodworth *et al.*, 1995). Asimismo, la respuesta proliferativa del TGF- $\beta_1$  en las células CaLo, InBl y Hela puede deberse a la existencia de desórdenes en la transducción de señales del TGF- $\beta_1$  vía CDK's (Cinasas Dependientes de Ciclinas) de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular así como de las proteínas Smad (Smad2, Smad3, Smad4) como se ha discutido en tumores resistentes a la inhibición por dicha citocina (Cipriano & Yong, 1998; Kretzschmar & Massagué, 1998; Bristow *et al.*, 1999).

Con respecto a las células fibroblásticas, es importante notar que el TGF- $\beta_1$  inhibe la proliferación de estas células, contrario a lo reportado por Clark *et al* (1997) quienes mencionan un papel mitogénico de esta citocina en fibroblastos de pulmón y de piel humano, implicando que este factor puede actuar de forma citostática o mitogénica dependiendo del órgano del cual provengan dichas células; sin embargo, en las células epiteliales normales de cérvix, el TGF- $\beta_1$  se mantiene como un poderoso factor de la inhibición de la proliferación. Mientras tanto, la acción inhibitoria de la proliferación del TNF- $\alpha$ , en epitelios normales de cérvix, coincide con el trabajo de Woodworth *et al* (1995) quienes documentan que con 0.01M (170  $\mu$ g/mL) hasta con 0.1M (1.7 mg/mL), el TNF- $\alpha$  inhibe el crecimiento de los epitelios cervicales normales. En el presente estudio, con una concentración de 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  fue suficiente para inhibir el crecimiento de los epitelios cervicales y además inducir la proliferación en las células tumorales, concentración que es factible se halle en condiciones *in vivo* durante un cáncer. En cuanto a las células fibroblásticas, los resultados fueron similares a los establecidos por Kwon *et al* (1998) quienes mencionan que el TNF- $\alpha$  es un factor inductor de la proliferación de fibroblastos de piel y de prepucio humano.

Por otro lado, las células tumorales no sólo respondieron al TGF- $\beta_1$  y al TNF- $\alpha$  exógenos sino que también fueron capaces de secretarlos de manera bioactiva, como se demuestra en la Tabla 1 y figuras 2, 3 y 4. Este hallazgo es importante debido a que Fahey *et al* (1996) han documentado la secreción del TGF- $\beta_1$  en queratinocitos orales en forma latente (inactiva) y han tenido que recurrir al tratamiento de acidificación y neutralización

para bioactivarlo. En el presente estudio no se recurrió a ningún tratamiento de los MCC para hacerlos bioactivos. De igual manera, se muestra que la secreción y la actividad del TGF- $\beta_1$  en los MCC no se alteró de manera significativa por el SFB, lo que indica que dicho SFB no induce interferencia. Sin embargo, cabe mencionar que la pequeña actividad citotóxica del TNF- $\alpha$  en presencia de suero (figura 3), se nulifica en ausencia de éste (figura 5), sugiriendo que el SFB puede estar contribuyendo en aportar algún elemento sérico para mantener la funcionalidad del TNF- $\alpha$ , cuyo elemento se desconoce cual sea y como actúe. Por otro lado, la nula actividad citotóxica del TNF- $\alpha$ , implica que ésta citocina no es utilizado por las células tumorales como un factor citotóxico (figura 5). La probable pérdida de esta función del TNF- $\alpha$  endógeno ha sido explicada por Chang (1998), quien ha descrito que las células L929 en presencia de TGF- $\beta$  se hacen resistentes a la citotoxicidad por TNF- $\alpha$ , por lo que aquí se sugiere que la actividad citotóxica del TNF- $\alpha$  presente en los sobrenadantes de las células CaLo, InBl y HeLa, es bloqueado por el TGF- $\beta_1$  endógeno. De igual manera, existe la posibilidad de que el TNF- $\alpha$  producido por las células CaLo, InBl y HeLa, aumenten la secreción de TGF- $\beta_1$ , como lo han examinado Danforth & Magdalene (1996) en carcinomas de mama (líneas MCF-7 y ZR-75-1) quienes describen que con 100 ng/mL de TNF- $\alpha$  exógeno inducen la secreción de TGF- $\beta$  en ambas líneas tumorales, pero ésta es producida de forma latente.

Finalmente, la adición de anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigido contra estas citocinas, indican que el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  están involucrados directamente con la capacidad proliferativa de estas células tumorales como se muestra en la figura 6. Se sugiere que el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  endógenos sean secretados de manera facultativa y autócrina por las líneas tumorales. Sin embargo, tales anticuerpos neutralizantes no abaten completamente la capacidad proliferativa de estas células, generando la posibilidad de que otros factores estén participando en el incremento de dicha capacidad proliferativa.

En el caso del TNF- $\alpha$ , se plantea la posibilidad que ésta citocina secretado por las células CaLo, InBl y HeLa estimule la producción de otro(s) factor(es) de crecimiento, como lo demuestran Woodworth *et al* (1995) quienes cultivando células tumorales tratadas

con TNF- $\alpha$  favorecen la secreción de anfirregulina (un factor de crecimiento polipeptídico) la cual induce su proliferación. El hecho de que al TNF- $\alpha$  no se le haya encontrado actúe como un agente citotóxico, sugiere que las células tumorales lo están utilizando para otro propósito. Al respecto y pensando en la estrategia de las células tumorales para utilizar este factor de manera tal que les proporcione un fuerte beneficio, se sugiere que éste sea usado como un agente inductor de la adherencia celular ya que es conocido que el TNF- $\alpha$  es un potente inductor de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (células que revisten la luz de los vasos sanguíneos), por lo que sería interesante evaluar, por un lado, si los sobrenadantes obtenidos de cultivos de células tumorales provenientes de CaCu, son capaces de inducir adherencia celular y por el otro, de resultar cierto lo anterior, evaluar si dicha capacidad de inducir adherencia celular es ejercida por el TNF- $\alpha$  así como además investigar qué moléculas de adhesión son las que participan. Tales estudios nos podrían ayudar a entender el papel que juega el TNF- $\alpha$  endógeno en la adhesión de células tumorales a los endotelios durante el fenómeno de la metástasis. Aunado a ello, la secreción de tales citocinas por estas células puede proveer una ventaja de crecimiento selectivo *in vivo*, ya que ambas citocinas inhiben el crecimiento de las células epiteliales normales, contribuyendo así a la carcinogénesis cervical (Woodworth *et al.*, 1995).

Englobando los resultados presentados aquí, la importancia de estas dos citocinas para las células tumorales y/o para entender el mecanismo de transformación celular, permiten evidenciar que éstas no fueron seleccionadas al azar por las células tumorales para ser producidas, sino más bien por sus múltiples funciones. La secreción de tales citocinas *in vivo* podría tener implicaciones mayores dada la diversidad de funciones de dichos factores; por ejemplo, es conocido que el TGF- $\beta$  es un potente factor inactivador e inhibidor de la proliferación y diferenciación de células linfocíticas, las cuales llevan a cabo la eliminación de las células tumorales en el organismo; también, dicha citocina juega un importante papel como factor angiogénico (promueve la neovascularización) lo que permitiría la llegada más eficiente y rápida de nutrientes a dicha masa tumoral, y junto con ello, representar una vía de diseminación alternativa y promotora de la metástasis; entre otras funciones (Comerci *et al.*, 1995; Heider & Beug, 1998; Nagy & Vanky, 1998; Richards *et al.*, 1998; Yusa *et al.*, 1999). Por lo tanto, sería conveniente que en un futuro se continúe este trabajo en la

dirección que permitan abordar las expectativas anteriores y dar respuesta a las incógnitas que nos ofrece dicha patología. De igual manera, generar información no sólo para comprender la transformación celular sino también, para diseñar terapias que den mejor solución a este padecimiento.

## CONCLUSIONES

- El TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  exógenos aumentaron la capacidad proliferativa de las células tumorales CaLo, InBI y HeLa.
- Las células tumorales CaLo, InBI y HeLa secretan el TGF- $\beta_1$  y el TNF- $\alpha$  en cantidades de picogramos/mL.
- El TGF- $\beta_1$  secretado con y sin suero por las células tumorales CaLo, InBI y HeLa es bioactivo.
- El TNF- $\alpha$  liberado por las células tumorales CaLo, InBI y HeLa presenta baja actividad biológica en sobrenadantes con suero y esta es nula en sobrenadantes libres de suero.

## REFERENCIAS

- Abbas, A.K.; Andrew H. L. Jordan S.P. (1996) *Inmunología Celular y Molecular*. Ed. Interamericana. Madrid. pp. 276-281.
- Aggarwal B & Ni J. (1998). **TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption.** *FASEB J*, 12(10):845-54.
- Agocha A., Andreas V. Sigel, Mahoboubeh Eghbali-Weblo (1997). **Characterization of adult human heart fibroblasts in culture: a comparative study of growth, proliferation collagen production in human and rabbit cardiac fibroblasts and their response to transforming growth factor-beta.** *Cell and Research*, 288:87-93.
- Aiyer R. A., Aggaewal BB (1988). **Tumor Necrosis Factor.** In: *CRC handbook on cytologic lymphocytes and Complement: Effectors of the Immune System*. Ed. Podak E.R. England. pp.105-132.
- Alberts B. (1996). *La Célula*. Ed. Interamerica. Madrid. pp. 301
- Alonso, A. (1999). **El cáncer cervicouterino y acciones para tratarlo.** *Investigación y desarrollo*. México. No. 74, pp.10.
- Antoshina E & Ostrowski LE (1997). **TGF beta 1 induces growth arrest and apoptosis but not ciliated cell differentiation in rat tracheal epithelial cell cultures.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, (3):212-7.
- Armitage, R.J. (1994). **Tumor Necrosis Factor receptor superfamily members and their ligands.** *Current Opinion Immunology*, 6:407-13.
- Arteaga CL; Dugger TC; Hurd SD. (1996). **The multifunctional role of transforming growth factor (TGF)-beta on mammary epithelial cell biology.** *Breast Cancer Res Treat*, 38(1):49-56.
- Atabizadeh SS; Satyaswaroop PG; Rao PN. (1988). **Antiproliferative effect of interferon-gamma in human endometrial epithelial cells in vitro: potential local growth modulatory role in endometrium.** *J.Clin Endocrinol Metab USA* 67(1):131-8.
- Azuma M, Motegi K, Aota K, Yamashita T, Yoshida H, Sato M. (1999). **TGF-beta1 inhibits NF-kappaB activity through induction of IkappaB-alpha expression in human salivary gland cells: a possible mechanism of growth supression by TGF-beta1.** *Exp. Cell Res*, 250(1):213-22.
- Bazzoni, G.; Dejana, E.; Grazia, M. (1999). **Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths.** *Current Opinion in the Cell Biology*, 1:573-81.
- Bendtsen, K.(1994) **Cytokines and natural regulators of cytokines.** *Immunology Letters*. 43:111-23
- Berumen J, Villegas N. (1997). **Recombinant therapeutic vaccines against invasive cervical cancer.** *Salud Pública Méx*, 39:288-297.
- Beutler B. & Ceram A. (1989). **The biology of cachetin /TNF: a primary mediador of hast response** *Annu Rev Inmuno; USA*, 7: 625.
- Bharat, B.A.; Jordan, U.G. (1992); **Human Cytokines**; Blackwell Scientific Publications, 408 pp.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- Boente MP; Berchuck A; Rodriguez GC; Davidoff A; Whitaker R; Xu FJ; Marks J; Clarke-Pearson DL; Bast (1992). The effect of interferon gamma on epidermal growth factor receptor expression in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol*, 167(6):1877-82.
- Bogin L; Papa MZ; Polak-Charcon S; Degani H. (1998). TNF-induced modulations of phospholipid metabolism in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1392(2-3):217-32.
- Bradford Marion M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bristow, R.; Lynn, R.; Diane, S.; Korc, M.; Karlan, B. (1999). Altered expression of transforming growth factor-beta ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma. *Cancer* 85:658-68.
- Bryckaert, MC; Lindroth, M; Loenn, A; Tobelem, G; Wasteson, A. (1988). Transforming growth factor beta (TGF-beta) decreases the proliferation of human bone marrow fibroblasts by inhibiting the platelet-derived growth factor (PDGF) binding. *Experimental Cell Research*, 179(2):311-321.
- Bulbulian, S. (1987). *La Radiactividad. La Ciencia desde México*. No. 42. Ed. Fondo de Cultura Económica. 120 pp.
- Burke F; East N; Upton C; Patel K; Balkwill (1997). Interferon gamma induces cell cycle arrest and apoptosis in a model of ovarian cancer: enhancement of effect by batimastat. *J Cancer*, 33(7):1114-21.
- Carl-Henrik H. & Bengt W. (1989). Growth factors as transforming proteins. *J. Biochem*, 184, 487-496.
- Carswell, E.A. Old L.J.; Kassel R.L. Green S. Fiore N. Williamson B. (1975). An endotoxin-induced Serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 72: pp. 3666-3670.
- Chang, N. (1998). Transforming growth factor-beta protection of cancer cells against tumor necrosis factor cytotoxicity is counteracted by hyaluronidase. *Int J Mol Med*, 2(6):653-9.
- Chávez, G.M.A. (1997). Purificación del factor Inhibidor de la proliferación (FIP) y Evaluación de su Efecto en el Ciclo Celular de Fibroblastos de Cérvix Humano. Tesis Licenciatura, UNAM; México, D.F.; 65 pp.
- Chen, S-H; Oakes, JE; Lausch, RN (1994). Synergistic anti-herpes effect of TNF- alpha and IFN-gamma in human corneal epithelial cells compared with that in corneal fibroblasts. *Antiviral Research*, 25( 3-4): 201-213.
- Cipriano S.C.; & Yong, Q.C (1998). Insensitivity to growth inhibition by TGF-β1 correlates with a lack of inhibition of the CDK2 activity in prostate carcinoma cells. *Oncogene*. 17, 1549-1556.
- Clark RA; McCoy GA; Folkvord JM; McPherson JM. (1997). TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event *J Cell Physiol*, 170(1):69-80.
- Comerci, J.; Runowicz, D.; Kathlenn, C.; Fields, A.; Kadish A. Golderg L. (1995). Altered expression of transforming growth factor beta 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. *Cancer*, 77(6):1107-14.
- Conn & Stumpf. (1984). *Bioquímica Fundamental*. 3ª edición. México. pp.132.

- 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.
- Cunliffe IA; Rees RC; Rennie IG. (1996). **The effect of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 on the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in tissue culture.** Acta Ophthalmol Scand, 74(1):31-5.
- David N; Danforth Jr; Magdalene KS. (1996). **Tumor Necrosis Factor alpha enhances secretion of transforming growth factor beta2 in MCF-7 Breast Cancer cells.** Clinical Cancer Research, 2: 827-835.
- De Larco J.E. and G.J. Todaro. (1978). **Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4001.
- Dinarelli, C.A. , Renfer, I., Wolf, S.M. (1977). **Human Leukocytic Pyrogen Purification and development of radioimmunoassay.** Proc. Natl. Acad. Sci USA, 74:4624.
- Dkhissi F; Raynal S; Lullien P; Lawrence DA. (1999). **Growth stimulation of murine fibroblasts by TGF-beta1 depends on the expression of a functional p53 protein.** Oncogene, 18(3):703-11.
- Durum S.K. & Muegge, K.(1998). **Cytokine Knockouts.** Human Press New Jersey. 369-71
- Elkas J; Farias-Eisner R (1998). **Cancer of the uterine cervix.** Curr Opin Obstet Gynecol, 10(1):47-50.
- Estrada A.B. (1998). **Efecto del factor de necrosis tumoral alfa en la expresión de moléculas de adhesión en cultivos primarios de células endoteliales humanas.** Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias-UNAM. México. pp. 4-5.
- Fahey MS; Paterson IC; Stone A; Collier AJ; Heung YL; Davies M; Patel V; Parkinson EK; Prime SS (1996). **Dysregulation of autocrine TGF-beta isoform production and ligand responses in human tumour-derived and Ha-ras-transfected keratinocytes and fibroblasts.** Br J Cancer, 74(7):1074-80.
- Fenig, E; Sulkes, A; Rescigno, J; Shohat, B. (1994). **Interleukin-1 beta plasma levels decrease following local radiation therapy for breast cancer** Radiation Oncology Investigations, 2(5): 224-229.
- Ferdy, JL; Curzio R; Danielle Liénerd. (1998). **Clinical applications of TNF-alpha in cancer.** Current Opinion in Immunology, 10:573-580.
- Franco E. (1993). **Human Papillomavirus and the Natural History of Cervical Cancer.** Highlits from: Infections in Medicine. pp. 37-40
- Freitag A; Reimann A; Wessler I; Racke K. (1996). **Effects of bacterial lipopolysaccharides (LPS) and tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) on rat tracheal epithelial cells in culture: morphology, proliferation and induction of nitric oxide (NO) synthase.** Pulm Pharmacol, 9(3):149-56.
- Freshney. R.I.(1994). **Culture of animal cell. A manual of basic technique.** 3a. Ed. Wiley-Liss INC. New York. USA. pp 45.
- Gariglio, P.; Benitez-Bribiesca L.; Berumen J.; Alcocer J.; Tamez R.; Madrid, V. (1998). **Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans.** Archives of Medical Research, 29(4): 279-84.
- Gerritsen ME; Shen CP; Perry CA.(1998). **Synovial fibroblasts and the sphingomyelinase pathway: sphingomyelin turnover and ceramide generation are not signaling mechanisms for the actions of tumor necrosis factor-alpha.** Am J Pathol, 152(2):505-12.

- Giora M; Mavligt, ; Alexander A; Zukiwksi; Chustlip Charnsangavenj, Carrasco idney W.; Gutterman U. (1991). **Regional Biologic Therapy**. *Cancer*, 69:557-561.
- Gradilone, A.; Vercillo R.; Napolitano M.; Cardinali G.; Gazzanigga P.; Silvestri J.; Gandini O.; Tomao S.; Galiano A.M. (1996). **Prevalence of Human Papillomavirus, Cytomegalovirus, and Epstein-Barr Virus in the Cervix of Helthy Woman**. *Journal of Medical Virology*, 50: 1-4.
- Griffiths, B. (1988). **Scaling-up of animal cells cultures**. R.I. *Animal Cell Culture practical aproach*. Ed. Freshney, A. 2a Ed. IRL Press. England. 315 pp.
- Grimbacher B; Aicher WK; Peter HH; Eibel H. (1998). **TNF-alpha induces the transcription factor Egr-1, pro-inflammatory cytokines and cell proliferation in human skin fibroblasts and synovial lining cells**. *Rheumatol Int*, 17(5):185-92.
- Goustin, A. S; Leof, E.B; Shipley, G.D; y H.L. Moses. (1986). **Growth factors and cancer**. *Cancer Reseach*, 46:1015.
- Guo M.; Hay B. (1999). **Cell proliferation and apoptosis**. *Current Opinion in Cell Biology*, 11:745-52.
- Guangren Z.; Gordon W.; (1998). **Characterización of a Second Transcription Initiation Element (STIE) in the Human Interleukin-1 Beta (IL-β) Gene**. *DNA and Cell Biology*, pp. 19-25.
- Harunobu O; Kenji Y., Hisanori H.; Hidenori A Takairo K.; Katsuya O.; Akihiro Y. Toru K. (1999). **Cutting Edge: Combined treatment of TNF-α and IFN-γ causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells**. *The Journal of Immunology*, 163: 553-557.
- Heider O. & Beug H. (1998). **TGFβ signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis**. *Curr Biol*, 8(23):1243-52.
- Hernández-Ávila, M.; Lazcano-Ponce, E.; Berumen-Campos, J.; Cruz-Valdéz A.; DeRuiz P.; González Lira G. (1997). **Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: A case-control study**. *Archives of Medical Research*, 28(2): 265-71.
- Herrera RE; Makela TP; Weinberg RA (1996); **TGF beta-induced growth inhibition in primary fibroblasts requires the retinoblastoma protein**. , *Mol Biol Cell*, 7(9):1335-42.
- Ibarra S.M.J (1997). **La ceramida como segundo mensajero del efecto citotoxico del factor de necrosis tumoral: posible participación de una proteína fosfatasa 2A activada por ceramida y sensible al ácido okadaico** Tesis de Maestría. México, D.F. UNAM. pp.5-11.
- Janeway-Travers (1997). **Immunobiology, the immune system in health and disease**, Third edition. Garland Publishing. New York and London. 980 pp.
- Jiang Y & Porter AG. (1998). **Prevention of tumor necrosis factor (TNF)-mediated induction of p21<sup>WAF1</sup>/CIP1 sensitizes MCF-7 carcinoma cells to TNF-induced apoptosis**. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(3):691-7.
- Kang SH, Bang YJ, Jong HS, Seo JY, Kim NK, Kim SJ. (1999). **Rapid induction of p21<sup>WAF1</sup> but delayed down-regulation of Cdc25A in the TGF-beta-induced cell cycle arrest of gastric carcinoma cells**. *Br J Cancer*, 80(8):1144-9.
- Karp G. (1996). *Biología Celular y Molecular*. Ed.. MacGraw-Hill. México. pp.671-692.
- Kelso, A. (1989). **Cytokines: structure, function and syntesis**. *Current Opinion in Immunology*. 2 pp.216.

- Kilian, P.L., Kaffka, K.L., Biondi, D.A., Lipman, J.M., Benjamin, W.R., Felman, 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.
- Kim YS, Yi Y, Choi SG, Kim SJ. (1999). **Development of TGF-beta resistance during malignant progression.** *Arch Pharm Res*, 22(1):1-8.
- Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, Studer H. (1999). **Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas a comparative study.** *Thyroid*, 9(2): 119-25.
- Kloen P., Mark C. G., Antonio P. A., Andrew E. R., Dempsey. S. S., Leslie I. G., Henry J. M. (1997). **Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Isoforms in Osteosarcomas.** *American Cancer Society*, pp. 2230-39.
- Ko, TC; Yu, W. Sakai, T; Sheng, H; Shao, J; Beauchamp, RD; Thompson; EA. (1998). **TGF-beta effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression.** *Oncogene*. 16(26):3445-54.
- Kobayashi M; Niitsuma T; Hayashi Tanaka M; Takizawa (1998). **Interferon-gamma inhibits the growth of human bronchial epithelial cells independently of transforming growth factor-beta-1 and nitric oxide (NO).** *Biochem Biophys Res Commun*, 244(1):126-30.
- Konstantopoulos N & Burgess, A. (1997). **Growth factors, signaling and cancer.** *Molecular Medicine Today*, pp. 284-85.
- Kovacs E.J.; Danuta R.; Howard A.Y. and Luigi V. (1988). **Differential Inhibition of IL-1 and TNF- $\alpha$  mRNA Expression by Agents which Block Second Messenger Pathways in Murine Macrophages.** *The Journal of Immunology*, 141(9): 3101.
- Kretschmar, M.; Massagué, J. (1998). **SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling.** *Current Opinion in Genetics and Development*. 8:103-111.
- Kueng W., Silver E., Eppenberger V. (1986). **Quantification of cells cultured on 96-well plates.** *Analytical Biochemistry*, 16-19.
- Kwon BS; Wang S; Udagawa N; Haridas V; Lee ZH; Kim KK; Oh KO; Greene J; Li Y; Su J; Gentz R; Lertchirakarn V; Birner R; Messer HH. (1998). **Effects of interleukin-1 beta on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis.** *J Endod*, 24(6):409-13.
- Landesman Y., Bringold F., Milne D.D. Mekk D.W. (1997). **p53 protein and accumulation of p21 and gadd45 mRNA in TGF-beta1 growth inhibited cells.** *Cell Signal*, 9;3/4:291-298.
- Lange, W.Brugger, F.M. Rosenthal, L. Kanz, A. Lindermann (1992) **The Role of Cytokines in Oncology.** *Clinical and Experimental Hematology*, pp. 13-19.
- Lee DH, Yang SC, Hong Sj, Chung BH, Chung HJ, Tokunaga H, Kim IY, Song YS, Lerner SP, Morton RA. (1999). **The loss of expression of transforming growth factor-beta receptors correlates with the histopatologic tumor grade in bladder transitional cell carcinoma patients.** *Yosein Med J*, 40(2):118-23.
- Lejeune F.J.; Curzio, R.; Danielle L. (1998). **Clinical Applications of TNF- $\alpha$  in Cancer.** *Current Opinion in Immunology*, 10:573-580.

Liu RY; Fan C; Mitchel S; Chen Q; Wu J; Zuckerman KS. (1998). **The role of type I and type II tumor necrosis factor (TNF) receptors in the ability of TNF-alpha transduce a proliferative signal in the human megakaryoblastic leukemic cell line Mo7e.** *Cancer Research*, 58(10): 2217-23.

Lizard G; Chignol MC; Chardonnet Y; Schmitt D. (1996). **Differences of reactivity to interferon gamma in HeLa and CaSki cells: a combined immunocytochemical and flow-cytometric study.** *J Cancer Res Clin Oncol*, 122(4):223-30.

Llold J. Old. (1988). **El Factor de Necrosis Tumoral.** Investigación y Ciencia. Madrid. Julio, número 142. pp. 29-37.

Longstreet, M; Miller, B; Howe, PH. (1992). **Loss of transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1)-induced growth arrest and p 34 super(cdc2) regulation in ras-transfected epithelial cells.** *Oncogene*, 7(8):1549-1556.

López-Marure, R. (1997). **Caracterización de la Respuesta Antiproliferativa de células endoteliales humanas al Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ).** Tesis Doctoral. UNAM, México D.F. 122 pp.

Malejczyk J; Malejczyk M; Köck A.; Urbanski A.; Majewski S.; Hunzelmann N.; Jablonska s.; Orth G.; Jablonska S.; Orth G. Luger T. (1992). **Autocrine Growth Limitation of Human Papillomavirus Type 16-Harboring Keratinocytes by Constitutively Released Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ .** *The Journal of Immunology*, 149(8):2702-08.

Margni (1996). *Inmunología Clínica.* Ed. Medica-Panamericana. México. 680 pp.

Mark E. Ewen, Carey J. Oliver, Hayla J. Sluss, Susan J. Miller, and Daniel S. Peeper. (1995). **p53-Dependent repression of cdk4 traslation in TGF- $\beta$ -induded G1 cell-cycle arrest.** *Genes and Development*, pp.204-217.

Matsushita, M. Matsuzaky, K., Date, M., Nakagawa, T., Amoh, Y., Takemoto, H., Kubota, Y., Seky, T., Sawamura, T., Okamura, A., and K. Inoue. (1999). **Down-regulated of TGFbeta receptors in human colorectal cancer: implications for cancer development.** *Br. J Cancer*, 80(1/2):194-205.

McGee, DW; Bamberg, T; Vitkus, SJD; McGhee, JR. (1995). **A synergistic relationship between TNF-alpha, IL-1 beta, and TGF- beta 1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial.** *Immunology*, 86(1): pp. 6-11.

McGowan SE. (1992). **Influences of endogenous and exogenous TGF-beta on elastin in rat lung fibroblasts and aortic smooth muscle cells.** *Am J Physiol*, 263(2 Pt 1):L257-63.

Meager, A. (1991). *Cytokines.* Ed. Prentice Hall. USA. 280 pp 1-8.

Mire-Sluis A.R. & Torpe R. (1998). *Cytokynes.* Ed. Academic Press. USA. pp. 335-351, 415-426

Molema, H.; Hermens, R.; Wanebo H.; Reichner J.; Hoekstra H. (1999). **The effect of surgical wounding on tumor development.** *Eur J Surg Oncol*. 25(3): 231-43.

Monroy, A. G. (1991). **Citotoxicidad de Linfocitos de la Sangre Periférica sobre Células Provenientes de Tumores de Cáncer Cérvico-Uterino en Presencia de Interleucina-2 recombinante humana.** Tesis Maestría. en IBSh. UNAM. México, D.F. 120 pp.

Monroy, A. G. (1999). **Estudio de la actividad estimuladora de péptidos presentados por moléculas MHC-I de células tumorales de carcinoma cérvico uterino sobre linfocitos T de sangre periférica.** Tesis Doctoral (Bioquímica). UNAM, D.F. 148 pp.

- Moses, H; Yang E.; Pietenpol J. (1990). **TGF- $\beta$  stimulation and inhibition of Cell proliferation: New mechanistic insights.** Cell. 63:245.
- Murray A. (1994). **Cell Cycle Checkpoints.** Current Opinion in Cell Biology, 6(6):872-876.
- Nagy, N; Vanky F.; (1998). **Transforming growth factor beta (TGF-beta) secreted by immunogenic ex vivo human carcinoma cells, counteracts the activation and inhibits the function of autologous cytotoxic lymphocytes. Pretreatment with IFN gamma and TNF alpha reduces the production of active TGFbeta.** Cancer Immunol. Immunother. 45(6):306-12.
- Nathuan C. & Sporn M. (1991). **Cytokines in Context.** The Journal of Cell Biology, 113(5). 981-84.
- Neufeld, T.P; Bruce, A.E. (1998). **Connections between growth and cell cycle.** Current Opinion in Cell Biology. USA. Vol 9. pp. 784-790.
- Okamoto, A; Jiang, Wei; Kim, Seong-Jin; Spillare, EA; Stoner, GD; Weinstein, IB; Harris, CC. (1994). **Overexpression of human cyclin D1 reduces the transforming growth factor beta (TGF- beta ) type II receptor and growth inhibition by TGF- beta I in an immortalized human esophageal epithelial cell Line.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91(24):11576-11580.
- Palmer, J.N. Wendy E. Hartogenesis, Mónica Patten, F. David Fortuin, and Carlin S. Long (1995). **Interleukin-1 $\beta$  Induces Cardiac Myocyte Growth but Inhibits Cardiac Fibroblast Proliferation in Culture.** The Journal of Clinical Investigation, Volume 95, June. pp. 2555-2564.
- Parikh A; Salzman AL; Fischer JE; Szabo C; Hasselgren PO (1997) **Interleukin-1 beta and interferon-gamma regulate interleukin-6 production in cultured human intestinal epithelial cells.** Shock, Oct, 8(4):249-55.
- Patrick P. Mc Donald, Sara Gasperini, Federica Calzetti, and Marco A. Cassatella. (1998). **Modulation by Interferon- $\gamma$  of the Production and Gene Expression of IL-1 Receptor Antagonist in Human Neutrophils.** Cellular Immunology, 184, 45-50.
- Pestka, S. (1983). **Purificación y fabricación de interferones humanos.** Investigación y Ciencia. España; pp. 19-26.
- Planas-Silva, M.; Weinberg R. (1999). **The restriction point and control of cell proliferation.** Current Opinión in Cell Biology, 9:768-72.
- Rangel C.R., José L.R.G., Leticia R.Z., Gilberto S.L., Alberto M.G. Rubén D.M.P., Catalina T.B. María J.I.S., Benny W.S. (1993). **Establecimiento y caracterización de la línea celular CaLo y del clon KaLo, obtenidos a partir de un carcinoma de cérvix, y efecto de IL-2, IL-3, GM-CSF, M-CSF, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sobre su proliferación.** Rev. Inst Nal Cancerol (Mex) Vol.39, Núm 3, pp.1861-66.
- Recchia, F; Frati, L; Rea, S; Torchio, P; Sica, G; (1998); **Minimal residual disease in metastatic breast cancer: Treatment with IFN- beta , retinoids, and tamoxifen.** Journal of Interferon & Cytokine Research. vol. 18, no. 1, pp. 41-47.
- Regueiro J.L. Carlos L.L. (1998). **Inmunología, biología y patología del sistema inmune.** 2a. Edición. Ed. Panamericana. México. pp. 104, 122.
- Richards, S. M.; Richard D.G; Lynne K. Brian K; Jhon M.M. (1998). **Prolactin is an antagonist of activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas.** Cellular immunology, 184, 85-91.
- Roitt, Ivan. (1998). **Essential Immunology.** Ninth edition. Blackell Science. pp. 371-372.

Rorke EA; Jacobberger JW. (1995). **Transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) enhances apoptosis in human papillomavirus type 16-immortalized human ectocervical epithelial cells.** 216(1):65-72.

Santiago, D.E. (1996) **Inducción a la Expresión de Receptores Fc por la Interleucina-1 en células mieloides normales y leucémicas de ratón y humano.** Tesis Doctoral. UNAM, México, D.F. pp.28.

Santin AD; Hermonat P; Ravaggi A; Chiriva-Internati M; Hiserodt JC; Tian E; Carter CA; Pecorelli S; Parham GP (1998). **Effects of retinoic acid combined with interferon-gamma on the expression of major-histocompatibility-complex molecules and intercellular adhesion molecule-1 in human cervical cancer.** Int J Cancer, 75(2):254-8.

Santos-Argumedo L. (1994). **Principios básicos de la respuesta inmunológica.** Perinatol. Reprod. hum, 8(1): 4-11.

Sethi SK; Bianco A; Allen JT; Knight RA; Spiteri MA (1997) **Interferon-gamma (IFN-gamma) down-regulates the rhinovirus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human airway epithelial cells.** Clin Exp Immunol, 110(3):362-9.

Slagle B.L., Kauffman R.H., Revees W.C. Icenogle J.P. (1998). **Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia.** Cancer, 83:1401-8.

Slovin SF; Scher HI; Divgi CR; Reuter V; Sgouros G; Moore M; Weingard K; Pettengall R; Imbriaco M; El-Shirbiny A; Finn R; Bronstein J; Brett C; Milenic D; Dnistrian A; Shapiro L; Schlom J; Larson SM (1998). **Interferon-gamma and monoclonal antibody 131I-labeled CC49: outcomes in patients with androgen-independent prostate cancer.** Clin Cancer Res, 4(3):643-51.

Stanley L. R. & Vinay K.M.D. (1989). **Patología Humana.** 4a edición. Ed. Interamericana. México. pp.185.

Stavropoulos NE; Ioachim E; Pavlidis N; Pappa L; Kalomiris P; (1998 ) **Local immune response after intravesical interferon gamma in superficial bladder cancer.** Br J Urol. 81(6):875-9.

Thannickal VJ; Aldweib KD; Rajan T; Fanburg BL. (1998). **Upregulated expression of fibroblasts growth factor (FGF) receptors by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in culture human lung fibroblasts.** Biochem Biophys Res Commun, 251(2):437-41.

Troyanovsky, S. (1999). **Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly.** Current Opinion in the Cell Biology. 11:561-66.

Tsutomu S; Naofumi Y. Hiroyoshi S; Minoru T; Tetsuro O; Sumio S; Naoki W; Yoshiro N. (1998). **An apoptosis-inducing gene therapy for pancreatic cancer with a combination of 55-k-Da tumor necrosis factor (TNF) receptor gene transfection and mutein TNF administration.** Cancer Research, 58, 1677-1683.

Vanhée DS; Molet P; Gosset Y; Tillie-Leblond A. Boitelle W. (1996). **Expression of leucocyte-endothelial adhesion molecules is limited to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lung of pneumoconiotic patients: role of tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ).** Clin Exp. Immunol, 106; 541-548.

Viegas MH; Salatino M, Goin M, Peters G, Labriola L, Costa CJ, Lanari C, Charreau EH, Elizalde PV. (1999). **Differential Expression of and Responsiveness to Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) isoforms in Hormone-dependent and independent lines of mouse mammary tumors.** Cancer Detect Prev, 23(5):375-386.

- Wang Z; Cheng Y; Zheng R; Qin D; Liu G; (1997). **Effect of TNF.alpha and IFN-alpha on the proliferation and cytotoxicity of lymphokine-activated killer cells in patients with bladder cancer.** Chin Med J, 110(3):180-3.
- Wikstrom P, Lindh G, Bergh A, Damber JE. (1999). **Alterations of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) and TGFbeta receptor, expressions with progression in Dunning rat prostatic adenocarcinoma sublines.** Urol Res, 27(3):185-93.
- Woodworth CD; McMullin E; Iglesias M; Plowman GD. (1995). **Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervicalepithelial cells.** Proc Natl Acad Sci USA, Volume 92:2840-4.
- Wright, S.C.; Poornima K., Albert W.; Naiping S.; Madhu V. And James W.L. (1992). **Apoptosis and DNA Fragmentation Precede TNF-Induced Cytolysis in U937 Cells.** Journal of Cellular Biochemistry 48:344.
- Wu F; Buckley S; Bui KC; Yee A; Wu HY; Liu J; Warburton D. (1996). **Cell cycle arrest in G0/G1 phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells.** Am J Physiol 270(5 Pt 1):L879-88.
- Yahi N; Baghdiguian S; Bolmont C; Fantini J (1992). **Inhibition of human immunodeficiency virus infection in human colon epithelial cells by recombinant interferon-gamma.** Eur J Immunol, 22(10):2495-9
- Yanagisawa M; Imai H; Fukushima Y; Yasuda T; Miura AB; Nakamoto Y. (1994). **Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta on the proliferation of cultured glomerular epithelial cells.** Virchows Arch, 424(6):581-6
- Yarden, A; Kimchi, A. (1986). **Tumor necrosis factor reduces c-myc expression and cooperates with interferon- gamma in HeLa cells.** Science 234(4782):1419-1421.
- Yusa, S.; Ohnishi, S.; Onodera, T.; Miyazaki, T. (1999). **AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF-beta 1.** European Journal of Immunology, 29(4):1086-93.
- Zhang P. (1999). **The cell cycle and development: redundant roles of cell cycle regulators.** Current Opinion in Cell Biology, 11:655-62.
- Zeller, W; Fiedler, W; Peimann, C-J; Schaefer, B; Hossfeld, DK (1994). **Shedding of TNF-receptor and soluble ICAM-1 molecules in response to treatment with recombinant TNF alpha and IFN- gamma in patients with colorectal cancer** Oncology Reports , 1(1):13-16.

## APÉNDICE

### APÉNDICE 1

#### Reactivos del cristal violeta

La solución del cristal violeta se prepara al 0.1%(w/v) en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 96 g de NaOH y 4.28 mL de ácido fórmico aforados a 500 mL de agua destilada. Una vez preparada la solución de cristal violeta es filtrada y posteriormente usada.

### APÉNDICE 2

#### Reactivos para el inmunoanálisis enzimático de ELISA

##### 1.- Amortiguador de salina-fosfatos (PBS), 0.1M, pH 7.4

* NaCl	8.0 g
* $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 g
* $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
* KCl	0.2 g
* $\text{H}_2\text{O}$ bidestilada hasta	1000 mL

##### 2.- PBS-Tween 0.1% (PBS-T).

* Tween <sub>20</sub>	0.5 mL
* PBS	500 mL

##### 3.- Solución amortiguadora de carbonatos 0.1M, pH 9.6

* $\text{Na}_2\text{CO}_3$	1.52g
* $\text{NaHCO}_3$	2.93g
* $\text{NaNO}_3$	0.20g
* $\text{H}_2\text{O}$ bidestilada	1000 mL

##### 4.- Solución amortiguadora de bloqueo al 2% (PBS-T-BSA)

* Albúmina sérica bovina (BSA)	2 g
* PBS-T	100 mL

##### 5.- Solución amortiguadora de citratos pH 5.6

* ácido cítrico (0.1M)	2.10 g
* $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (0.2M)	7.96 g
* $\text{H}_2\text{O}$ bidestilada	100 mL

##### 6.- sustrato (preparar inmediatamente antes de usar).

* amortiguador de citratos, pH 5.6	25 mL
* $\text{H}_2\text{O}_2$ al 30%	10 $\mu\text{L}$
* <i>O</i> -fenildiamina (OPD)	10 mg