



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR  
Y MOLECULAR DEL CÁNCER

“SOBRENADANTES PROVENIENTES DE CULTIVOS DE CÉLULAS  
TUMORALES DE CaCu INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE  
LINFOCITOS HUMANOS: POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL TGF- $\beta$ ”

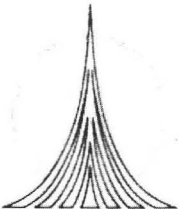
T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :

**CARLOS ALBERTO SANTIAGO OLIVARES**

DIRECTOR DE TESIS  
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, DF.

2005



0350236



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.

## DEDICATORIAS

A todas aquellas personas que en todo momento han confiado en mi y de las que he recibido apoyo incondicional.

A todos los cuates del museo de la luz, con los que compartí momentos muy especiales e inolvidables y a quienes considero parte de mi presente y futuro.

A mis amigos de la preparatoria, de quienes me siento muy orgulloso y que representan una aliciente para mi.

A todos los compañeros de la carrera, especialmente a Carmen, por su apoyo constante y desinteresado.

A todos mis tíos por su apoyo y sus consejos, en las diferentes etapas de mi vida, especialmente a mi tío José Luis<sup>†</sup>, Julio, Gustavo y Manuel, quienes han sido unos excelentes tutores y que han cubierto de una manera maravillosa un vacío inexistente.

A mis hermanos: Germán y Héctor, de quienes me siento muy orgulloso y agradecido, por ser unas personas muy valiosas y representar un ejemplo de superación.

A mi segunda madre: Lupita, por ser un ser maravilloso, que me ha demostrado su cariño en todo momento y quien me ha apoyado de una manera increíble durante toda mi vida.

Finalmente a la persona que mas amo en este mundo y a quien le debo absolutamente todo, la mujer mas maravillosa que conozco y que es mi principal motivo y ejemplo de superación: Mi muñequita, Gracias por todo lo que me has dado, pero sobre todo por esa gran fortaleza descomunal para salir adelante ante las situaciones mas adversas. **TE AMO!**

## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Molecular del Cáncer de la F.E.S – Zaragoza, por hacer un lugar de trabajo agradable y ameno, pero sobretodo de respeto; especialmente quiero agradecer a mis compañeros: Vicente, por su entera disposición y asesoramiento técnico, en todo momento que lo requerí, durante mi estancia en el laboratorio; a Magy por compartir su conocimiento y por sus valiosos consejos; a Hugo por todo su apoyo teórico y practico en la realización de la mayor parte de los experimentos que componen este trabajo, pero sobre todo por su gran compañerismo y finalmente al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por abrirme las puertas del laboratorio y por su invaluable ayuda y guía, no solo en lo profesional, sino en lo personal.

A la Dra. Rebeca López Marure, del Instituto Nacional de Cardiología, por su colaboración tan importante y decisiva en el desarrollo de esta tesis.

A los sinodales de este trabajo por sus valiosas observaciones, fundamentales en el enriquecimiento del mismo: M. en C. Carlos Bautista Reyes, Biol. Carlos Martínez Montoya, M. en C. Jorge Hernández Montes, M. en C. Luis Sánchez Sánchez y Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

A mis compañeros de generación, así como a las personas que conocí en la carrera que le dieron un toque muy especial a la estancia en la facultad.

A la misma carrera de Biología, a los profesores y a la facultad.

A todos y cada uno de los miembros de mi familia, por su constante e inagotable apoyo durante todos los proyectos que he emprendido.



## ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
SISTEMA INMINOLÓGICO Y CÁNCER	3
METASTÁSIS	9
CÁNCER DE CÉRVIX Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV)	11
CICLO CELULAR	13
APOPTOSIS	15
INDUCTORES DE APOPTOSIS	18
FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ )	21
EFFECTOS DEL TGF- $\beta$ SOBRE LINFOCITOS	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
MÉTODO	30
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57
APÉNDICE	65

## RESUMEN

Se ha reportado que las células tumorales son capaces de secretar citocinas o factores de crecimiento para favorecer su estado tumorigénico, sin embargo aún no se sabe con precisión, cuántas y cuáles citocinas son secretadas por las células tumorales y cuál es su función en la tumorigénesis. Dado que el Cáncer cérvico-uterino, es un grave problema de salud nacional y mundial, que en México ocupa la primera causa de muerte en mujeres que padecen de cáncer, este trabajo pretende aportar información sobre cómo las células tumorales son capaces de evadir la respuesta inmunológica. Al respecto, se encontró que las células tumorales de CaCu infectadas con el virus HPV-18, HPV-16 y las que no están infectadas con el HPV, son capaces de secretar al medio de cultivo TGF- $\beta_1$  en cantidades de pico gramos, con una actividad preponderante en la inhibición de la proliferación de Linfocitos de Sangre Periférica Humana (LSPH), indicando que dicha actividad es independiente a la presencia viral. Las secreciones de las células tumorales estudiadas, no producen citotoxicidad y tampoco arresto en alguna de las fases del ciclo celular de los linfocitos, sin embargo se encontró que el Medio Condicionado de HeLa, es capaz de inducir expresión de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular de los linfocitos, principalmente por la presencia del TGF- $\beta_1$ , evidencia inequívoca de un proceso apoptótico temprano, hecho que fue confirmado por la presencia de cuerpos apoptóticos de LSPH, al ser co-cultivados con el M.C. de la línea celular citada.

Estos resultados nos indican la importancia que tiene el TGF- $\beta_1$ , en el proceso de evasión del sistema inmunológico del hospedero, y lo proponen como un fuerte candidato para estudios posteriores, donde se involucre una alternativa de tratamiento contra el CaCu.

## INTRODUCCIÓN

Los organismos en condiciones normales mantienen una adecuada morfología y fisiología funcional de sus órganos y células, gracias a mecanismos de regulación y control que operan de manera muy específica y concreta. Cuando se presenta algún problema que altera de forma importante dicho funcionamiento a cualquier nivel, se habla de una pérdida de la homeostasis (Rojas, 2001). Un ejemplo de esto es cuando las células que constituyen a un tejido, por alguna razón dejan de obedecer las señales que mantienen a dicho tejido organizado y funcional, en el caso del cáncer particularmente se observa una proliferación incontrolada de una o varias células del tejido, que no acatan de manera adecuada las señales de control en la división celular, dando como consecuencia la generación inicial de un tumor, con posibilidades de invadir tejido adyacente o invadir un órgano lejano (metástasis) (Weinberg, 1996). Desde luego, esto implica que más de un mecanismo de control que mantienen a los tejidos y órganos funcionales han dejado de funcionar adecuadamente, es decir en el caso del cáncer las células tumorales primero evaden al sistema inmunológico, que normalmente detecta a este tipo de células y las elimina, las células tumorales entonces generan estrategias para desprenderse del tumor original (primario) y poder migrar a otros tejidos u órganos, eventos que requieren de manera obligada la participación de mecanismos que regulan la adhesión celular y el rompimiento de tejido conjuntivo a través de proteasas para llegar a su destino final. En resumen, la generación de un tumor se da por una serie de fallas en los mecanismos de control en la homeostasis, de los cuales describiremos los que están directamente asociados a este padecimiento. Este trabajo en concreto, pretende aportar información sobre como las células transformadas y en particular las de cáncer cervico-uterino, son capaces de evadir la respuesta inmunológica, y dar origen a la enfermedad.

## SISTEMA INMUNOLÓGICO Y CÁNCER

Los linfocitos son las células especializadas del sistema inmunológico que se encargan de proteger al organismo de sustancias extrañas y patógenas. El ser humano adulto posee aproximadamente en promedio un billón de linfocitos, con formas de bastón o redondeadas y con un diámetro de 5 a 12  $\mu\text{m}$ .

Con base en sus propiedades funcionales y las proteínas que expresan, se agrupan en linfocitos T derivados del Timo, linfocitos B derivados de la médula ósea y células NK (asesinas naturales); en la sangre periférica de un individuo normal, los linfocitos T representan un 75% del total de la población de linfocitos, las células B un 10%, mientras que la población restante son células NK (Parslow *et al.*, 2002).

Los linfocitos que son producidos por el Timo y la Médula ósea, se encuentran en un estado de latencia o reposo, denominado  $G_0$  del ciclo celular; cuando se dispersan en la corriente sanguínea, son llamados inmaduros o vírgenes y migran con eficacia a varios órganos periféricos, donde se inicia la mayor parte de las respuestas inmunitarias (Parslow *et al.*, 2002).

Los linfocitos B, presentan la característica distintiva de generar proteínas muy diversas conocidas como inmunoglobulinas, que son fundamentales para la respuesta inmunitaria humoral en dos formas: 1) cuando el linfocito B se encuentran en reposo, estas proteínas solo se expresan en la superficie celular, donde actúan como receptores para antígenos específicos; 2) cuando los linfocitos B se encuentran activados (células plasmáticas), secretan grandes cantidades de inmunoglobulinas al medio (anticuerpos) (Parslow *et al.*, 2002).

La función principal de los linfocitos B, consiste en secretar anticuerpos en la sangre y otros líquidos corporales, y de este modo impedir la proliferación de invasores extraños. Por lo tanto, los linfocitos B constituyen el principal tipo celular que participa en la inmunidad humoral. Las células B también desempeñan dos funciones adicionales: pueden funcionar como Células Presentadoras de Antígeno (APC), al procesar y exponer las sustancias extrañas (antígenos), de manera que los linfocitos T puedan reconocerlas y además pueden secretar ciertas linfocinas, así como otros factores que influyen en el crecimiento y las actividades de otras células inmunológicamente importantes (Parslow *et al.*, 2002).

Los linfocitos T, por su parte detectan la presencia de antígenos por medio de proteínas de superficie llamadas receptores de células T y en adición con los macrófagos, son el principal tipo celular encargado de la respuesta inmune mediada por células. Los dos subgrupos de células T más importantes, poseen dos proteínas distintivas de superficie conocidas como CD4 y CD8, los linfocitos T maduros casi siempre expresan sólo una de estas dos proteínas; la mayor parte de los que expresan CD8, tienen actividad citotóxica (células Tc o CTL) con una extrema importancia en la defensa contra infecciones virales y representan el 25% de los linfocitos T. Por su parte los linfocitos CD4, casi nunca son citotóxicos y más bien funcionan como células T cooperadoras (Th), promotoras de la proliferación, maduración y función inmunitaria de otros tipos celulares, estas células constituyen el 70% del total de linfocitos T. Las células T solo reconocen al antígeno presentado por las APC's (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas) (Parslow *et al.*, 2002).

La presentación del antígeno depende, en parte de proteínas específicas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), las cuales exponen al péptido extraño en la

superficie celular. La generación de una respuesta inmune efectiva depende de la secreción de citocinas específicas que recluten y activen células inmunes en el sitio de la infección. Cuando una célula somática es infectada por un virus, algunas proteínas virales inmunogénas pueden sufrir una transformación dentro de la célula y es posible que los péptidos que se originan, aparezcan como complejos de superficie asociados a moléculas del MHC de clase I, para ser reconocidos por el receptor de célula T como una clona específica del antígeno, lo cual proporciona una de las dos señales necesarias para la activación celular de los linfocitos Tc; esta primera señal, por si sola induce receptores para Interleucina 2 (IL-2) de gran afinidad en el linfocito Tc. La segunda señal la proporciona la IL-2 secretada por un linfocito Th activado y cercano. Al recibir ambas señales la célula Tc es activada (Parslow *et al.*, 2002). (Fig 1).

Una vez activados los linfocitos Tc, proliferan, se diferencian y participan en la lisis de las células blanco por tres caminos diferentes: a) secretan perforinas y otras proteínas que dañan la membrana celular, b) expresan en su superficie el ligando-Fas, que induce la muerte celular programada (apoptosis), y c) liberan citocinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) y la leucorregulina (RL) que limitan la actividad viral dentro de las células y atraen macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la células infectadas. El IFN- $\gamma$  y la RL inhiben la expresión de los genes virales y estimulan la expresión de las moléculas de clase I del MHC en los queratinocitos humanos, lo que permite una mejor presentación de los antígenos virales y con ello una respuesta inmune incrementada.

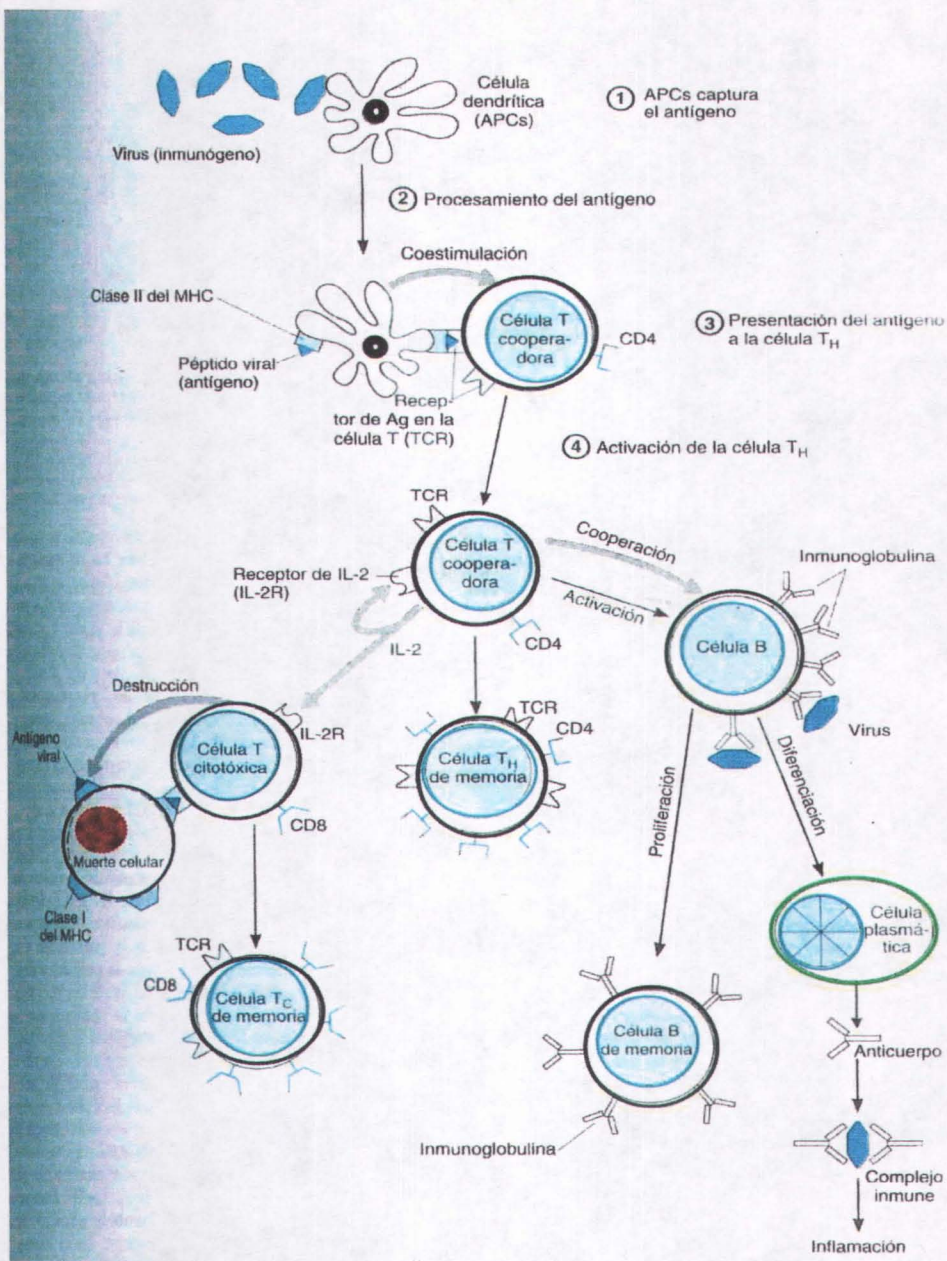


Figura 1. Mecanismo de la respuesta inmunológica. MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad; APCs: Célula presentadora de antígenos; TCR: Receptor de célula T. [Tomado y modificado de Parslow, *et al*, 2002].

La RL además de aumentar la transcripción de las moléculas del MHC clase I, también incrementa la sensibilidad de las células epiteliales cervicales inmortalizadas con el virus del papiloma humano 16 (HPV-16) para ser destruidas por las células asesinas naturales (NK) activadas por linfocinas (Berumen, 1997).

En pacientes con Cáncer Cervicouterino (CaCu), asociado con la presencia del Virus del Papiloma Humano (HPV) se observa que durante las primeras etapas de la infección se presenta una respuesta citotóxica y humoral; sin embargo aún se desconoce parte del mecanismo por el cual las células infectadas con este virus, evaden la acción esperada por parte del sistema inmunológico o si es el virus el que induce algún mecanismo para que esto ocurra (Roitt, 2003).

En cortes histológicos de tumores cancerosos, se han identificado linfocitos infiltrados; lo que confirma que en un principio los linfocitos sí reconocen a las células tumorales, pero en etapas posteriores no operan eficientemente sobre éstas para eliminarlas, además se ha comprobado que la mayoría de los antígenos tumorales son inmunogénicos aún en los individuos portadores del tumor, ya que se demuestra la presencia de anticuerpos anti-tumorales y de linfocitos Tc en la sangre de los individuos portadores del tumor. (Margni, 1996). Inclusive se ha demostrado experimentalmente, que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con estadios avanzados de desarrollo tumoral, incluyendo carcinomas y melanomas poseen linfocitos Tc que son capaces de lisar explantes de esos tumores extraídos de los mismos pacientes (Margni, 1996; Abbas *et al*, 2002).

Se han propuesto diversas causas, por las cuales los tumores pueden evadir la acción del sistema inmune, como pueden ser:



- A) Baja cantidad de antígeno tumoral producido en el inicio del tumor, que no es capaz de estimular una respuesta inmunológica; pero sí pudiese generar una cierta tolerancia, o anergia clonal sobre los LT específicos para el tumor (Margni, 1996).
  
- B) Nula expresión de moléculas co estimuladoras, (CD80 o B7-1) en las células tumorales y presentadoras de antígeno (APC), así como el receptor CD28 en los linfocitos Th (Roitt, 2003).
  
- C) Disminución en la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y la secreción de citocinas por las células tumorales, como el TGF $\beta$  (Berumen, 1997).
  
- D) Expresión de la molécula inhibidora del crecimiento RCAS1 o del ligando Fas por parte de las células transformadas, que activarían el receptor Fas de las células linfoides promoviendo apoptosis en éstas (Margni, 1996).

Durante la evolución del tumor, las células transformadas adquieren nuevas lesiones genéticas que les confieren ventajas selectivas, para evadir cada vez un mayor número de mecanismos de control del sistema inmune, hasta que éste se hace ineficiente para combatir el tumor (Berumen, 1997). Aunque el origen del padecimiento se da por diversas causas, cualquier fenómeno que conduce finalmente a la enfermedad, incide directamente sobre la estructura y función de los genes (Rojas, 2001).

## METÁSTASIS

La invasión del tumor en el tejido sano, por el proceso conocido como metástasis es una de las principales causas del fracaso en los tratamientos y muerte de los pacientes que padecen cáncer (Liotta, 2001; Gershenwald *et al*, 2002). Los tumores metastásicos suelen volverse resistentes a las radio y quimioterapias convencionales debido a la persistencia de micrometástasis, las cuales permanecen clínicamente ocultas y se manifiestan en forma tardía. La formación de colonias metastásicas es un proceso continuo que comienza con el crecimiento del tumor primario (De-Vita, 1997; Gibbs, 2003). El desarrollo de la metástasis genera grandes daños tisulares irreversibles y una gran demanda de nutrientes (Ruoslahti, 1996). De esta manera, los pacientes con metástasis fallecen por el daño en sus órganos afectados o por complicaciones con la terapia anti-metastásica (De-Vita, 1997; Gibbs, 2003).

La metástasis ocurre bajo una cascada coordinada de procesos celulares y por cambios genéticos adicionales; cada paso involucra múltiples interacciones huésped-tumor (De-Vita, 1997). Tales eventos incluyen proliferación celular, neovascularización y linfoangiogénesis; invasión al estroma del hospedero, vasos sanguíneos y linfáticos; supervivencia en la circulación; detención en un vaso sanguíneo delgado (arteriola o vénula); transmigración endotelial hacia el parénquima del órgano y proliferación continua (Weinberg, 1996; Ruoslahti, 1996; Folkman, 1996). Los sistemas vascular y linfático por poseer numerosas interconexiones, representan la principal vía de diseminación para dichas células tumorales; al pasar rápidamente de un sistema a otro (Gershenwald *et al*, 2002). Generalmente las células metastásicas viajan en grupos, pero sólo un pequeño porcentaje (menos del 0.01%) logran iniciar colonias metastásicas, debido a que todas las demás mueren por no encontrar pronto un sitio donde alojarse. Los principales órganos

afectados, por la invasión metastásica son: pulmón, cerebro, hígado, riñón y médula ósea (Fidler et al , 1999; Liotta, 2001)

En la actualidad existen tres teorías que pretenden explicar el fenómeno de la metástasis hacia órganos específicos: a) Que las células tumorales salen del sistema linfático y sanguíneo extendiéndose a todos los órganos, pero solo se multiplican en aquellos que poseen apropiados factores de crecimiento; b) Las células endoteliales situadas en la luz de los vasos sanguíneos de los órganos blanco, expresan moléculas de adhesión, las cuales "atrapan" a las células tumorales que transitan; c) La teoría de la quimioatracción estipula la existencia de quimioatrayentes órgano-específicos, que promueven la invasión del órgano por las células tumorales (Liotta, 2001)

Recientemente se ha descrito que una masa tumoral esta compuesta por una población celular heterogénea, distribuida en dos sitios diferenciables por distintas propiedades: un grupo de células ubicadas en la superficie externa del tumor expresan genes reguladores de la proliferación, angiogénesis y metástasis; mientras que otro grupo celular ubicado en el centro del tumor, a menudo expresan genes de muerte inductores de necrosis (Gershenwald *et al*, 2002).

Finalmente en la metástasis participan otros mecanismos de adhesión, tales como la interacción entre las proteínas de la matriz extracelular (ECM) con los receptores de superficie presentes sobre las células tumorales, siendo éste uno de los pasos iniciales en el proceso invasivo. Los principales receptores involucrados en este proceso, es una superfamilia de heterodímeros  $\alpha\beta$ , conocida como integrinas, las cuales desempeñan un papel central en la adhesión célula-ECM y en la unión célula-célula (Karp, 1996).

## CÁNCER DE CÉRVIX Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV)

Las observaciones precursoras sobre la relación entre el virus del papiloma humano (HPV) y las enfermedades que originan transformación neoplásica, fueron aportadas por el fisiólogo alemán Zur Hausen en 1976, quien le atribuyó al virus la responsabilidad de dichas transformaciones en el cuello uterino, transmitido sexualmente.

En la actualidad hay investigaciones que aseveran que el cáncer de cérvix no se desarrollará si no está presente el HPV, debido a que en los años 80 se identificaba el HPV en un 70-90% de casos de cáncer con la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), y en la actualidad se detecta hasta en un 100% de casos de cáncer con técnicas más sensibles como la Captura Híbrida generación II (HC II) (Berumen *et al*, 2001; Bosch, 2002).

Actualmente se conocen más de 100 tipos del Virus del Papiloma Humano, cada uno con afinidad a determinados tejidos, como vulva, vagina, canal anal, peri anal, pene, cavidad oral y tracto digestivo (Bosch, 2002; Mandado *et al*, 2004). De estos, treinta tipos están relacionados con más del 99% de casos de Cáncer Cervicouterino, siendo los de mayor riesgo los tipos: 16, 18, 45 y 31, ya que son los que se presentan en una mayor proporción a nivel mundial, mientras que en Latinoamérica son más comunes los tipos 39 y 59 (Alonso, 2000).

El genotipo de los papiloma virus consta de un ADN circular de doble cadena, constituido por ocho genes, diferenciados en tempranos y tardíos, que operan en dos diferentes etapas de la invasión; los tempranos se denominan con la letra E, y van desde E1 hasta E7 excepto E3, ellos son los responsables de la replicación viral; los tardíos se denominan

L1 y L2, estos son los encargados de lograr la encapsidación viral (Betancur, 1996). (Fig. 2)

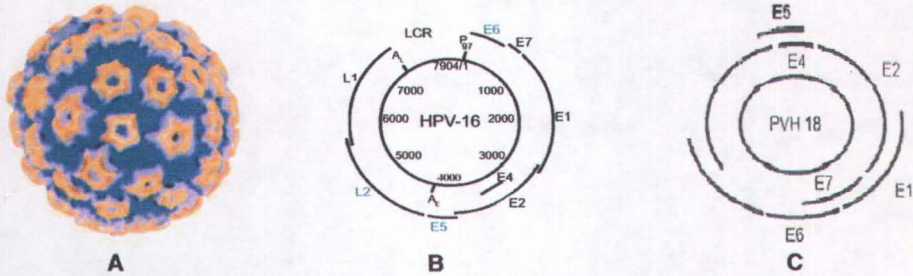


Figura 2. Virus del papiloma humano. (A) Estructura hicosaedrica de la cápside del HPV. (B) y (C) Organización genómica del HPV 16 y 18 respectivamente. [Tomado y modificado de Betancourt, 1996; DeVita, 1997]

Para el estudio de la génesis del cáncer son de particular importancia los genes vírales E6 y E7, ya que codifican proteínas capaces de formar complejos con otras proteínas celulares encargadas de la regulación en la proliferación celular (Betancur, 1996).

La persistencia y progresión de una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), puede depender de ciertas características como lo es una gran carga viral, en este sentido algunos estudios revelan que aproximadamente un 25 % de mujeres infectadas con alta carga viral hasta antes de los 25 años, desarrollaran carcinoma *in situ* en los próximos 15 años, y se considera que la cantidad de HPV en la NIC esta íntimamente relacionada con la etapa y progresión de la lesión (Hernández, 2003).

Cabe destacar que en el desarrollo de las neoplasias cervicales asociadas con el HPV, intervienen factores considerados de riesgo, como una alta paridad (7 o más), el uso de anticonceptivos orales por un lapso mayor de 5 años y el consumo de tabaco, este último podría ser por efecto directo de sus metabolitos, o por inducción de inmunosupresión, aunque esto aun es incierto (Bosch, 2002).

## CICLO CELULAR

La proliferación celular está regulada tanto por factores de crecimiento así como también por diversas señales que inhiben la progresión del ciclo celular. Cualquier defecto en la regulación del ciclo celular, es causa común de proliferación anormal, la cual puede conducir al cáncer, es por ello que ambas líneas de investigación se hayan íntimamente relacionadas (Cooper, 2004).

El ciclo celular está dividido en dos grandes partes: Interfase y Mitosis, también llamado fase M; esta fase es la etapa más crucial del ciclo celular, ya que corresponde a la separación del material genético ya duplicado, finalizando con la división física del citoplasma, llamada citocinesis y la generación de dos células iguales (Lodish, 2003). La Interfase, donde ocurre el crecimiento celular y la replicación del ADN, consume aproximadamente el 95% del tiempo que dura el ciclo celular completo y está dividida en varias etapas con respecto a su progresión (Cooper, 2004).

Las células humanas de replicación rápida como los linfocitos, progresan a través del ciclo celular completo en alrededor de 24 horas: la mitosis en estos tipos celulares demora sólo 30 minutos aproximadamente; G<sub>1</sub>, 9 horas; la fase S 10 horas y G<sub>2</sub>, 4.5 horas.

Cabe destacar que en el desarrollo de las neoplasias cervicales asociadas con el HPV, intervienen factores considerados de riesgo, como una alta paridad (7 o más), el uso de anticonceptivos orales por un lapso mayor de 5 años y el consumo de tabaco, este último podría ser por efecto directo de sus metabolitos, o por inducción de inmunosupresión, aunque esto aun es incierto (Bosch, 2002).

## CICLO CELULAR

La proliferación celular está regulada tanto por factores de crecimiento así como también por diversas señales que inhiben la progresión del ciclo celular. Cualquier defecto en la regulación del ciclo celular, es causa común de proliferación anormal, la cual puede conducir al cáncer, es por ello que ambas líneas de investigación se hayan íntimamente relacionadas (Cooper, 2004).

El ciclo celular está dividido en dos grandes partes: Interfase y Mitosis, también llamado fase M; esta fase es la etapa más crucial del ciclo celular, ya que corresponde a la separación del material genético ya duplicado, finalizando con la división física del citoplasma, llamada citocinesis y la generación de dos células iguales (Lodish, 2003). La Interfase, donde ocurre el crecimiento celular y la replicación del ADN, consume aproximadamente el 95% del tiempo que dura el ciclo celular completo y está dividida en varias etapas con respecto a su progresión (Cooper, 2004).

Las células humanas de replicación rápida como los linfocitos, progresan a través del ciclo celular completo en alrededor de 24 horas: la mitosis en estos tipos celulares demora sólo 30 minutos aproximadamente; G<sub>1</sub>, 9 horas; la fase S 10 horas y G<sub>2</sub>, 4.5 horas.

El paso a través de diferentes fases del ciclo celular esta regulado por una serie de "puntos de inspección" (checkpoints) que condicionan la entrada a la siguiente fase, hasta que los eventos de la fase previa hayan sido completados (Cooper, 2004).

La mayor parte de las células postmitóticas en los vertebrados abandona el ciclo en G<sub>1</sub> y entran en una fase llamada G<sub>0</sub>, donde permanecen sin proliferar durante días, semanas, o en algunos casos durante toda la vida del organismo; no obstante, las células se encuentran metabólicamente activas, con tasas reducidas de síntesis proteica y pueden retornar al ciclo celular en la fase S; este reingreso está regulado por señales extra celulares, lo cual constituye un control en la proliferación celular (Lodish, 2003; Cooper, 2004).

Una vez que los mitógenos han actuado durante un tiempo suficiente, y el curso del ciclo celular ha pasado una etapa crucial al final de G<sub>1</sub>, denominado punto de restricción, el ciclo celular continua de manera independiente y la célula está comprometida a proseguir a través de la fase S; sin embargo si los factores de crecimiento no son los apropiados en G<sub>1</sub>, el curso del ciclo celular es detenido en el punto de restricción y la célula es enviada al estado de quiescencia G<sub>0</sub> (Cooper, 2004).

La regulación del ciclo celular es decisiva, para el desarrollo normal de los organismos multicelulares; la replicación de las células es controlada principalmente por la regulación cronométrica de dos acontecimientos decisivos en el ciclo celular: la replicación del ADN y la mitosis; los controladores de dichos acontecimientos son unas proteínas cinasas heterodiméricas, que son las responsables de desencadenar las principales transiciones del ciclo celular, estas proteínas cinasas están constituidas por una sub unidad catalítica y una reguladora (Lodish, 2003; Cooper, 2004).



Las sub unidades reguladoras llamadas ciclinas, aumentan y disminuyen en las diversas fases del ciclo celular; sus sub unidades catalíticas se denominan cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), por que carecen de actividad de cinasa a no ser que se asocien con una ciclina; cada sub unidad catalítica Cdk es regulada por la fosforilación de sitios inhibidores y activadores específicos y puede asociarse con diferentes ciclinas, las cuales determinan y regulan las actividades de múltiples proteínas, igualmente mediante la fosforilación en sitios reguladores específicos (Lodish, 2003). El control del ciclo celular es ejercido principalmente por factores de crecimiento extracelulares que inducen proliferación celular en función de la disponibilidad de nutrientes y promueven la síntesis de complejos Cdk (Lodish, 2003, Cooper, 2004).

## APOPTOSIS

Considerada un proceso innato, por el cual las células disfuncionales sistemáticamente se desensamblan y degradan sus componentes estructurales y funcionales; la muerte celular selectiva o apoptosis es fundamental para el desarrollo, regulación y función del sistema inmunológico, así como para el mantenimiento de la homeostasis en los organismos maduros (Kaufmann, 1997; Caballero, 2002).

Cualquier alteración en la susceptibilidad para la apoptosis es de importancia particular para la tumorigénesis y progresión del tumor, así como para el desarrollo de estrategias efectivas para el tratamiento del cáncer. Los virus asociados a esta patología, han desarrollado mecanismos que manipulan de alguna manera la vía apoptótica, para asegurar su continua supervivencia y evitar su eliminación (Kaufmann, 1997).

Las sub unidades reguladoras llamadas ciclinas, aumentan y disminuyen en las diversas fases del ciclo celular; sus sub unidades catalíticas se denominan cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), por que carecen de actividad de cinasa a no ser que se asocien con una ciclina; cada sub unidad catalítica Cdk es regulada por la fosforilación de sitios inhibidores y activadores específicos y puede asociarse con diferentes ciclinas, las cuales determinan y regulan las actividades de múltiples proteínas, igualmente mediante la fosforilación en sitios reguladores específicos (Lodish, 2003). El control del ciclo celular es ejercido principalmente por factores de crecimiento extracelulares que inducen proliferación celular en función de la disponibilidad de nutrientes y promueven la síntesis de complejos Cdk (Lodish, 2003, Cooper, 2004).

## APOPTOSIS

Considerada un proceso innato, por el cual las células disfuncionales sistemáticamente se desensamblan y degradan sus componentes estructurales y funcionales; la muerte celular selectiva o apoptosis es fundamental para el desarrollo, regulación y función del sistema inmunológico, así como para el mantenimiento de la homeostasis en los organismos maduros (Kaufmann, 1997; Caballero, 2002).

Cualquier alteración en la susceptibilidad para la apoptosis es de importancia particular para la tumorigénesis y progresión del tumor, así como para el desarrollo de estrategias efectivas para el tratamiento del cáncer. Los virus asociados a esta patología, han desarrollado mecanismos que manipulan de alguna manera la vía apoptótica, para asegurar su continua supervivencia y evitar su eliminación (Kaufmann, 1997).

Para el efecto de la muerte celular programada se deben tomar en cuenta varios factores, como el estado metabólico, el tipo de daño inducido, el genotipo celular, la expresión de factores de crecimiento y promotores de muerte. La apoptosis es un evento bastante complejo que puede ser activado intracelularmente a través del desarrollo de un programa genético definido o extra celularmente, por proteínas endógenas, citocinas u hormonas, que involucra la participación de varias moléculas con acción proapoptótica y antiapoptótica, las cuales están mediadas por activación de señales y mecanismos de regulación (Kaufmann, 1997).

La apoptosis, clásicamente se divide en tres etapas: Compromiso, en el que la célula recibe estímulos apoptóticos potencialmente letales; Ejecución, cuando ocurren los mayores cambios estructurales; y Eliminación, que es cuando los remanentes celulares son removidos por fagocitosis (Kaufmann, 1997).

La etapa inicial de compromiso tiene una duración muy variable, ya que intervienen factores como el tipo celular, los estímulos apoptóticos, la etapa del ciclo celular en la que se encuentra la célula y la expresión de varios moduladores de la muerte celular (Kaufmann, 1997).

Durante la ejecución ocurren cambios morfológicos y bioquímicos en el núcleo, citoplasma, organelos y membrana plasmática, como los siguientes:

- Cromatina condensada y agregada a lo largo de la periferia nuclear en un patrón de forma creciente.
- La ultra estructura nuclear es alterada; la lámina nuclear es proteolíticamente fragmentada.
- Los filamentos del citoesqueleto se agregan en una matriz paralela.

- El retículo endoplásmico se dilata y fusiona con la membrana plasmática, creando cráteres en el punto de fusión.

Un cambio notable en la membrana plasmática de células apoptóticas, es la redistribución de fosfolípidos. En células normales, los fosfolípidos son presentados asimétricamente a lo largo de la membrana plasmática, las proteínas de membrana fosfatidilcolina y esfingomielina, están localizadas principalmente en la parte externa de la membrana, muchas de las proteínas fosfatidiletanolamina y todas las fosfatidilserinas se encuentran estrictamente en la cara interna de la membrana. En el inicio de la apoptosis, la asimetría de los fosfolípidos se pierde, y la fosfatidilserina se trasloca, produciendo la aparición de esta proteína en la superficie externa de la membrana celular (Xiao-Ming, *et al* 2003).

Debido a la pérdida de la asimetría fosfolípida membranar, el contorno celular se disocia y se encoge dramáticamente, proyectando hacia el exterior protuberancias que separan el límite membranar interno, formando los “cuerpos apoptóticos” (Kaufmann, 1997). Esta etapa de ejecución es completada en un tiempo relativamente invariable, sin importar el tipo celular o estímulo apoptótico (Bursch *et al*, 1990).

Durante la eliminación, las células y cuerpos apoptóticos son reconocidos y rápidamente fagocitados por las células vecinas o macrófagos, lo que evita la respuesta inflamatoria, ya que no hay liberación de proteínas intracelulares y ácidos nucleicos en el espacio extracelular (Kaufmann, 1997).

## INDUCTORES DE APOPTOSIS

Los receptores miembros de la familia TNF: Fas/APO-1/CD-95 y TNFR-1, son potentes inductores de apoptosis, vía estimulación de sus respectivos ligandos, las citocinas: Fas ligando (FasL) y TNF.

La apoptosis mediada por Fas es de importancia inminente en el desarrollo, mantenimiento y función del sistema inmunológico (Itoh *et al*,1991; Oehm *et al*,1992; Wrigh *et al*,1992).

En la actualidad se han identificado una gran cantidad de genes que influyen en la susceptibilidad celular para la apoptosis, muchos de ellos mutados en cánceres humanos e involucrados en procesos celulares complejos como proliferación, reparación y diferenciación celular (Kaufmann, 1997).

Uno de los más importantes es el gen supresor de tumor p53 que tiene un efecto directo en el ciclo celular, p53 esta implicado en el control de mecanismos reparadores de ADN, sugiriendo un papel en el reconocimiento del daño y quizá en el reclutamiento de enzimas reparadoras, ya que se ha demostrado que los niveles de proteína sintetizada a partir de este gen se incrementan en respuesta a un daño genotóxico.

Este mismo gen es el responsable del arresto en la fase G<sub>1</sub>/S del ciclo celular, por lo que se considera el principal mediador de la respuesta a un daño genotóxico y una mutación en su codificación facilitaría la iniciación y progresión de un tumor (Kaufmann,1997).

Varios genes involucrados en la regulación de la apoptosis son regulados en su transcripción por p53, un ejemplo es Bax, que produce una proteína pro apoptótica miembro de la familia Bcl-2 (Selvakumaran *et al*, 1995; Owen-Schaub *et al*, 1995; Miyashita *et al*, 1995). Otro gen regulado por p53, es el gen anti apoptótico bcl-2 que es transcripcionalmente reprimido por p53 para dar paso a la muerte celular (Tanaka *et al*, 1996).

En algunos procesos, como en la maduración de los linfocitos no es esencial la presencia de p53, ya que parecen utilizar una vía independiente, se ha demostrado que en ratones carentes de p53, la apoptosis inducida por daño en el ADN requiere de la expresión del factor de transcripción oncogénica, factor-1 regulador interferón (IRF-1) (Tamura *et al*, 1995). Lo que sugiere que la inducción de cualquiera de las dos proteínas solas, no es suficiente para promover la apoptosis y que las dos proteínas pueden cooperar en la inducción de la apoptosis en diversos tipos celulares (Tamura *et al*, 1995); por lo que se cree que p53 e IRF-1 pueden ser funcionalmente complementarios.

Por otra parte p53 regula adicionalmente la transcripción del oncogen mdm-2, a su conveniencia, ya que la sobre expresión de este gen inhibe los procesos mediados por p53: el arresto en G<sub>1</sub> y la apoptosis (Chen *et al*, 1996). Se ha propuesto que p53 activa de manera dual simultáneamente el arresto en G<sub>1</sub> del ciclo celular y la apoptosis, pero que el destino celular final es determinado por la presencia de señales de supervivencia que pueden predominar sobre las señales de muerte inducidas por p53, como la presencia o ausencia de factores de crecimiento y otras proteínas reguladoras del ciclo como Rb. (Haffner *et al*, 1995).

La proteína Rb, sustrato clave del complejo Cdk4,6/ciclina D, también está frecuentemente mutada en una gran variedad de cánceres humanos, siendo un prototipo de un gen supresor de tumor al igual que p53. Varios estudios han demostrado la interacción funcional entre p53 y el gen supresor de retinoblastoma Rb; sustentando que este gen puede ser el factor regulatorio de la acción de p53; la inactivación de Rb por parte de la proteína E7 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 promueve apoptosis en respuesta al daño en el ADN; esta apoptosis inducida parece ser dependiente de p53, ya que la apoptosis es inhibida por coexpresión de la proteína E6 también del HPV-16, que promueve la degradación de p53 y es capaz de estimular la actividad de la telomerasa y así evitar la senescencia celular (De Filippis *et al.*, 2003).

Los resultados experimentales en la investigación ponen de manifiesto el control que ejerce Rb sobre la activación de p53 y por ende también sobre el destino celular final, ya que en presencia de Rb funcional, y con p53 activada, la célula responde promoviendo la detención en el crecimiento y presumiblemente reparación de ADN, y en ausencia de Rb el camino apoptótico es efectuado.

El gen c-myc, es otro gen que participa de manera activa en el ciclo celular, ya que es requerido para entrar nuevamente al ciclo, después de haberse restaurado los factores de crecimiento; la expresión de c-myc en presencia de los factores principales, promueve la entrada al ciclo celular, pero en ausencia de dichos factores inicia la apoptosis. (Evan *et al.*, 1992).

## FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ )

El TGF- $\beta$  es un polipéptido dimérico que es producido prácticamente por todas las células del cuerpo, especialmente por linfocitos Th<sub>2</sub> y Th<sub>3</sub>, osteoblastos, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, plaquetas, células de Sertoli, macrófagos y células leucémicas y está involucrado en actividad anti-inflamatoria e inmunoreguladora (Richards *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999), proliferación y diferenciación celular y angiogénesis; aunque originalmente su nombre se debe a la habilidad que presenta para estimular el crecimiento de fibroblastos en agar, actualmente se le considera como un potente inhibidor de la proliferación celular epitelial. (Massague, 1998).

El TGF- $\beta$  es una molécula reguladora que promueve el arresto del ciclo celular en G<sub>1</sub> de una gran variedad de células epiteliales, sin embargo puede producir diferentes efectos dependiendo del tipo y estado celular, es capaz de impulsar la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis, la producción o degradación de la matriz extracelular e inhibir la formación de placas arteroescleróticas (Moses *et al.*, 1990; Kretschmar *et al.*, 1998; Fahey *et al.*, 2001; Feldmann *et al.*, 2002).

Desde hace dos décadas el estudio de esta citocina ha tomado importancia en el campo de la investigación en cáncer, dado que algunos investigadores dieron a conocer sus propiedades para inhibir el crecimiento celular. Todas las líneas celulares hematopoyéticas y epiteliales, son altamente sensibles a los efectos inhibidores en el crecimiento efectuado por el TGF- $\beta$ ; por lo tanto en células normales actúa como supresor de tumor, al inhibir el crecimiento celular o por promover la diferenciación o apoptosis.



Las células tumorales secretan en general altas cantidades de TGF- $\beta$  en comparación con las células normales; la asociación entre la secreción del TGF- $\beta$  y el desarrollo del cáncer es muy reconocida, ya que en el caso específico de carcinomas cervicales invasivos, los niveles de TGF- $\beta$  secretado son mas altos en etapas avanzadas de la progresión del tumor (Chopra et al, 1998).

Los altos niveles de TGF- $\beta$  debilitan al sistema inmunológico, ya que causa interferencia para la generación de linfocitos T citotóxicos específicos de tumor (Nagy *et al*, 1998), promueve angiogénesis y adicionalmente puede exacerbar el fenotipo maligno de las células tumorales, contribuyendo a la invasión del tumor y la metástasis (Pasche, 2001).

Se ha descubierto que el poder de secreción de TGF- $\beta$  es dependiente de la histología del tumor, dado que en adenocarcinomas se secreta una mayor cantidad que en carcinomas celulares escamosos (Santin *et al*, 1997). Por otra parte se sabe que en neoplasias intraepiteliales, que es una lesión premaligna de cérvix, la expresión de los receptores T $\beta$ R-I y T $\beta$ RII, se ve disminuida en mas del 80%, por lo que hay una perdida progresiva de sensibilidad al TGF- $\beta$  durante el desarrollo del carcinoma cervical (De Geest *et al*, 1994).

En los mamíferos se conocen tres isoformas del TGF- $\beta$ : el TGF- $\beta$ 1, que es expresado por células hematopoyéticas, endoteliales y de tejido conectivo; el TGF- $\beta$ 2, presente en células epiteliales y neuronales y el TGF- $\beta$ 3 que se encuentra principalmente en células del mesenquima. Estas tres isoformas son codificadas por genes diferentes y presentan una homología en su secuencia de aproximadamente un 80% (Masague, 1998).

Cada molécula de TGF- $\beta$  es sintetizada como parte de una gran molécula precursora, conteniendo una región de pro péptido; la mayoría del TGF- $\beta$  sintetizado es almacenado en la matriz extracelular en forma de complejo latente, carente de actividad biológica (Fig. 3). Se han descrito dos formas de complejos latentes, el “pequeño” y el “largo”. En el complejo latente pequeño, una molécula madura de TGF- $\beta$  se halla asociada por interacciones no covalentes, con el dímero pro-péptido llamado: Péptido Asociado a la Latencia (LAP, Latency-Associated Peptide).

En el complejo latente largo, LAP está unido por puentes disulfuro, a proteínas LTBPs (proteína que se une al TGF- $\beta$  latente, Latent TGF- $\beta$ -Binding Proteins). LTBPs confiere al complejo: TGF- $\beta$ -LAP-LTBPs la capacidad de asociarse con la matriz extracelular, permitiéndole almacenarse ahí. Debido a que existen varias isoformas de LTBPs, la biodisponibilidad del TGF- $\beta$  frente a sus blancos específicos, difieren entre los diferentes órganos, lo que sugiere que el LTBPs regula la formación de distintos tipos de complejos “largos” (Fortunel *et al.*, 2000).

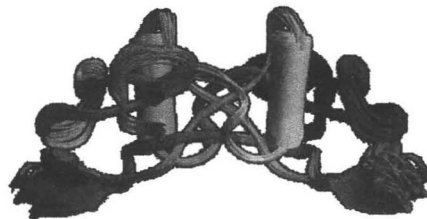


Figura 3. Estructura del TGF $\beta$ <sub>1</sub>, el cual consiste de un homodímero de subunidades A y B enlazadas por un puente disulfuro. (Tomado y modificado de Hinck *et al.*, 1996 & Peralta-Zaragoza *et al.*, 2001).

La activación extracelular de los complejos latentes del TGF- $\beta$  y con ello, la adquisición de la actividad biológica ocurre de la siguiente forma: La interacción entre el TGF- $\beta$  y LAP es no covalente y la liberación del TGF- $\beta$  funcional a partir de este complejo, puede ser ejercida por interacciones físicas del LAP con una glicoproteína secretada por muchas células e incorporada al interior de la matriz celular llamada trombospondina-1 (TSP-1) (Schultz-Cherry *et al.*, 1995; Crawford, *et al.*, 1998); así como por la integrina  $\alpha$  v  $\beta$  6 (Munger *et al.*, 1999), la plasmina, trombina, transglutaminasa plasmática y endoglicosilasas (Verrecchia *et al.*, 2002).

De los tres receptores existentes para el TGF- $\beta$ : T $\beta$ R-I; T $\beta$ R-II y T $\beta$ R-III, este último es el más abundante, ya que su acción consiste en unirse a la citocina y transferirla hacia sus receptores de señalización: T $\beta$ R-I y T $\beta$ R-II, los cuales son proteínas que contienen un dominio extracelular asociado al ligando (TGF- $\beta$ ), un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático de cinasa treonina-serina.

Una vez unido el ligando a T $\beta$ R-II, se produce la formación de un complejo heteromérico con T $\beta$ R-I, para iniciar la transducción de señales al interior de la célula. Por lo tanto, la cantidad de T $\beta$ R-III que facilita la interacción del TGF- $\beta$  con los receptores T $\beta$ R-II y T $\beta$ R-I, es un factor importante en la actividad de la señalización (Brown *et al.*, 1999). Formado el complejo heteromérico, T $\beta$ R-II fosforila a T $\beta$ R-I, promoviendo su activación; ya activado este reconoce y fosforila de una manera específica a los factores de transcripción Smad2 y Smad3, los cuales pertenecen a una subfamilia conocida como R-Smads; de esta manera llegan al núcleo donde se asocian con Smad4 y forman un complejo que es fundamental para la transcripción (Liu, *et al.*, 1997).

Una vez en el núcleo este complejo tiene la capacidad de reclutar a los coactivadores p300 y CBP (Feng, *et al.*, 1998; Janknecht, *et al.*, 1998; Poupponnot, *et al.*, 1998; Shen, *et al.*, 1998), que presentan actividad de histona acetil-transferasa (HAT), por lo que se sugiere un incremento en la transcripción de los genes blanco.

Una forma alternativa del receptor T $\beta$ R-I, conocido como T $\beta$ R-I(6A), es menos efectivo que T $\beta$ R-I y se sabe que este polimorfismo está presente en el 10% de la población, lo cual se podría considerar como un hecho susceptible para el desarrollo del cáncer.

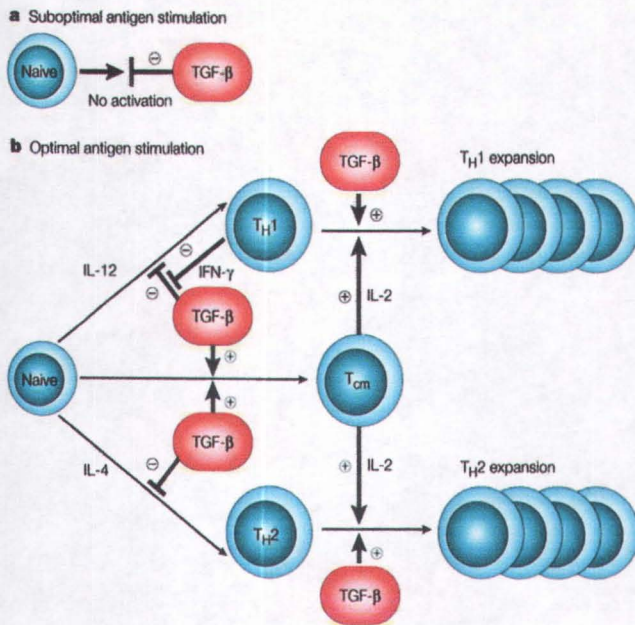
Definitivamente las mutaciones en las vías de señalización del TGF- $\beta$  se encuentran de alguna manera implicadas en el desarrollo de tumores, pues a la fecha se han reportado diversas mutaciones en los receptores T $\beta$ RI y T $\beta$ RII, específicamente para este último, en cáncer de páncreas, hígado, mama, colorectal, cuello y de cérvix (Chen *et al.*, 1999).

En la regulación de la transducción de señales, la inmunofilina FKBP12 se une a T $\beta$ R-I inhibiendo su función, ya que impide su fosforilación por parte de T $\beta$ R-II (Chen, *et al.*, 1997). Otra proteína transmembranal conocida como BAMBI, que carece de dominio intracelular, es capaz de asociarse con los receptores del TGF- $\beta$ , e impedir la formación de complejos y promover el reestablecimiento de homodímeros (Onichtchouk, *et al.*, 1999). Smad7 por su parte interactúa con T $\beta$ R-I en su estado activado e impide la asociación, fosforilación y por ende la activación de R-Smads (Hayashi *et al.*, 1997; Nakao, *et al.*, 1997), de la misma forma TRAP-I, (una proteína intracelular) se une a T $\beta$ R-I en su estado activo e impide la progresión de la señalización (Charg *et al.*, 1998).

## EFFECTOS DEL TGF- $\beta$ SOBRE LINFOCITOS

El TGF- $\beta$  es un factor supresor de la activación, proliferación y diferenciación de células T, B y NK (Susan et al., 1998; Buggins et al., 2001; Gorelik & Flavell, 2002). También se ha observado que la secreción del TGF- $\beta$  por parte de las células tumorales interfiere con la habilidad de generar linfocitos Tc (Nagy *et al.*, 1998). El TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento y la actividad de las células NK y puede disminuir la función de las células B al detenerlas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular inhibiendo genes como c-myc, necesario para ingresar hacia la fase S; e inclusive llevarlas hacia la apoptosis. Con ello, evita que una parte de la población de células B se diferencien hacia el linaje plasmático y por lo tanto abate la secreción de IgM [anticuerpo de la respuesta inmune humoral primaria] e IgG [anticuerpo de la respuesta inmune humoral secundaria] (Stavnezer, 1995). El TGF- $\beta$  también está involucrado en la regulación del desarrollo de células T en el timo (Stavnezer, 1995) y a las células TCD4+ las conduce a la apoptosis (Chang et al., 2003).

Para una efectiva erradicación del tumor mediado por el sistema inmune se requiere la participación de linfocitos Tc y la producción de citocinas provenientes de células Th<sub>1</sub>. La supresión de estas actividades por el TGF- $\beta$  puede ser un importante mecanismo de escape inmunológico (Chang et al., 2003). Lo anterior lo han demostrado Gorelik y sus colaboradores (2002) quienes han observado la capacidad del TGF- $\beta$  exógeno para evitar la diferenciación de células Th<sub>0</sub> hacia el linaje Th<sub>1</sub> presentando claras evidencias de la inhibición de la diferenciación de células T vírgenes hacia células T efectoras (Fig.4).



Nature Reviews | Immunology

Figura 4. Papel del TGF $\beta$  en la diferenciación de la célula T. (A) Una subóptima estimulación de la célula T virgen (naive) en presencia de TGF- $\beta$ , resulta en una inhibición completa de la producción de IL-2 y con ello, en una subsecuente inhibición de la activación y proliferación de la célula T. (B) La activación de la célula T naive por una óptima estimulación antigénica, por ejemplo con altos niveles de la molécula co-estimuladora CD28, o con IL-2, producido por la célula T, y en ausencia de TGF- $\beta$ , favorecera la activación y proliferación de la célula T. [Tomado y modificado de Gorelik & Flavell, 2002]

## HIPÓTESIS

Se sabe que las células tumorales son capaces de secretar una gama de citocinas que ayudan a mantener y propiciar las condiciones favorables para su supervivencia, proliferación y escape inmunológico, por lo que es probable que en el caso concreto del cáncer de cérvix una de estas citocinas, sea el TGF- $\beta$  y que la secreción de este factor sea dependiente de la presencia o tipo de papilomavirus hallado en las células tumorales.

## OBJETIVOS

- A) Determinar si la actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas es dependiente de la presencia o tipo de HPV hallado en las células tumorales.
  
- B) Determinar si el TGF- $\beta$  esta presente en los sobrenadantes de cultivos de células HeLa, SiHa y C-33A, y si esté es el principal causante de la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos humanos.
  
- C) Evaluar sí la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos humanos presente en los sobrenadantes de cultivos de células HeLa, SiHa y C-33A detiene el ciclo celular en alguna de sus fases o es un factor apoptótico.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A.1) Establecer cultivos de las células tumorales HeLa (HPV-18+), SiHa (HPV-16+) y C-33A (HPV-).

A.2) Generar sobrenadantes provenientes de cultivos de células HeLa (HPV-18+), SiHa (HPV-16+) y C-33A (HPV-).

A.3) Estandarizar las condiciones de cultivo para linfocitos de sangre periférica humana (LSPH).

A.4) Evaluar si los sobrenadantes provenientes de cultivos de células HeLa (HPV-18+), SiHa (HPV-16+) y C-33A (HPV-) afectan la proliferación celular de linfocitos humanos, provenientes de sangre periférica.

B.1) Determinar si en los sobrenadantes de células HeLa (HPV-18+), SiHa (HPV-16+) y C-33A (HPV-) esta presente el TGF- $\beta$ .

B.2) Evaluar si los sobrenadantes provenientes de cultivos de células HeLa (HPV-18+), SiHa (HPV-16+) y C-33A (HPV-) presentan actividad similar a la del TGF-  $\beta$  recombinante, inhibidor de la proliferación.

C.1) Determinar si los sobrenadantes provenientes de cultivos de células HeLa (HPV-18+), SiHa (HPV-16+) y C-33A (HPV-) afectan el ciclo celular de linfocitos humanos de sangre periférica.

C.2) Establecer si los sobrenadantes provenientes de cultivos de células HeLa (HPV-18+), inducen a los linfocitos a expresar fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular, como un indicativo de apoptosis.



## MÉTODO

### OBTENCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

Las líneas de carcinoma cervical humano C-33A y SiHa, fueron gentilmente donadas por el Dr. Alberto Monroy del laboratorio de Inmunobiología, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM). La línea celular de adenocarcinoma cervical HeLa, así como la línea epitelial de pulmón de visón Mv1Lu, fueron adquiridas del American Type Culture Collection (ATCC, E.U.) y se mantuvieron en cultivo con medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Microlab, México), suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) en una incubadora (Scientific) al 95% aire/ 5% CO<sub>2</sub> y a una atmósfera de humedad a punto de rocío (~ 70-90% de agua en fase gaseosa).

### OBTENCION DE MEDIOS CONDICIONADOS

Las células tumorales: HeLa, SiHa y C-33A, fueron cultivadas por separado en botellas falcon de tres niveles (superficie total = 483 cm<sup>2</sup>) con 150 ml de RPMI-1640, suplementado con 5% (v/v) de SFB, a una densidad de  $1 \times 10^7$  células; cuando el frasco de cultivo alcanzó confluencia celular, se lavó con 100 ml de PBS en cinco ocasiones sucesivas y se le sustituyó el medio por únicamente RPMI-1640 libre de suero; pasadas 48 horas en

condiciones de cultivo, se colectó el Medio Condicionado (M.C.), se centrifugó a 6000 rpm/5 min para eliminar el detrito celular y se almacenó a 4°C.

Para concentrar los Medios Condicionados, el volumen total fue liofilizado en un Speed-Vac (Automatic Environmental, modelo AES2000, Savant, E.U.), hasta reducir el volumen a sequedad total y el concentrado de cada tubo fue resuspendido en 1ml de PBS. Con la finalidad de eliminar el exceso de sales en los M.C. liofilizados, éstos fueron sometidos a una micro diálisis, la cual consistió en depositar el M.C. en una membrana de diálisis de 1 Kilodalton (Kda) tamaño de poro (Spectra/Poor MWCO 1000); el contenido se dializó en 250 ml de PBS 0.25X en agitación constante a 4°C/48 horas, cambiando cada 8 h. la solución de PBS, con la finalidad de no causar cambios a las proteínas presentes en los M.C.'s por ausencia de iones. Transcurrido el tiempo estipulado, los M.C.'s se centrifugaron a 14,000 rpm/10 min a 4°C. El medio condicionado se obtuvo por decantación y el sedimento fue eliminado. Finalmente los M.C.'s. fueron esterilizados por filtración a través de una membrana con diámetro de poro de 0.22 µm. (CORNING®) y se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta que fueron requeridos para los ensayos correspondientes.

## CULTIVO DE LINFOCITOS

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de sangre periférica humana, con una jeringa estéril de 20 ml, la cual se humedeció internamente de manera previa con heparina (5000

UI/ml, PISA, México). Posteriormente, se procedió a extraer la muestra de la vena del brazo de un voluntario sano en condiciones de ayuno.

Por otra parte, se depositaron 5 ml de Ficoll-HISTOPAQUE® (densidad de 1.077, +/- 0.001) (Sigma, Aldrich. E.U.), en cada uno de tres tubos de vidrio fondo cónico; inmediatamente se agregaron 5-6 ml de la muestra de sangre a cada uno de los tubos por las paredes, de forma lenta para lograr la formación de dos fases. Se centrifugaron los tubos durante 35 min, los primeros 5 minutos a 500rpm, de inmediato se incrementó la velocidad a 1000rpm por 5 minutos más y finalmente se incrementó la velocidad a 1500 rpm, para los minutos restantes. Finalmente se obtuvieron cuatro fases en la columna del tubo: Una al fondo de color rojo que contenía eritrocitos, seguida de una fase incolora que correspondía al Ficoll-HISTOPAQUE®; inmediatamente se pudo apreciar un delgado anillo de color blanco, constituido por las células linfocíticas de nuestro interés experimental y finalmente en la superficie una fase de color amarillo, que estaba formada por el plasma sanguíneo.

Se procedió a colectar el anillo blanco de linfocitos con la ayuda de una micropipeta de 1000µl, evitando extraer lo menos posible del líquido de las fases adyacentes; la muestra de linfocitos fue depositada en otro tubo de vidrio fondo cónico, para ser lavados vía centrifugación a 1500 rpm/5 minutos con 10 ml de RPMI-1640, al final de esta operación se retiró el sobrenadante por decantación y las células linfocíticas que formaban un botón al fondo del tubo fueron resuspendidas con RPMI-1640, para repetir la operación.

Finalmente, los linfocitos obtenidos fueron sembrados en una caja petri con RPMI-1640 y suplementados con SFB al 10% (v/v), se mantuvieron en condiciones de cultivo por 1 hora, para lograr una selección final de las células linfocíticas, ya que los monocitos presentes aun, quedaron adheridos al fondo de la caja de cultivo y los linfocitos

permanecieron en suspensión, al final se les realizó un lavado por centrifugación y se cuantificaron para ser utilizados en los ensayos correspondientes.

## EFEECTO DE LOS M.C.'S SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS

Fueron sembradas  $1.5 \times 10^5$  células linfocíticas/pozo-200 $\mu$ l en RPMI-1640, suplementado con SFB al 20% (v/v) con 25 $\mu$ l de Fitohemaglutinina/ml, en una placa de 96 pozos fondo plano, (Nunclon, Dinamarca), manejando un control negativo sin la adición de M.C. Por otra parte se adicionaron los M.C. de las células tumorales en dos concentraciones diferentes: 10 y 15 $\mu$ l por pozo. Las placas fueron incubadas por un lapso de 68 horas y finalmente fue cuantificado el número celular por pozo mediante conteo directo en una cámara de Neubauer (Boeckel Co.).

## VIABILIDAD CELULAR (MÉTODO DE EXCLUSIÓN POR AZUL TRIPANO)

El colorante azul tripano es capaz de penetrar al interior de las células cuya membrana celular está dañada. En tanto que las células que no son teñidas son consideradas como viables; por lo tanto se cuantificó la viabilidad celular por la técnica de exclusión por tinción con azul tripano (Sigma, Aldrich. E.U.); para esto se diluyó un volumen conocido del cultivo linfocítico en proporción 1:1 con el colorante azul tripano y se observó al microscopio, a través de una cámara de Neubauer (Boeckel Co). El porcentaje de las células muertas se obtuvo por la siguiente relación: (células teñidas/células totales) x 100

## DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE TGF- $\beta$ EN LOS M.C. 'S

La detección y cuantificación de TGF- $\beta$  se realizó mediante un kit para cuantificación (TGF- $\beta_1$  Multispecies BIOSURCE). Se agregó al pozo cero de la placa proporcionada por el proveedor 200 $\mu$ l de solución diluyente estándar y a los pozos restantes 200 $\mu$ l de las muestras problema, así como concentraciones conocidas de TGF- $\beta$ : 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.2 pg/mL., a pozos diferentes para obtener una curva de calibración.

Posteriormente se adicionó 50 $\mu$ l de anti-TGF- $\beta_1$  (Biotina conjugada) a cada pozo, excepto al pozo cero, y se mezcló sutilmente antes de dejar incubar por tres horas a temperatura ambiente, cubriendo la placa de cualquier fuente luminosa. Pasado el tiempo establecido, se desecharon los sobrenadantes y se efectuaron lavados de los pozos por cuatro ocasiones con la solución Buffer proporcionada por el proveedor; se dejó secar totalmente y se agregaron 100 $\mu$ l de la solución de Estreptavidina-peroxidasa-HRP a cada pozo, excepto al blanco, para posteriormente cubrir la placa e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Concluido el tiempo de incubación, se lavó la placa con la solución Buffer en cuatro ocasiones, una vez secado completamente se adicionaron 100 $\mu$ l de cromógeno estabilizador a cada pozo y se dejó en incubación por 30 minutos a temperatura ambiente a oscuridad total. Cuando concluyó el tiempo citado, se agregaron 100 $\mu$ l de solución de paro a cada pozo y se mezcló de manera sutil. Finalmente la placa fue leída en un lector de placas (EL 800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC. E.U.) a 450 nm.

## BIOACTIVIDAD DEL TGF- $\beta$ PRESENTE EN LOS M.C.'S

Se sabe que la línea celular epitelial de visón Mv1Lu, inhibe su proliferación en presencia de la citocina TGF- $\beta$  (Wu *et al*, 1996), hecho por el cual se emplea usualmente para demostrar la actividad biológica de dicha citocina.

Para saber si el TGF- $\beta$  presente en nuestros M.C. tenía actividad biológica, se sembraron 5000 células/pozo-100 $\mu$ l de RPMI-1640 suplementado al 10% (v/v) de SFB, en una placa de 96 pozos de fondo plano (Nunclon, Dinamarca). En el ensayo de la placa, se puso un control sin algún estímulo, así como un control positivo al cual se le adicionó 5 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinante; por otra parte se probaron los M.C.'s de las tres líneas tumorales en concentraciones de 10 $\mu$ l para HeLa y 15 $\mu$ l para SiHa y C-33A. A las 48 horas de incubación la placa fue evaluada por medio de la técnica de cristal violeta.

El colorante cristal violeta posee cualidades alcalinas, gracias a las cuales le es posible incorporarse a los núcleos celulares, tomando en cuenta esto; el número de núcleos teñidos es directamente proporcional al número celular total de una muestra evaluada. La muestra celular a evaluar, que crece en monocapa adherida al plato de cultivo, se fijó con glutaraldehído (Sigma Aldrich, E.U.) al 1.1% (v/v) manteniéndose en agitación constante por 10 min. Posteriormente se lavó en tres ocasiones sucesivas con agua bidestilada y se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min. Inmediatamente se agregó una solución de cristal violeta al 0.1% (w/v), disuelta en un amortiguador de ácido fórmico 200 mM, pH6 manteniendo en agitación constante por 20 min.

Al final del tiempo citado, la muestra se lavó con agua desionizada para eliminar el exceso del colorante, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por un lapso de 20 min y se agregó ácido acético al 10% (v/v), para solubilizar el colorante asimilado por los

núcleos celulares teñidos. La muestra se mantuvo en agitación constante por 20 min y finalmente se cuantificó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (EL1800 Bio-Tek INSTRUMENTS, INC. E.U.).

## PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS CON INCUBACIÓN DE M.C. Y $\alpha$ TGF- $\beta$

Fueron sembradas  $1.5 \times 10^5$  células linfocíticas/pozo-200 $\mu$ l en RPMI-1640, suplementado con SFB al 20% (v/v) con 25 $\mu$ l de Fitohemaglutinina/ml, en una placa de 96 pozos fondo plano (Nunclon, Dinamarca), manejando un control positivo con la adición de TGF- $\beta_1$  recombinante (5ng/ml) y su contraparte con incubación adicional de  $\alpha$ TGF- $\beta$  monoclonal (20 $\mu$ g/ml), por otra parte se adicionó 10  $\mu$ l de M.C. de células HeLa y 15  $\mu$ l de M.C. de las líneas tumorales SiHa y C-33A por pozo, así como también sus contrapartes incubadas por 60 min, con  $\alpha$ TGF- $\beta$  (20 $\mu$ g/ml).

Las placas fueron incubadas por un lapso de 68 horas y finalmente fue cuantificado el número celular por pozo mediante conteo directo en una cámara de Neubauer (Boeckel Co.).

## EVALUACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS LINFOCÍTICAS

Para determinar si el M.C. de las líneas tumorales afecta la progresión del ciclo celular de los linfocitos de sangre periférica, se decidió evaluar este mediante citometría de flujo. El análisis del ciclo celular requiere la identificación de las células en diferentes estados; las

células en etapa de mitosis pueden ser identificadas de manera directa a través de un microscopio, pero la identificación de las otras fases, requiere un criterio bioquímico, basado principalmente en la cantidad de material genético, presente en la célula (Cooper, et al, 2004).

Una población de células es incubada con un colorante fluorescente que se une al ADN, las células se hacen pasar a través de un citómetro de flujo, que cuantifica la intensidad de fluorescencia de las células individuales. El resultado es graficado, como número celular contra intensidad de fluorescencia, que es proporcional al contenido del ADN. De esta manera es posible distinguir la cantidad de células de una muestra que se encuentran en las diferentes fases del ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2/M$ ), en función de la cantidad de ADN que poseen (Cooper, et al, 2004).

Las células a evaluar fueron sembradas  $2 \times 10^5$  células linfocíticas/pozo-200 $\mu$ l de RPMI-1640, suplementado con SFB al 20% (v/v) y con 25  $\mu$ l de fitohemaglutinina/ml en una placa de 96 pozos fondo plano, adicionando 10  $\mu$ l de M.C. de células HeLa y 15  $\mu$ l de M.C. de las líneas tumorales SiHa y C-33A. Como control positivo se sembraron células linfocíticas sin adición del mitógeno Fitohemaglutinina.

Al cabo de 68 horas de cultivo, las células de los pozos fueron cosechadas y centrifugadas a 1500 rpm/5 min. El botón celular fue resuspendido con etanol al 70% (v/v), y fueron almacenadas a 4°C para su posterior evaluación. Antes de ser evaluadas las células fueron centrifugadas a 1500rpm/ 5 min. y fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS con ARN-asa, para incubarse a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se les agregó 10 $\mu$ l de Yoduro de Propidio (200mg/l) a cada una de las muestras a evaluar, fueron agitadas de manera gentil y se centrifugaron. Finalmente las células fueron



resuspendidas en 500 $\mu$ l de PBS y se depositaron en tubos para su evaluación en el citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson).

## NÚCLEOS APOPTÓTICOS

Fueron sembradas  $2 \times 10^5$  células linfocíticas/pozo-200 $\mu$ l en RPMI-1640, suplementado con SFB al 20% (v/v) con 25 $\mu$ l de Fitohemaglutinina/ml, en una placa de 96 pozos fondo plano, (Nunclon, Dinamarca) adicionando 10  $\mu$ l de M.C. de células HeLa. Por otra parte se manejo un control sin la adición de M.C.

Pasadas 68 horas de cultivo, las células linfocíticas fueron lavadas por centrifugación a 1500 rpm/5 min, con PBS y se cuantificó el número celular por conteo directo con una cámara de Neubauer (Boeckel Co). Con la finalidad de obtener una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml, se tomaron 50 $\mu$ l de la muestra con la densidad citada y se prepararon placas de cada una de las muestras en un Cytospin, marca Shandon Southern®.

La muestra de las placas fue fijada con glutaraldehído y teñida con Yoduro de Propidio por 30 seg, finalmente fueron preparadas con medio de montaje y observadas a través del microscopio para identificar cuerpos apoptóticos.

## EVALUACION DE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS LINFOCITICAS

Uno de los métodos más utilizados y generalizados para la detección de la apoptosis, esta basado en los cambios de distribución de fosfolípidos, dentro de la membrana plasmática de las células apoptóticas.

La fosfatidilserina que es encontrada exclusivamente en el interior de la membrana plasmática de células normales, se trasloca hacia la parte externa de la membrana durante la apoptosis y esta fosfatidilserina unida a anexina V puede ser cuantificada experimentalmente por citometría de flujo (Kaufmann, 1997).

Para evaluar si los linfocitos de sangre periférica presentaban muerte por apoptosis al ser estimulados con el M.C. de HeLa, se procedió a aplicar un tratamiento de detección por anexina V, (kit de ensayo para apoptosis Vybrant™).

Las células a evaluar fueron sembradas  $2 \times 10^5$  células linfocíticas/pozo-200 $\mu$ l RPMI-1640, suplementado con SFB al 20% (v/v) y con 25  $\mu$ l de Fitohemaglutinina/ml en una placa de 96 pozos fondo plano, adicionando 10  $\mu$ l de M.C. de células HeLa. Se tomó como control positivo una muestra de linfocitos cultivados en presencia de TGF- $\beta$  recombinante (5 ng/ml de cultivo).

Como control negativo se utilizó una población celular linfocítica con viabilidad celular cercana al 100%. Pasadas 68 horas en cultivo, las células fueron cosechadas y lavadas por centrifugación por un par de ocasiones a 1500rpm/5 min. con PBS.

Por otra parte se prepararon 10 ml de solución amortiguadora de unión a anexina 1X, a partir de una solución (5X), proporcionada por el proveedor. El botón celular linfocítico de la centrifugación fue resuspendido con 100 $\mu$ l de la solución amortiguadora 1X y se cuantificó el número celular por conteo directo con una cámara de Neubauer (Boeckel Co). Con la finalidad de obtener una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml, se diluyó la muestra en la misma solución amortiguadora.

Se tomaron 100 $\mu$ l de la muestra con la densidad citada y se le adicionó 5 $\mu$ l de anexina V FITC y 1 $\mu$ l de una solución de Yoduro de Propidio, posteriormente se incubó la muestra a temperatura ambiente por 15 min. Pasado este tiempo, se adicionó 400 $\mu$ l de la solución amortiguadora de anexina 1X por cada muestra a evaluar y se midió la emisión de fluorescencia a 530nm, en un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson).

En la evaluación se distinguen tres grupos celulares: las células vivas con una baja emisión de fluorescencia, las células apoptóticas con emisión de fluorescencia verde y las células necróticas con emisiones verde(FITC) y rojo (Yoduro de Propidio).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos, fueron sometidos a análisis de varianza (ANDEVA), para determinar si existía diferencia significativa entre los tratamientos realizados y de ser así, fueron comparadas la medias aritméticas de los tratamientos para saber entre cuales es que existía diferencia significativa, por la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey (DSH).

## RESULTADOS

En trabajos previos, hemos encontrado que los sobrenadantes provenientes de las líneas celulares HeLa, CaLo e InBl (HPV-18), presentan actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH). Sin embargo, no es claro si esta actividad inhibidora está presente sólo en los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales HPV-18 o se encuentra en los sobrenadantes de cultivos de células de CaCu independientemente del tipo de HPV o inclusive independientemente de la presencia o ausencia del HPV. Para aclarar este punto, linfocitos de sangre periférica, fueron estimulados con M.C., libre de suero, obtenido de células de CaCu HPV-18, HPV-16 y sin HPV.

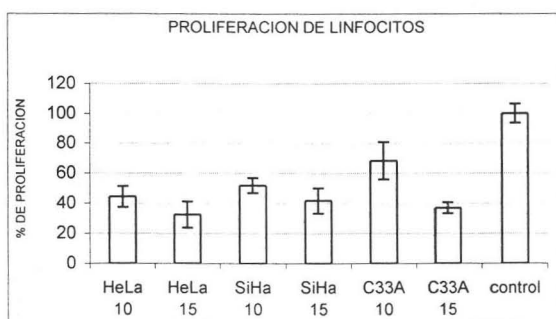


Figura 5. Efecto de los M.C.'s de CaCu sobre la proliferación de Linfocitos de Sangre Periférica Humana (LSPH). El ensayo fue evaluado a las 68 horas de cultivo, con incubación de 10 y 15  $\mu$ l de los medios condicionados de HeLa (HPV-18), SiHa (HPV16), C-33A (HPV-), así como de un cultivo control sin adición de ningún medio condicionado. Los resultados fueron obtenidos por conteo celular directo en un hemocitómetro.

Los resultados obtenidos nos muestran que los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales con y sin HPV, decrecen el número celular en los cultivos de células

linfocíticas, sugiriendo que la actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH) se presenta independientemente de la presencia de HPV (Fig. 5). La diferencia en el número celular observada en las dos concentraciones utilizadas, sugiere que el efecto es dependiente de la concentración, ya que el efecto inhibitor fue mayor con la concentración de 15  $\mu$ l. Las diferencias observadas en el número celular con los diferentes M.C.'s, utilizando la misma concentración no puede interpretarse, ya que la concentración del factor o factores que son responsables de la actividad inhibidora en cada uno de los sobrenadantes, no fue determinada. Sin embargo, la magnitud del efecto registrado en cada una de las concentraciones, nos permiten establecer las concentraciones de sobrenadantes que se utilizarán para ensayos posteriores: 10 $\mu$ l para el M.C. de HeLa, y 15 $\mu$ l para los medios de SiHa y C33-A.

El decremento registrado en el número celular de las células linfocíticas, sugiere que las células podrían estar inhibidas en su proliferación o podrían presentar un proceso de muerte, por lo que la viabilidad de tales células fue determinada a través de la técnica de exclusión del colorante azul tripano (Fig. 6).

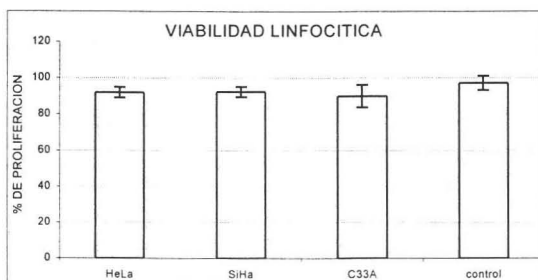


Figura 6. Determinación de la viabilidad de linfocitos de Sangre Periférica Humana (LSPH), estimuladas con M.C.'s. El ensayo fue evaluado a las 68 horas de cultivo, con incubación de 10  $\mu$ l de M.C. de HeLa (HPV-18); y 15  $\mu$ l de M.C. de SiHa (HPV16) y C-33A (HPV-), así como de un cultivo control sin adición de ningún medio condicionado. Cuantificado por conteo celular directo a través de hemocitómetro, mediante el método de exclusión por tinción con azul tripano.

Una vez que se ha encontrado que la AIPCLH no ejerce un efecto tóxico, nos permite plantear que podría tratarse de un factor biológico conocido, que presenta actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas. Un factor de gran reconocimiento como inhibidor de la proliferación es el TGF- $\beta$ , cuya actividad biológica puede ser detectada utilizando la línea celular Mv-1Lu, la cual se caracteriza por presentar inhibición de la proliferación dependiente de TGF- $\beta$ , por esta razón se realizaron ensayos de proliferación de las células Mv-1Lu, siendo estimuladas con los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales (Fig. 7).

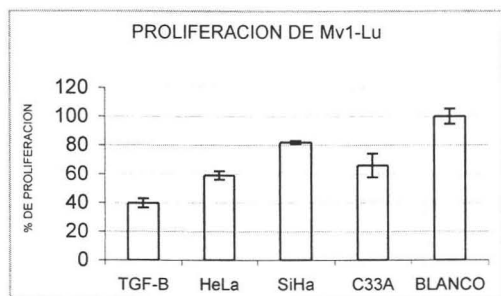


Figura 7. Efecto de diversos M.C.'s en la proliferación de la línea celular Mv1-Lu. Observada al cabo de 48 horas de cultivo, con incubación de 10  $\mu$ l de M.C. de HeLa (HPV-18); 15  $\mu$ l de M.C. de SiHa (HPV16) y de C-33A (HPV-), así como de un control positivo con 5ng/mL de TGF-beta y un cultivo control sin ningún estímulo. El ensayo fue evaluado por medio de la técnica cristal violeta, en un espectrofotómetro (EL1800 Bio-Tek INSTRUMENTS, INC. E.U.) a una absorbancia de 570 nm.

Los resultados establecen que las células tumorales HeLa, SiHa y C-33A secretan TGF- $\beta$  de manera activa, además se pone de manifiesto que lo hacen independientemente del tipo y la presencia de HPV. Sin embargo, es necesario determinar que concentración de TGF- $\beta$  es secretado por cada una de las líneas tumorales, por lo que se determinó la

TGF- $\beta$  es secretado por cada una de las líneas tumorales, por lo que se determinó la concentración de TGF- $\beta$  para cada uno de los sobrenadantes a través de un Kit de cuantificación (TGF- $\beta_1$  Multispecies BIOSURCE ) (Tabla 1).

M.C.	[ ] pg/ml
SiHa	0.14781
C-33	1.3855
HeLa	32.6191

TABLA 1. Cuantificación del TGF- $\beta_1$ , en los medios condicionados de las líneas celulares tumorales HeLa, SiHa y C-33A, mediante el kit de cuantificación TGF- $\beta_1$  Multispecies BIOSURCE .

Los resultados confirman la presencia de TGF- $\beta_1$  en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales. Sin embargo, la concentración de TGF-  $\beta_1$  registrada se encuentra en el rango de picogramos.

Estos resultados nos confirman que efectivamente el M.C. procedente de las líneas celulares tumorales posee TGF- $\beta$  y que este se encuentra activo, no obstante para saber si el efecto del M.C. sobre la proliferación de linfocitos, se debía principalmente a la presencia de TGF- $\beta$ , se decidió realizar ensayos de proliferación, bloqueando la actividad del TGF- $\beta$  presente en los M.C. 's con anticuerpo monoclonal  $\alpha$ TGF- $\beta$ . (Fig. 8).

En la figura 8, se muestra que cuando dirigimos anticuerpo monoclonal contra el TGF- $\beta$  presente en los M.C. 's, el efecto inhibitor es bloqueado de manera parcial, sin embargo

sigue presente. Lo que nos indica que el TGF- $\beta$ , si bien es el principal responsable de esta actividad inhibidora presente en el M.C., no es el único.

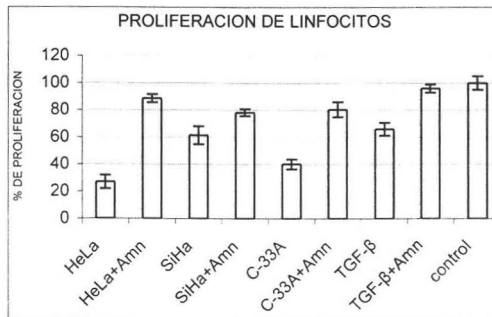


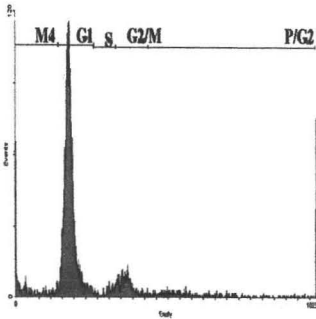
Figura 8. Efecto de los M.C.'s de cultivos provenientes de células de CaCu y TGF- $\beta_1$  recombinante, sobre la proliferación de Linfocitos de Sangre Periférica Humana (LSPH). El ensayo fue evaluado a las 68 horas de cultivo. Con incubación de 10  $\mu$ l del medio condicionado de HeLa (HPV-18), 15  $\mu$ l de los medios condicionados SiHa (HPV16), C-33A (HPV-), y un cultivo testigo con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ , así como sus respectivos contrapartes con incubación de  $\alpha$ -TGF- $\beta$  (20 $\mu$ g/ml) y un control sin adición de ningún medio condicionado. Los resultados fueron obtenidos por conteo celular directo en un hemocitómetro.

Una vez probada la existencia y actividad del TGF-  $\beta_1$  en los sobrenadantes de cultivos de las células tumorales, es conveniente determinar si el decremento en el número celular es debido a una detención en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular o a una inducción hacia una muerte apoptótica, por lo que cultivos de linfocitos fueron tratados con los sobrenadantes de cultivos de las células tumorales HeLa, SiHa y C-33A y la distribución del DNA en las fases del ciclo celular fue evaluada por citometría de flujo. (Fig. 9) (Tabla2).

La distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular de las células linfocíticas, revela que el efecto de los sobrenadantes es significativo, ya que en la fase G<sub>1</sub> se registró, un decremento considerable.

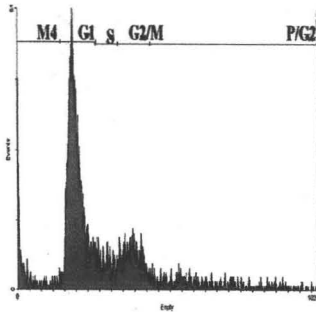


A) CONTROL SIN FITOHEMAGLUTININA.



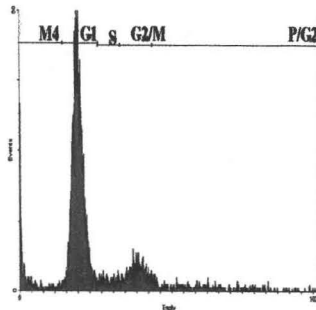
Marker	Events	%Gated
All	5000	100.00
G1	3350	67.0
S	106	2.12
G2/M	454	9.08
PG2	446	8.92
M4	659	13.18

B) CONTROL CON FITOHEMAGLUTININA



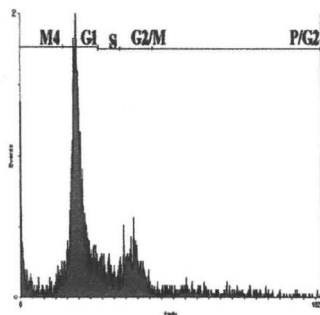
Marker	Events	%Gated
All	5000	100.00
G1	2486	49.72
S	615	12.30
G2/M	792	15.84
PG2	613	12.26
M4	540	10.80

C) HeLa



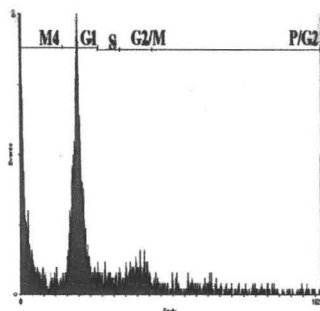
Marker	Events	%Gated
All	5000	100.00
G1	2626	52.52
S	276	5.52
G2/M	506	10.12
PG2	443	8.86
M4	1161	23.22

D) SiHa



Marker	Events	%Gated
All	5000	100.00
G1	1939	38.68
S	479	9.58
G2/M	543	10.86
PG2	446	8.92
M4	1608	32.16

E) C-33A



Marker	Events	%Gated
All	5000	100.00
G1	1397	27.94
S	229	4.58
G2/M	289	5.78
PG2	358	7.15
M4	2735	54.70

Figura 9. Efecto en el ciclo celular de LSPH por parte de los M.C.'s de las células HeLa (HPV-18); SiHa (HPV-16) y C-33A (HPV-), así como controles sin adición de ningún M.C. y sin Fitoheماغلutinina. El ensayo fue evaluado a las 68 horas de cultivo, en un citómetro de flujo marca FACScalibur, becton Dickinson.

CONDICION DE CULTIVO	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	POST G <sub>2</sub>	M4
S/FITHEMAGLUTININA	64.8	5.5	7.9	8.0	14.1
C/FITHEMAGLUTININA	49.66	13.24	13.92	12.82	10.88

HeLa	52.18	6.06	9.56	9.74	22.74
SiHa	39.36	10.28	8.76	9.16	32.96
C33-A	28.34	4.36	5.88	6.92	54.60

Tabla 2. Efecto de los sobrenadantes de cultivos de células HeLa, SiHa y C-33A en el ciclo celular de Linfocitos de Sangre Periférica Humana (LSPH). El ensayo fue evaluado en citómetro de flujo marca FACScalibur, Becton Dickinson a las 68 horas de cultivo.

En el cultivo control, el porcentaje de células linfocíticas en la fase  $G_1$  fue de 49.66 % por su parte, cuando fueron estimuladas con los sobrenadantes de las células SiHa y C33-A, pasó a 39.36 y 28.34 % respectivamente, sin embargo, no hubo un incremento significativo en las fases S y  $G_2/M$  (Tabla 2). Normalmente cuando las células son detenidas en alguna fase del ciclo celular, se observa un incremento o decremento porcentual en alguna de las fases del ciclo, de tal manera que la suma de los porcentajes de cada una de las fases es igual a 100. Sin embargo, este no es el caso, lo que genera la inquietud de saber hacia donde se van las células que son inducidas a salir de la fase  $G_1$ . Para explicar este fenómeno, se requiere considerar que la evaluación para determinar la distribución del ADN no sólo contempla la distribución en las fases  $G_1$ , S y  $G_2/M$ . En nuestros resultados observamos que la región que presenta un incremento significativo es la región M4 (10.88% para el control, 22.74 para HeLa, 32.96 % para SiHa y 54.60 para C-33A), región que muchos investigadores la consideran como un indicativo de células en un estado avanzado de apoptosis, sugiriendo que los sobrenadantes de las células tumorales inducen a las células linfocíticas a entrar al proceso de muerte celular programada.

Para corroborar esta presunción, las células linfocíticas fueron tratadas con los sobrenadantes de cultivos de las células tumorales y se evaluó la apoptosis por dos

métodos, la observación de cuerpos apoptóticos teñidos con Yoduro de Propidio (Fig. 10) y la expresión de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular, mediante un Kit de ANEXINA V (Vybrant™) (Fig. 11). Para ambos casos se eligió el sobrenadante de las células HeLa por presentar una mayor cantidad de TGF- $\beta_1$ .

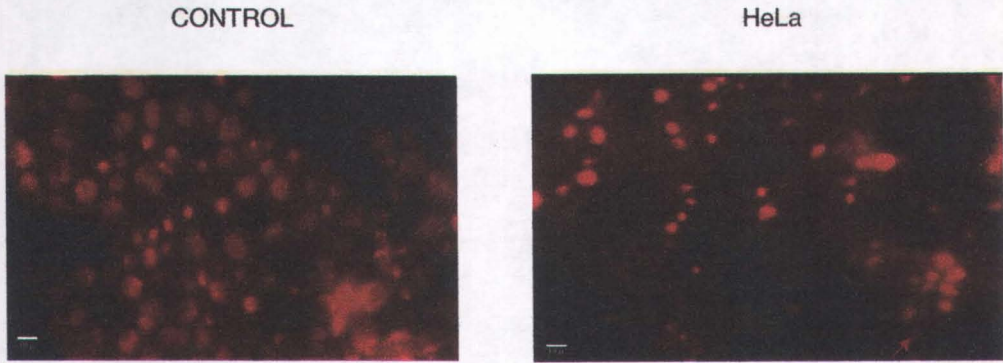
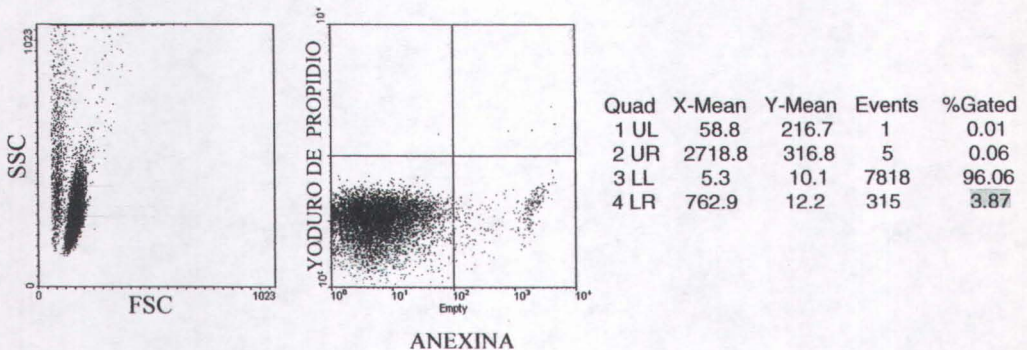
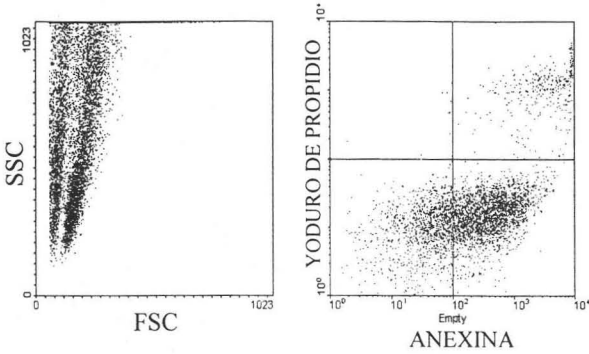


Figura 10. Tinción de núcleos linfocíticos con Yoduro de Propidio a las 68 horas de cultivo celular. Se muestran las fotografías correspondientes a los linfocitos que fueron incubados con 10 $\mu$ l de M.C. de HeLa, así como de un control sin estímulo adicional al mitógeno.

#### A) CULTIVO DE LINFOCITOS SIN ESTIMULO

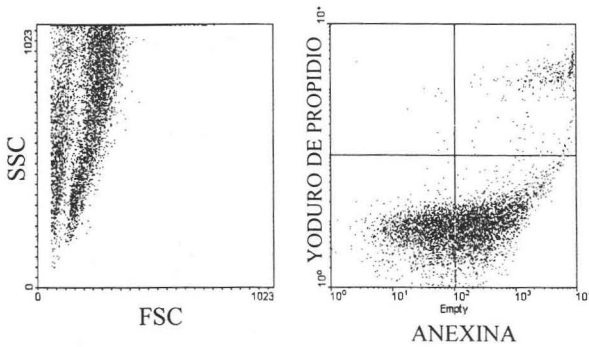


B) LINFOCITOS CON TGF-β



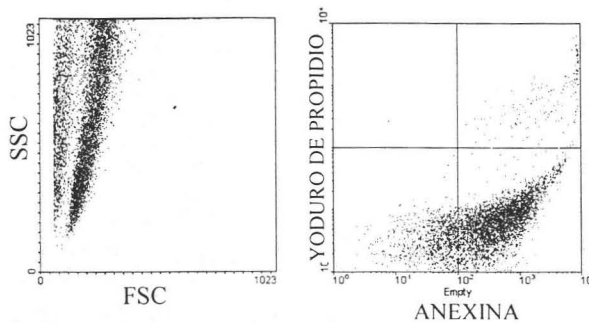
Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Gated
1 UL	37.2	380.0	12	0.30
2 UR	3077.4	1000.1	341	8.63
3 LL	32.8	9.5	1142	28.90
4 LR	409.7	15.7	2457	<b>62.17</b>

C) LINFOCITOS CON TGF-β + αTGF-β



Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Gated
1 UL	4.8	1267.4	29	0.47
2 UR	3604.6	1203.0	315	5.15
3 LL	36.5	7.0	2536	41.49
4 LR	332.8	9.5	3232	<b>52.88</b>

D) LINFOCITOS CON M.C. DE HeLa



Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Gated
1 UL	7.8	271.4	1	0.02
2 UR	3054.1	652.0	179	3.26
3 LL	37.3	3.3	953	17.35
4 LR	476.1	6.6	4360	<b>79.37</b>

### E) LINFOCITOS CON M.C. DE HeLa + $\alpha$ TGF- $\beta$

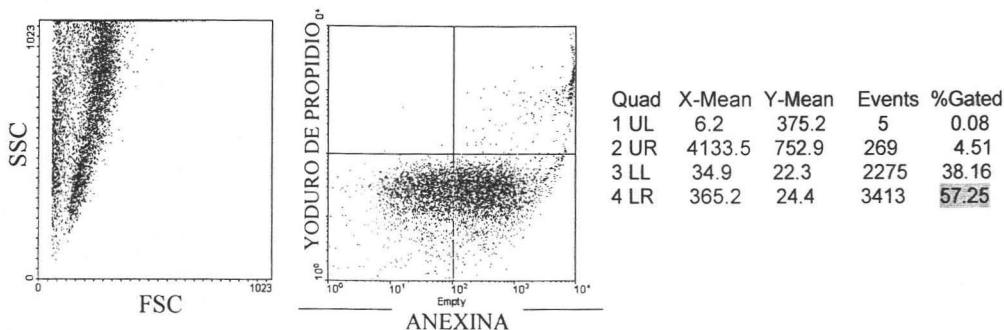


Figura 11. Efecto apoptótico del M.C. de HeLa sobre Linfocitos de Sangre Periférica Humana (LSPH). Para este ensayo se utilizó un kit para apoptosis Vybrant™. (A) Control de linfocitos sin mitógeno, ni M.C.; (B) Linfocitos con TGF- $\beta$ : 5 ng/ml; (C) Linfocitos con TGF- $\beta$  incubado con 20  $\mu$ g de  $\alpha$ TGF- $\beta$ ; (D) Linfocitos con 50  $\mu$ l de M.C. de HeLa/ml de cultivo; (E) Linfocitos con 50  $\mu$ l de M.C. de HeLa/ml de cultivo, incubado con 20  $\mu$ g de  $\alpha$ TGF- $\beta$ . Las muestras fueron evaluadas en un citómetro de flujo marca FACScalibur, becton Dickinson a las 68 horas de cultivo.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en la citometría de flujo, ya que se observan cuerpos apoptóticos en los cultivos de células linfocíticas estimulados con el sobrenadante de cultivos de células HeLa (Fig. 10), adicionalmente se detectó la expresión de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, indicando que los sobrenadantes de las células tumorales inducen a las células linfocíticas a entrar en apoptosis. (Fig. 11)

Podemos observar que en nuestro control negativo para este ensayo, la gran mayoría de nuestras células son viables, debido a que en el cuadrante LL, donde se ubican todas las células no marcadas por los indicadores de muerte celular se encuentra el 96.06% del total celular, mientras que solo el 3.87% del total de nuestra muestra se encuentra en el cuadrante LR, correspondiente a células positivas a la apoptosis. En el cuadrante UR, correspondiente a las células positivas a la necrosis, prácticamente no tenemos células.

En nuestro control positivo, al cual se le adicionó TGF- $\beta_1$  recombinante, podemos observar solo un 28.9% de células viables, mientras que se registra un 62.17% de células en estado de apoptosis y un 8.63% de células necróticas. Para el ensayo correspondiente a la adición de M.C. de HeLa, se observa un 79.37% de células en estado apoptótico, es decir 17.96% más que el cuantificado en nuestro control positivo con TGF- $\beta_1$  recombinante, el cuadrante UR registra un 3.26% del total celular, que corresponde a la necrosis y sólo tenemos un 17.35% de células viables.

Cuando el M.C. es incubado antes de estimular nuestro ensayo, con anticuerpo  $\alpha$ TGF- $\beta_1$  monoclonal, podemos observar un menor efecto apoptótico del M.C. sobre las células linfocíticas, pues el porcentaje de células apoptóticas en esta condición es de 57.25%, es decir, menor en 21.8 puntos porcentuales con respecto al ensayo donde se adicionó sólo el M.C. Sin embargo el porcentaje de células viables en este ensayo, es mucho menor al de nuestro control negativo, en el cual tenemos un 96.06% de viabilidad contra sólo el 38.16% en el ultimo ensayo donde se intentó bloquear la actividad inductora de apoptosis debida al TGF- $\beta_1$  presente en el M.C.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Es conocido que el cáncer cérvico-uterino se encuentra fuertemente asociado al papiloma virus humano (HPV), presentando un porcentaje del 99%, por lo que se cree que el HPV es el principal agente causal de esta enfermedad. Este hecho, podría implicar que las características tumorigénicas de las células transformadas podrían ser a consecuencia de la infección por el HPV, sin embargo la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana, fue encontrada en todos los medios condicionados de las líneas tumorales, sin ser un factor determinante la presencia de HPV tipo 16 y 18, sugiriendo que el HPV probablemente no está relacionado con la actividad inhibidora de la proliferación o por lo menos no de manera directa. También es posible que el papel que desempeñe el HPV en las células tumorales no sea el de evadir la respuesta inmunológica, pese a que las células tumorales ejercen una actividad por la cual pueden escapar a la vigilancia y eliminación por parte del sistema inmunológico. Al respecto, se ha reportado que el M.C. de HeLa es capaz de modular varios parámetros genotípicos y funcionales de monocitos de sangre periférica humana, especialmente células dendríticas, ya que impide su maduración y debilita su capacidad para presentar al antígeno a las células T, por lo que es capaz de interferir en la proliferación de células T (Kudela, et al 2001), evidencia que apoya la hipótesis de que las células HeLa producen factores solubles que pueden alterar de una forma dramática las características básicas, tanto fenotípicas como funcionales de las células T (Kudela, et al 2001), y en nuestro caso por lo menos alterar el potencial proliferativo de las células linfocíticas. No obstante lo reportado con células dendríticas, nuestro trabajo coincide con lo obtenido por el grupo de Grant *et al*, en el año 2002 quien reporta que las células HeLa al ser co-cultivadas con linfocitos de sangre periférica humana, son capaces de inducir inhibición en la proliferación



de las células linfocíticas en respuesta a la estimulación de estas por parte de Interleucina-2. Efectos tal vez similares, podrían ocurrir con los sobrenadantes provenientes de los cultivos de células SiHa y C-33A, donde la inhibición de la proliferación de linfocitos humanos también esta presente. El decremento en el número celular es debido no a una muerte necrótica, ya que la viabilidad determinada por la exclusión del colorante azul tripano revela que al menos las membranas plasmáticas de dichas células se encuentran intactas, una característica que no corresponde con la necrosis en la que la membrana plasmática se encuentra rota.

Dadas estas condiciones, la determinación de la presencia de TGF- $\beta$  en los M.C. fue necesaria, ya que inclusive se reportan altos niveles de expresión de esta citocina en otros tipos de cáncer como páncreas, colon, estomago, hígado, endometrio, próstata, mama, cerebro y hueso, relacionado directamente con el estado patológico. (Gold, 1999). Precisamente en células de cáncer cervical, algunos investigadores han reportado la presencia del TGF- $\beta$  en cultivos de células transformadas (Santin *et al.*, 1997; Grant, *et al.*, 2002), el cual en adición con Interleucina-15, pueden mermar la actividad de los linfocitos infiltrados en el tumor, promoviendo la expresión de inhibidores de receptores de las células NK e induciendo la expresión del receptor CD94/NKG2A en los linfocitos CD8+, para limitar de esta manera su cito toxicidad. (Sheu *et al.*, 2005).

La detección de TGF- $\beta$  en estado activo en los medios condicionados de las células tumorales indicó que el responsable de la actividad inhibidora en los medios condicionados es el TGF- $\beta$ , y la neutralización parcial de esta actividad con anticuerpos dirigidos contra el TGF- $\beta$  lo confirmo. Pese al hallazgo del TGF-  $\beta$  como molécula

responsable de la actividad inhibidora, se registraron diferencias en la concentración y actividad del TGF- $\beta$  presente en los medios condicionados, recordando que la concentración de TGF- $\beta$  en los medios condicionados está presente en cantidades de picogramos, nos sugiere que este es diez veces más activo que el TGF- $\beta$  recombinante en cuanto a esa característica. Con respecto al efecto de los medios condicionados en el ciclo celular, los resultados indican que no alteran las fases del ciclo celular, sino que se induce a las células linfocíticas a entrar en apoptosis, lo cual fue confirmado por la detección de cuerpos apoptóticos y de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular.

Los resultados obtenidos, coinciden con lo establecido en la literatura para otros tipos de cáncer, ya que el TGF- $\beta$  es reconocido como un factor supresor de la activación, proliferación y diferenciación de células T, B y NK (Susan *et al.*, 1998; Buggins *et al.*, 2001; Gorelik *et al.*, 2002), que además es capaz de inhibir el crecimiento y la actividad de las células NK (células asesinas naturales) y es capaz de disminuir la función de las células B al detenerlas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular e inclusive llevarlas hacia la apoptosis (Bouchard *et al.*, 1994, 1997).

Pese a todo, la neutralización de la apoptosis con anticuerpos monoclonal contra el TGF- $\beta$  no revirtió la actividad apoptótica del medio condicionado de HeLa, lo que sugiere que el TGF- $\beta$  no es el único responsable de la muerte apoptótica inducida a los linfocitos por lo que otra serie de factores pudiesen estar implicados en este efecto, como IL-10 (Interleucina-10), Fas-L (ligando de Fas), PDL-1, e incluso la enzima degradadora de triptofano: indolamina 2,3-dioxigenasa. (Grant, *et al.*, 2002; Sarkhosh, *et al.*, 2003, Van den, *et al.*, 2003; Fallarino, *et al.*, 2003). Aun con esta situación, los resultados obtenidos generan la posibilidad de proponer al TGF- $\beta$  como un marcador tumoral si éste se

encuentra fuera del intervalo de concentración normal en suero, bajo condiciones específicas.

## CONCLUSIONES

- A) La presencia del HPV 16 y 18 en las células tumorales de CaCu, no es un factor determinante para que se presente la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica.
- B) Las líneas celulares tumorales HeLa, SiHa y C-33A cultivadas en ausencia de SFB, son capaces de secretar TGF- $\beta_1$ , de manera soluble en concentraciones de picogramos/mililitro.
- C) El TGF- $\beta_1$  presente en los M.C.'s de células de CaCu es el principal responsable del decremento en el número celular de linfocitos en cultivo.
- D) El Medio Condicionado proveniente de la línea celular tumoral HeLa, es capaz de inducir apoptosis en linfocitos de sangre periférica humana.

## REFERENCIAS

Abbas K., Linchtman H., Pober S. (2002) *Inmunología celular y molecular*. Mc. Graw-Hill Interamericana., México DF. 577 pp.

Alonso R., Lazcano P., Hernández A., (2000) *Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y control*. UNAM, México. 254 pp.

Berumen J, Villegas N. (1997) Recombinant therapeutic vaccines against invasive cervical cancer. *Salud Publica México*. 39:288-297.

Berumen J., Ordonez R., Lazcano E., Salmeron J., Galván S., Estrada R., Yunes E., García-Carranca A., González-Lira G., Madrigal de la Campa A. (2001) Asian-american variants of humans papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*. 17: 1325-30.

Betancur L., Ossa J. (1996) Asociación molecular entre los papiloma virus y el cáncer de cérvix. *IATREIA*, Medellín, Colombia. 4: 177-183.

Bosch X., Muñoz N. (2002) The viral etiology of cervical cancer. *Virus Research*.; 89: 183-190.

Bouchard C., Fridman W., Sautes C. (1994) Mechanism of inhibition of lipopolysaccharide-stimulated mouse B-cell responses by transforming growth factor beta-1. *Immunology*. 40: 105-110.

Bouchard C., Fridman W., Sautes C. (1997) Effect of TGF-beta1 on cell cycle regulatory proteins in LPS-stimulated normal mouse B lymphocytes. *Journal Immunology*. 159: 4155-4164.

Brown C., Boyer A., Runyan R., Barnett J. (1999) Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science*. 283: 2080-2082.

Buggins AGS, Milojkovic D, Arno MJ, Lea NC, Mifti GJ, Thomas SB, Hirst WJR. (2001) Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kB, c-Myc, and pRb pathways. *The Journal of Immunology*. 167: 6021-30.

Bursch W., Paffe S., Putz B., Barthel G., Schulte-Hermann R. (1990) Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis*. 11: 847-853.

Caballero B., Moran A. (2002) Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *Revista de Educación Bioquímica*. 4: 235-244.

Caelles C., Helmberg A., Karin M. (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 370: 220-223.

Chang CJ, Liao CH, Wang FH, Lin CM. (2003) Transforming growth factor- $\beta$  induces apoptosis-specific CD4<sup>+</sup> T cells prepared for adoptive immunotherapy. *Immunology Letters*. 86: 37-43.

Charrng M., Zhang D., Kinnunen P., Schneider M. (1998) A novel protein distinguishes between quiescent and activated forms of the type I transforming growth factor beta receptor. *Journal Biological Chemistry*. 273: 9365-9368.

Chen J., Wu X., Lin J., Levine J. (1996) mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Molecular Cell Biology*. 16: 2445-2452.

Chen Y., Liu F., Massague J. (1997) Mechanism of TGF-beta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO Journal*. 16: 3866-3876.

Chen T., de Vires E., Hollema H., Yegen H., Vellucci V., Strickler H., Hildesheim A., Reiss M. (1999) Structural alterations of transforming growth factor-beta receptor genes in human cervical carcinoma. *International Journal of Cancer*. 82: 43-51.

Chopra V., Dinh T., Hannigan E. (1998) Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Investigation*. 16: 152-159.

Cooper M., Hausman E. (2004) *The cell a molecular approach*. ASM Press. 713 pp.

Crawford S., Stellmach V., Murphyullrich J., Ribeiro S., Lawler J., Hynes R., Boivin G., Bouck N. (1998) Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta-1 in vivo. *Cell*. 93: 1159-1170.

Debass M., White E. (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes and Development*. 4: 546-554.

De Filippis RA, Goodwin EC, Wu L, Di Maio D. (2003) Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Journal of Virology*. 2:1551-1563.

De Geest K., Bergman C., Turyk M., Frank B., Wilbanks G. (1994) Differential response of cervical intraepithelial and cervical carcinoma cell lines to transforming growth factor-beta 1. *Gynecologic Oncology*. 1: 376-385.

De-Vita T. (1997) *Cancer principles y practice of oncology*. USA Company, New York. 1078 pp.

Evan I., Wyllie H., Gilbert S., Littlewood D., Land H., Brooks M., Waters M., Penn Z., Hancock L. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 69: 119-128.

Fahey MS, Dawbarn D, Allen SJ, Paterson IC, Prime SS. (2001) Expression of recombinant extracellular domain of the type II transforming growth factor-beta receptor: utilization in a modified enzyme-linked immunoabsorbent assay to screen TGF-beta agonists and antagonists. *Analytical Biochemistry*. 2: 272-276.

Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Orabona C., Spreca A., Fioretti M., Prucetti P. (2003). T cell apoptosis by kynurenines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 527: 183-190.

Feldmann K., Sebald W., Knaus P. (2002) Resistance to TGF- $\beta$ 1-mediated growth inhibition correlates with sustained Smad2 phosphorylation in primary murine splenocytes. *European Journal of Immunology*. 5: 1393-1402.

Feng X., Zhang Y., Wu R., Derynck R. (1998) The tumor suppressor smad4/dpc4 and transcriptional adaptor cbp/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Development*. 12: 2153-2163.

Fidler I., Schackert G., Zhang R., Radinsky R., Fujimaki T. (1999) The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*. 3: 387-400.

Flores. G. (2003) Efecto del TGF $\beta$ <sub>1</sub> y el TNF $\alpha$  producidos por líneas de cáncer cervical sobre la proliferación de linfocitos y la adherencia celular. Tesis de maestría-IPN, México DF. 69 pp.

Folkman J. (1996). Fighting Cancer by Attacking Its Blood Supply. *Scientific American*. 3: 116-19.

Fortunel N., Hatzfeld A, Hatzfeld J. (2000) Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 6: 2022-2036.

Gershenwald HE, Fidler IJ. (2002) Targeting lymphatic metastasis. *Science*. 296:1811-1812.

Gibbs W. (2003) Untangling the Roots of Cancer. *Scientific American*. 1: 56-59.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Gold L. (1999) The role for transforming growth factor-beta in human cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 4: 303-360.

Gorelik L, Constant S, Flavell R. (2002) Mechanism of transforming growth factor  $\beta$ -induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *Journal of experimental medicine*. 11): 1499-1505.

Grant J., Smyth C., Earl J., Zaikina I., Rowe P. (2002) HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immuno-inhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Immunology*. 105: 478-487.

Green R. (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*. 102: 1-4

Haffner R., Oren M. (1995) Biochemical properties and biological effects of p53. *Current Opinion in Genetics and Development*.. 5: 84-90.

Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y., Grinnell B., Richardson M., Topper J., Gimbrone M., Wrana J., Falb D. (1997) The mad-related protein smad7 associates with the TGF-beta receptor and functions as an antagonist of TGF-beta signaling. *Cell* 89: 1165-1173.

Hernández H. D., Órnelas B. L., Guido J. Apresa G., Alvarado C., Salcedo V., Mohar. B and Garcia C. (2003) Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecologic Oncology*. 90: 310-317.

Itoh N., Yonehara A., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 2: 233-243.

Janknecht R., Wells N., Hunter T. (1998) TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators cbp/300. *Genes Development*. 12: 2114-2119.

Kaufmann H. (1997). Apoptosis, pharmacological implications and therapeutic opportunities. Academic Press. 614 pp.

Karp G. (1998) *Biología Celular y Molecular*. Ed.. MacGraw-Hill. México. 746 pp.

Kim Y., Yi Y., Choi S., Kim S. (1999) Development of TGF-beta resistance during malignant progression. *Archives of Pharmacal Research*. 1: 1-8.

Kretschmar, M.; Massagué, J. (1998) SMADs: mediadors and regulators of TGF-beta signaling. *Current Opinion in Genetics and Development*. 8:103-111.

- Kudela P., Schwarczova Z., Sedlak J. Bizik J. (2001) Conditioned medium from HeLa cells motility of human monocyte-derived dendritic cells but abrogates their maturation and endocytic activity. *Neoplasma*. 5: 382-388.
- Liotta L. (2001) An attractive force in metastasis. *Nature*. 410: 24-25.
- Liu F., Poupponnot C., Massague J. (1997) Dual role of the smad4/dpc4 tumor suppressor in TGF-beta-inducible transcriptional complexes. *Genes and Development*. 11: 3157-3167.
- Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2003) *Biología celular y molecular*. Panamericana. 1084 pp.
- Lowe W., Jacks T., Housman E., Ruley E. (1994) Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 2026-2030.
- Lui X., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 89: 175-184.
- Mandado S., Leonard I., Amores I., Domínguez C., González N., Paniagua M., Quintero S., Grá B. (2004) Infección por Papillomavirus humano (PVH) en carcinomas colorrectales. *Revista panamericana de Ilectología*. 6 (3).
- Margni A. (1996) *Inmunología e inmunoquímica*. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 963 pp.
- Masague J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 67: 753-791.
- Miyashita T., Reed J. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 80: 293-299.
- Morgan S. J., Darling D. C., (1995) *Cultivo de células animales*. Acribia, S.A., México, DF. 159 pp.
- Moses, H; Yang E.; y J., Pietenpol. (1990) TGF- $\beta$  stimulation and inhibition of Cell proliferation: New mechanistic insights. *Cell*. 2: 245-247.
- Munger J., Huang X., Kawakatsu H., Griffiths M., Dalton S., Wu J., Pittet J., Kaminski N., Garat C., Matthay M., Rifkin D., Sheppard D. (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF-beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328.



Nagy N., & Vánky 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 interferon $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  reduces the production of active TGF $\beta$ . *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 45: 306-312.

Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J., Heuchel R., Itoh S., Kawabata N., Heldin N., Heldin C., Tendijke P. (1997) Identification of smad7, a TGF-beta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 389: 631-635.

Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth C., Ponsting H., Krammer H. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *Journal Biology of Chemistry*. 267: 10709-10715.

Onichtchouk D., Chen Y., Dosch R., Gawantka V., Dellus H., Massague J., Niehrs C. (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401: 480-485.

Owen-Schaub B., Zhang W., Cusak C., Angelo S., Santee M., Fujiwara T., Roth A., Deisseroth T., Kruzel E., Rudinsky L. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Molecular Cell Biology*. 6:3032-3040.

Parslow G., Stites P., Terr I., Imboden B., (2002) *Inmunología básica y clínica. Manual Moderno, México, DF. 895 pp.*

Pasche B. (2001) Role of transforming growth factor beta in cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 186: 153-168

Pollard W., Walkerm M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols. Humana Press. 489 pp.*

Pouponnot C., Jayaraman L., Massague J. (1998) Physical and functional interaction of smads and p300/cbp. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 22865-22868.

Rangel C., Soto C., Weiss S. (1999) V Reunión, investigación de cáncer en México, UNAM, FES-Zaragoza, México, DF. 289 pp.

Richards S., Garman R., Keyes L., Kavanagh B., McPherson J. (1998) Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunology*. 2: 85-91.

Roitt M., Delves J. (2003) *Inmunología. Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 559 pp.*

Rojas E. (2001) *Inmunología*. Panamericana, México, DF. 374 pp.

Ruoslahti E. (1996). How Cancer Spreads. *Scientific American*. 3: 72-77

Rowan S., Ludwig L., Haupt Y., Bates S., Lu X., Oren M., Vousden H. (1996) Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO Journal*. 15: 827-838.

Santin A., Hermonat P., Hiserodt J., Fruehauf J., Schranz V., Barclay D., Pecorelli S., Parham G. (1997) Differential transforming growth factor-beta secretion in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology*. 3: 477-480.

Sarkhosh J., Tredget E., Li Y., Kilani R., Uludag H., Ghahary A. (2003) Proliferation of peripheral blood mononuclear cells is suppressed by the indoleamine 2,3-dioxygenase expression of interferon-gamma-treated skin cells in a co-culture system. *Wound Repair Regen*. 5: 337-345.

Schultz-Cherry S., Chen H., Mosher D., Misenheimer T., Krutzsch H., Roberts D., Murphy-Ullrich J. (1995) Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 7304-7310.

Selvakumaran M., Lin K., Miyashita T., Wang G., Krajewski S., Redd C., Hofman B., Liebermann D. (1994). Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*. 6: 1791-1798.

Shen X., Liberati N., Datto M., Frederick J., Wang X. (1998) TGF-beta-induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. *Molecular Biology of the Cell*. 9: 3309-3319.

Sheu B., Chiou S., Lin H., Chow S., Huang S., Ho H., Hsu S. (2005) Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma. *Cancer Research*. 7: 2921-2929.

Stavnezer J. (1995) Regulation of Antibody Production and Class Switching by TGF- $\beta$ 1. *Journal of Immunology*. 4:1647-1651.

Tamura T., Ishihara M., Lamphier S., Tanak N., Oishi I., Aizawa S., Matsuyama T., Mak W., Taki S., Taniguchi T. (1995) An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature*. 376: 596-599.

Tanaka N., et. al. (1996) Cooperation of the tumor suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature*. 382: 816-818.

Tepper G., Jayadev S., Liu B., Bielawska A., Wolff R., Yonehara S., Hannun A., Seldin F. (1995) Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 8443-8447.

Van den E. (2003) A new mechanism of tumor resistance to the immune system, based on tryptophan breakdown by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Bulletin et Memoires de l'Academie Royale de Medecine de Belgique*. 158: 356-363.

Verrecchia F, Mauviel A. (2002) Transforming growth factor- $\beta$  signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix. *Gene Expression and Regulation*. 2:211-215.

Weinberg R. (1996) How cancer arises. *Scientific American*. 3: 62-70.

Wright S., Kumar P., Tam A., Shen N., Varma M., Larrick W. (1992) Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. *Journal Cell Biochemistry*. 48: 344-355.

Xiao-Ming Y., Zheng D. (2003) *Essentials of Apoptosis A Guide for Basic and Clinical Research*. Humana Press. New Jersey. E.U.A. 242 p.

## APÉNDICE

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS CON ADICION DE M.C.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
HeLa 10	5	470000	94000	42500000
HeLa 15	5	335000	67000	20000000
SiHa 10	5	540000	108000	7500000
SiHa 15	5	425000	85000	25000000
C33A 10	5	660000	132000	7500000
C33A 15	5	400000	80000	12500000
CONTROL	5	1060000	212000	182500000

#### ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	$F_c$	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7.256E+10	6	12094047619	285	9.433E-24	2.445262
Dentro de los grupos	1.19E+09	28	42500000			
Total	7.375E+10	34				

El valor de  $F_c > F_t$  por lo tanto existen diferencias significativas entre dos o más pares de medias.

#### PRUEBA DE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA HONESTA DE TUKEY (DSH)

$$DSH = q_{\alpha, K, gIE} \sqrt{CM_E/n} \longrightarrow DSH = 5606.5$$

	HeLa 15	SiHa 10	SiHa 15	C33A 10	C33A 15	CONTROL
HeLa 10	27000	14000	9000	38000	14000	118000
HeLa 15		41000	18000	65000	13000	145000
SiHa 10			23000	24000	28000	104000
SiHa 15				47000	5000	127000
C33A 10					52000	80000
C33A 15						132000

Exceptuando la diferencia entre medias resaltada de la tabla anterior, (la cual no presenta diferencia significativa); la comparación entre las medias restantes resultaron ser significativamente diferentes.

### PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA LINEA Mv1-Lu

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
TGF-beta	3	1.382	0.46066667	5.0333E-05
HeLa	3	2.146	0.71533333	0.00040433
SiHa	3	2.911	0.97033333	0.00011433
C33A	3	2.411	0.80366667	0.00497033
BLANCO	3	3.551	1.18366667	0.00386233

### ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	$F_c$	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.8849076	4	0.2212269	117.653023	2.2992E-08	3.47804985
Dentro de los grupos	0.01880333	10	0.00188033			
Total	0.90371093	14				

El valor de  $F_c > F_t$  por lo tanto existen diferencias significativas entre dos o mas pares de medias.

### PRUEBA DE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA HONESTA DE TUKEY (DSH)

$$DSH = q_{\alpha, K, g, E} \sqrt{CM_E/n} \longrightarrow DSH = 0.062586984$$

	HeLa	SiHa	C33A	BLANCO
TGF-beta	0.25466667	0.50966667	0.343	0.723
HeLa		0.255	0.088333333	0.46833333
SiHa			0.166666667	0.21333333
C33A				0.38

La comparación entre medias de los tratamientos realizados, resultaron ser todas significativamente diferentes entre sí.

PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS CON M.C. INCUBADOS CON ANTICUERPO MONOCLONAL  $\alpha$ TGF- $\beta$

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
HeLa	3	290000	96666.6667	33333333.3
HeLa+Amn	3	960000	320000	100000000
SiHa	3	655000	218333.333	308333333
SiHa+Amn	3	830000	276666.667	83333333.33
C-33A	3	435000	145000	325000000
C-33A+Amn	3	870000	290000	400000000
TGF- $\beta$	3	705000	235000	175000000
TGF- $\beta$ +Amn	3	1030000	343333.333	158333333
control	3	1075000	358333.333	258333333

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.899E+11	8	2.3737E+10	120.924528	4.7401E-14	2.51015564
Dentro de los grupos	35333333333	18	196296296			
Total	1.9343E+11	26				

El valor de  $F_c > F_1$  por lo tanto existen diferencias significativas entre dos o más pares de medias.

PRUEBA DE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA HONESTA DE TUKEY (DSH)

$$DSH = q_{\alpha, K, gIE} \sqrt{CM_E/n} \longrightarrow DSH = 22510.32868$$

	HeLa+ $\alpha$	SiHa	SiHa+ $\alpha$	C-33A	C33A+ $\alpha$	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$ + $\alpha$	CONTROL
HeLa	223333	121667	180000	48333	193333	138333	246667	261667
HeLa+ $\alpha$		101667	43333	175000	30000	85000	23333	38333
SiHa			58333	73333	71667	16667	125000	140000
SiHa+ $\alpha$				131667	13333	41667	66666	81667
C-33A					145000	90000	198333	213333
C-33A+ $\alpha$						55000	53333	68333
TGF- $\beta$							108333	123333
TGF- $\beta$ + $\alpha$								15000

Exceptuando las diferencias entre medias resaltadas de la tabla anterior, (las cuales no presentan diferencia significativa); la comparación entre las medias restantes resultaron ser significativamente diferentes.