

30377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

PAPEL DEL TGF- β COMO PARTE DE LA ESTRATEGIA DE CÉLULAS TUMORALES DE CaCu PARA EVADIR EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

HUGO LÓPEZ MUÑOZ

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



MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE, 2005

m. 352193



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.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
 NOMBRE: Hugo López Muñoz
 FECHA: 13- diciembre - 2005
 FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
 Director General de Administración Escolar, UNAM
 Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de octubre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **LOPEZ MUÑOZ HUGO**, con número de cuenta 97544119 con la tesis titulada: "Papel del TGF-B como parte de la estrategia de células tumorales de CaCu para evadir el Sistema Inmunológico", bajo la dirección del(a) **M. en C. Luis Sánchez Sánchez**.

Presidente:	Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo
Vocal:	Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet
Secretario:	M. en C. Luis Sánchez Sánchez
Suplente:	Dra. Rebeca López Marure
Suplente:	Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Ciudad Universitaria D.F., a 30 de noviembre del 2005

[Firma]
 Dr. Juan Nuñez Farfán
 Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON LOS APOYOS RECIBIDOS DEL
CONACYT NÚMERO DE BECARIO 182454 Y DE LA DGEP UNAM**

**DIRECTOR DE TESIS
M EN C LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL
DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO**

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado

Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo

Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet

M en C. Luis Sánchez Sánchez

Dra. Rebeca López Marure

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma por su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

A mi esposa

Con tu amor, paciencia y comprensión le das un nuevo sentido a la vida

A mi hijo

Luz de mi vida sigues siendo la razón más importante para seguir adelante

A mi madre

Eres mi fuerza y el apoyo que me sostiene

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
Cancer y cáncer cérvico uterino (CaCu)	2
• Tratamiento del cáncer cérvico uterino	4
Factores de crecimiento	4
EI TGF-β	6
• Síntesis del TGF- β	7
• Transducción de señales del TGF- β	8
• Actividades biológicas del TGF- β	11
EI TGF-β Y EL CANCER	12
EL SISTEMA INMUNOLOGICO Y EL CANCER	15
EL TGF-β Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO	18
JUSTIFICACIÓN	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS GENERALES	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52

RESUMEN

Las células tumorales secretan diversas citocinas que les permiten modificar su microambiente y generar condiciones para sobrevivir y proliferar, adquiriendo ventajas selectivas que favorecen su estado tumorigénico. En el presente trabajo se encontró que las células tumorales HeLa provenientes de cáncer cérvico uterino (CaCu), secretan un factor con actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH), de naturaleza proteica y con actividad similar al TGF- β . El tratamiento del medio condicionado (MC) proveniente de cultivos de células HeLa con un anticuerpo neutralizante contra TGF- β , bloqueó la actividad inhibidora de la proliferación en un 100%, sugiriendo que ésta citocina es la responsable de la AIPCLH. El análisis de distribución del ADN a través del ciclo celular, la observación de cuerpos apoptóticos y la detección del lípido fosfatidil serina en la cara externa de la membrana celular de las células linfocíticas al ser tratadas con el MC, revela que las células linfocíticas son inducidas a la apoptosis. Finalmente, se encontró que la subpoblación de linfocitos TCD4+ fue la más responsiva a dicha actividad.

ABSTRACT

The tumor cells secrete cytokines that allow them to modify their micro-environment and to generate conditions to survive and to proliferate, acquiring selective advantages that favor their tumorigenic state. Presently work, was found that the HeLa tumoral cells, coming from cervical cancer (CaCu), they secrete a factor with proliferation inhibit activity of human lymphocytes cells (AIPCLH), of protein nature and with TGF-beta like activity. The treatment of the conditioned mean (MC) coming from cultures of HeLa cells with antibodies against TGF-beta, blocked the inhibitor of the proliferation activity in 100%, suggesting that this cytokine is the responsible for the AIPCLH. The analysis of the DNA distribution through the cellular cycle, the observation of apoptotic bodies and the detection of the fosfatidil serine in the external face of the cellular membrane of the lymphocyte cells tried with the MC, reveals that the lymphocyte cells are induced to the apoptosis. Finally, it was found that the TCD4+ lymphocyte cells are the more responder to this activity

INTRODUCCIÓN

CANCER Y CANCER CERVICO UTERINO (CaCu)

El cáncer es una enfermedad genética producida por diversas alteraciones en las que participan un conjunto de genes cuyos productos ejercen funciones básicas como el control del crecimiento, la diferenciación y la muerte celular (Darnell *et al*, 1993).

Las células tumorales presentan dos características que las distinguen de las normales: se reproducen de manera descontrolada y son capaces de invadir y colonizar tejidos y órganos distantes en lugares en donde normalmente no pueden crecer, proceso al que se le denomina metástasis (Alberts *et al*, 1996). Para que un cáncer pueda diseminarse por todo el cuerpo, las células de un tumor típico deben ser capaces de disminuir su adhesión con sus vecinas originales, escapar del tejido de origen, atravesar otros tejidos hasta llegar a un vaso sanguíneo o linfático, cruzar la lámina basal y revestimiento endotelial del vaso para entrar a la circulación, salir de la circulación en otra parte del cuerpo y sobrevivir y proliferar en un nuevo entorno en el que se encuentren (Cavanee *et al*, 1989). Cada uno de estos pasos requiere de diferentes propiedades que la célula debe adquirir; por ejemplo, en una gran variedad de carcinomas la disminución de la adhesión a las células vecinas depende de la pérdida de la expresión de la caderina E, una molécula de adhesión entre células epiteliales, mientras que la habilidad de atravesar tejidos parece depender de la producción de enzimas proteolíticas que permitan degradar la matriz extracelular (Jiménez *et al*, 2003). Se ha demostrado también que para que los tumores crucen la membrana basal, deben tener receptores que permitan a las células adherirse a ella; esta capacidad que adquieren las células tumorales de generar metástasis es lo que hace al cáncer difícil de erradicar.

Dentro de los diferentes cánceres que se presentan, el CaCu ocupó el primer lugar como causa de muerte por cáncer en México, con 41,326 casos reportados por el Sistema Nacional de Salud durante el trienio de 1993 a 1995, lo que corresponde al 22.5% del total de casos registrados y convirtiéndole en un

problema de salud muy importante en nuestro país (Eifel *et al*, 2001). Este tipo de cáncer, aparece en la unión del canal cervical y del ectocérvix, que es el sitio donde las células pueden sufrir transformaciones por la acción de uno o más factores de riesgo, ya sean biológicos (mutaciones, virus, edad), socioculturales (escolaridad, hábitos de higiene), e incluso factores medioambientales a los que todos estamos expuestos. Las anomalías tempranas del cérvix, conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se diagnostican comúnmente en mujeres de entre 30 y 40 años de edad. Para que el NIC evolucione a CaCu invasor necesita de 8 a 20 años y en la mayoría de los casos se requiere de 5 a 10 años para que las células transformadas penetren a la membrana basal del cérvix e invadan otros tejidos (Romney, 1980; Lazcano *et al*, 1999). Una vez ocurrido esto, las pacientes que no han recibido tratamiento, o que no han respondido a éste mueren usualmente en un periodo de 3 a 5 años.

Dentro de los diferentes factores que aumentan el riesgo de contraer CaCu, destaca la infección con el virus del papiloma humano (HPV). Los HPV son un grupo de más de 70 tipos de virus que pueden causar verrugas, o *papilomas*. Ciertos tipos de HPV pueden infectar los órganos genitales femeninos y masculinos, así como el área del ano. Estos tipos de HPV se transmiten de una persona a otra durante el contacto sexual. El término médico para las verrugas genitales es *condiloma acuminado*. La mayoría de las verrugas genitales se debe a dos tipos de virus del papiloma humano: el HPV 6 y el HPV 11. Sólo en raros casos éstos se convierten en cáncer del cuello uterino, por lo que se les llama virus de "bajo riesgo". Sin embargo, otros tipos de HPV de transmisión sexual han sido asociados con el cáncer genital o anal, tanto en hombres como en mujeres. Éstos se denominan tipos de "alto riesgo" e incluyen el HPV 16, HPV 18, HPV 33, HPV 35, HPV 45 y otros (Massing *et al*, 1963; Phelps *et al*, 1988). Ciertos tipos de conductas sexuales aumentan el riesgo de una mujer de contraer una infección con el HPV como son las relaciones sexuales a temprana edad, tener muchas parejas sexuales, realizar el acto sexual a cualquier edad sin protección, entre otras (Mc Nab, 1991).

Tratamiento del CaCu

Un cáncer pequeño (llamado cáncer microinvasivo), puede ser removido totalmente mediante un procedimiento llamado biopsia de cono. En este tipo de biopsia, se remueve una cantidad mayor del tejido de cérvix. El tejido es examinado bajo un microscopio para ver si todo el cáncer ha sido removido. Este procedimiento puede hacerse en el consultorio del doctor, o en el hospital. Ya que existen tres clases de biopsias de cono, los síntomas y el tiempo de recuperación varía. Si el cáncer no puede ser removido por medio de la biopsia de cono, la mujer puede que tenga que ser sometida a una operación para remover el útero (histerectomía), para prevenir que el cáncer invada otras partes del cuerpo. A veces, los nódulos linfáticos en el área de la pelvis también son removidos. A esta operación se le llama histerectomía radical. Pero si el cáncer ha invadido otras áreas fuera del cérvix, el tratamiento usualmente es la radiación. (Tak *et al*, 1979; Prempre, 1982; Lazcano *et al*, 1999).

Cuando el cáncer se ha vuelto invasivo, las posibilidades de sobrevivencia son casi nulas, sin embargo para que se de este proceso, las células tumorales tienen que escapar a los controles normales del ciclo celular, estimular la formación de vasos sanguíneos, abandonar el sitio de origen para implantarse en otros órganos o tejidos y desarrollar mecanismos que les permiten evadir la vigilancia del sistema inmunológico, todo esto lo logran a través de la adquisición de características especiales que les confieren ventajas selectivas sobre el resto de las células del organismo, y en donde las citocinas y factores de crecimiento juegan un papel fundamental.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento se han descrito como reguladores de actividades homeostáticas fundamentales del organismo, destacando el grupo de las hormonas y el de las citocinas. No obstante, estas últimas, ejercen un mayor espectro de actividades biológicas debido a que controlan funciones tales como comunicación, diferenciación, activación, migración, motilidad, inhibición y/o proliferación de varios tipos celulares; participan en importantes procesos

inflamatorios; en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune y la hematopoyesis; en la comunicación neuroendócrina e inmunológica; en la segmentación, gastrulación y organogénesis durante el desarrollo embrionario; así como en la sustitución/reposición celular de tejido senescente o dañado (Mire-Sluis *et al*, 1998; Espinosa *et al*, 2001; Lagman, 2001; Chen *et al*, 2002). Tales moduladores biológicos, ejercen su actividad de manera autócrina, parácrina o endócrina; intervienen en una fase determinada del ciclo celular (por lo general en la fase G1); comúnmente presentan actividad pleiotrópica, redundante y sinérgica; circulan por los fluidos corporales, tienen un tiempo de vida media muy corta; y ejercen su actividad efectora sobre aquellas células blanco, las cuales expresan en su membrana receptores específicos de alta afinidad (Alberts *et al*, 1996; Bendzten, 1994; Santos, 1994; Abbas *et al*, 2000; Janeway, 2001). Es también reconocido el importante papel que juegan las citocinas durante el proceso tumoral, e incluso se ha demostrado que algunos tipos de cáncer aumentan la secreción de algunas citocinas para favorecer su desarrollo (Wright *et al*, 1996; Scout *et al*, 1986) (Tabla 1).

CITOCINA	CANCER EN EL QUE HAN REPORTADO
IL-1	Carcinoma gástrico,
IL-4	CaCu, cáncer de mama, cáncer de ovario.
IL-6	Carcinoma gástrico.
IL-8	Cáncer de cabeza y cuello.
IL-10	Carcinoma renal, CaCu.
IL-12	CaCu, Carcinoma epidermal.
TNF- α	Cáncer de mama, cáncer de pulmón.
VEGF	Cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, CaCu.
FGF	Cáncer de pulmón, carcinoma pancreático, CaCu.
EGF	Cáncer de cabeza y cuello.
TGF- β	CaCu, cáncer de mama, carcinoma gástrico, cáncer de ovario

Tabla 1. Citocinas que aumentan su expresión en algunos tipos de cáncer

De entre la extensa diversidad de factores de crecimiento conocidos y de los que se sabe aumenta su expresión durante el desarrollo del cáncer, hoy en día, el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), ha despertado un fuerte interés debido a que es una de las principales moléculas en controlar importantes procesos fisiológicos celulares entre los que se incluyen la proliferación, diferenciación, sobrevivencia celular, migración, angiogénesis y regulación inmunológica, además de que ciertas alteraciones en su vía de transducción de señal se han asociado a fenómenos de proliferación e inhibición en diversos tipos de cáncer (Elliot *et al*, 2005).

EL TGF- β

El TGF- β es considerado como un regulador general de las actividades celulares con múltiples efectos biológicos, cuyo estudio ha permitido entender muchos de los mecanismos que regulan las diferentes funciones celulares. La actividad del TGF- β fue originalmente descubierta en el medio condicionado de células de ratón transformadas con el virus del sarcoma murino de Moloney, en donde se encontró que el medio condicionado podía inducir adhesión al sustrato de tales células independientemente de su crecimiento (De Larco, 1978). Sin embargo, actualmente se sabe que es sintetizado por una amplia gama de tipos celulares y que es una citocina multifuncional.

Se han descrito varias isoformas para el TGF- β denominadas TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, y TGF- β 5, las cuales poseen un 70-80% de homología estructural entre ellas (Kloen *et al*, 1997; Peralta *et al*, 2001; Kimura *et al*, 1999). Las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 provienen de células de mamíferos y se codifican en los cromosomas humanos 19q13, 1q41, y 14q24, respectivamente. El TGF- β 4 se ha encontrado en aves y el TGF- β 5 en anfibios; adicionalmente se ha descrito el heterodímero TGF- β 1.2 en plaquetas de porcinos (Bowcock *et al*, 1998; Fortunel *et al*, 2000; Peralta *et al*, 2001). De todas estas la que más se ha estudiado y a la que se le refiere simplemente como TGF- β es la isoforma TGF- β 1.

La proteína bioactiva del TGF- β consta de un homodímero constituido por un par de cadenas de 112 residuos de aminoácidos unidas a través de un puente disulfuro; presentando así, una masa molecular neta de 25 kDa (Figura 1) (Meager, 1991; Karp, 1996; Margni, 1996; Fortunel, 2000). La masa molecular del monómero del TGF- β es de 12.5 kDa (Peralta *et al*, 2001).

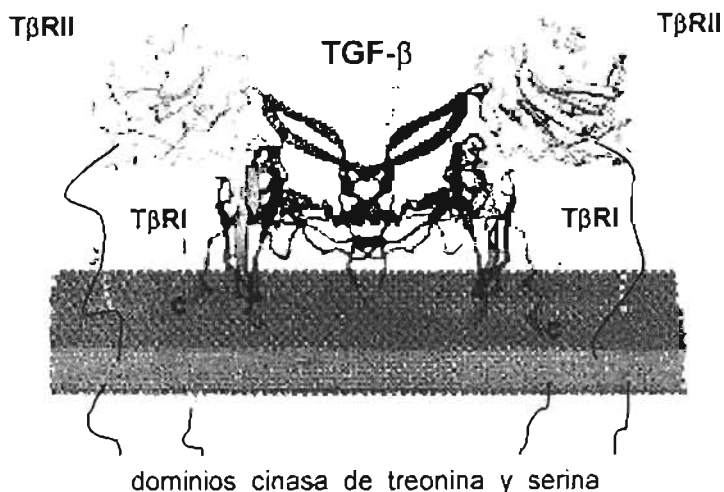


Figura 1. Modelo que representa la estructura del TGF- β , unido a sus receptores T β R1 y T β R2 en la membrana celular. El TGF- β se constituye por un homodímero de 25 kDa unido por enlaces disulfuro que al unirse a sus receptores proteínas cinasas de treonina y serina de tipo I y tipo II en la superficie celular, inicia su mecanismo de transducción de señal (Modificado de Yigong *et al*, 2003).

Síntesis del TGF- β

El TGF- β es secretado en forma inactiva o latente como una Pre-pro-TGF- β de aproximadamente 390aa, requiriendo de un proceso de dos pasos que incluyen rompimiento proteolítico para convertirse en una proteína madura. Una vez que se ha sintetizado y procesado, el TGF- β es secretado por las células como complejos latentes carentes de actividad biológica. Se han descrito dos formas de complejos latentes, el "pequeño" y el "largo". En el complejo latente pequeño, una molécula madura de TGF- β se haya asociada por interacciones no covalentes, con el dímero pro-péptido, llamado Péptido Asociado a la Latencia (LAP); en el complejo latente largo, LAP está unido por puentes disulfuro, a

proteínas que se unen al TGF- β latente (LTBPs). Las LTBPs confieren la cualidad del complejo TGF β -LAP-LTBPs de asociarse con la matriz extracelular, permitiéndole almacenarse ahí. Debido a que existen varias isoformas de LTBPs, la biodisponibilidad del TGF- β frente a sus blancos específicos, difieren entre los diferentes órganos, lo que sugiere que las LTBPs se regula por lo formación de distintos tipos de complejos largos (Fortunel *et al*, 2000).

La activación extracelular de los complejos latentes del TGF- β y con ello, la adquisición de la actividad biológica, ocurre de la siguiente forma: La interacción entre el TGF- β y LAP es no covalente, por lo que puede ser roto *in vitro* con calor y acidificación. La liberación del TGF- β a nivel extracelular ocurre por el receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II/fosfatasa-6-manosa (M6P/IGF2) (Buenemann *et al*, 2001). Otras proteasas pueden intervenir en la fragmentación del complejo TGF- β -LAP tales como la plasmina, trombina, transglutaminasa plasmática y endoglicosilasas, o por interacciones físicas del LAP con otras proteínas como la trombospondina-1 (Verrecchia *et al*, 2002).

Transducción de señales inducidas por el TGF- β

Existen tres receptores en la superficie celular para el TGF- β , el T β RI, el T β RII, y el T β RIII. El más abundante es el T β RIII y su función es facilitar la unión del TGF- β a la superficie celular y transferirlo a los receptores T β RI y T β RII que se van a encargar de la transducción de la señal, ya que él no interviene en la señalización (Frazén *et al*, 1993). El T β RI y T β RII son proteínas cinasas de treonina y serina que contienen un ligando extracelular, un dominio transmembranal y un dominio cinasa de treonina y serina citoplasmático (Figura 1). Una vez que el TGF- β se une a su ligando T β RII, induce la formación de un complejo heteromérico T β RI/ T β RII (Cheifetz *et al*, 1987; López *et al*, 1991).

Formado este complejo heteromérico, el T β RII fosforila al T β RI activando su dominio cinasa y una vez activado reconoce y fosforila a las Smad2 y Smad3 (Mire *et al*, 1998; Bristow *et al*, 1999; Padgett, 1999; Lin *et al*, 1992). Las proteínas

Smad son una familia de factores de transcripción que tienen la habilidad de propagar las señales desde un receptor hasta el núcleo y que se han encontrado presentes en vertebrados, insectos y nemátodos (Massagué, 2000). Actualmente las Smads se consideran como los sustratos de los receptores a través de los cuales, se propaga la transducción de señales del TGF- β (Vogel, 1999; Massagué, 2000). Las Smads convencionalmente se han clasificado en tres distintas clases funcionales: La primera clase de Smads, consiste en aquellas encargadas de regular el receptor o R-Smads (Smads 1, 2, 3, 5 y 8) las cuales son directamente fosforiladas por el T β RI sobre dos serinas conservadas en el extremo COOH-terminal. La fosforilación de R-Smads conduce a varias funciones en esta ruta: la liberación del complejo TGF- β -T β RI-T β RII-Smad, así como de la proteína SARA [una proteína que recluta Smads hacia la membrana]; y estimula a las R-Smads a acumularse en el núcleo como un complejo heteromérico, con la segunda clase de Smads, las Co-Smads, teniendo como único miembro a la Smad4 (Kretzschmar *et al*, 1998; Attisano *et al*, 2002). Ya en el núcleo, las Smads se asocian con uno de los muchos sitios de unión del ADN, en el que varios cofactores transcripcionales, regulan positiva/negativamente la expresión de genes. En contraste, la tercera clase de Smads, las I-Smads (Smads6, y 7), contrarrestan los efectos de las R-Smads, antagonizando así la señalización del TGF β generando un efecto negativo en la proliferación celular, por lo que una inactivación de esta ruta contribuye a la tumorigénesis; Smurf, por su parte, es una proteína capaz de unirse a las I-Smads facilitando su degradación por el proteosoma privilegiando la unión de las R-Smads con el receptor produciendo un efecto positivo (Figura 2), (Massagué, 2000; Attisano *et al*, 2002; Yigong *et al*, 2003). A la fecha se han descrito diversas moléculas que intervienen en la regulación negativa del TGF- β , algunas de ellas se describen a continuación: la inmunofilina FKBP12 se une al T β RI previniendo su fosforilación y de este modo inhibiendo su función aunque éste pueda seguir asociándose al T β RII (Chen *et al*, 1999). BAMBI es una proteína transmembranal relacionada con la familia de receptores para el TGF- β pero que carece de un dominio cinasa intracelular. Esta proteína se asocia establemente con la familia de receptores para el TGF- β ; sin

embargo no es capaz de translucir la señal, de este modo simula la dimerización del T β RI y previene la formación del complejo receptor (Onichtchouk *et al*, 1999). La Smad 7 por su parte, interactúa establemente con el T β RI activado previniendo la asociación, fosforilación y activación de las R-Smads (Hayashi *et al*, 1997, Nakao *et al*, 1997) STRAP es una proteína recientemente identificada que recluta a Smad7 hacia el T β RI activado formando un complejo estable y previniendo el acceso de Smad2 y Smad3 con su receptor (Datta *et al*, 2000). TRAP-1 es una proteína intracelular que se une al T β RI activado y previene su señalización (Charge *et al*, 1998). Finalmente las mutaciones en diversas moléculas como Smad3 y Smad4 inactivan la señalización del TGF- β (Xu *et al*, 2000).

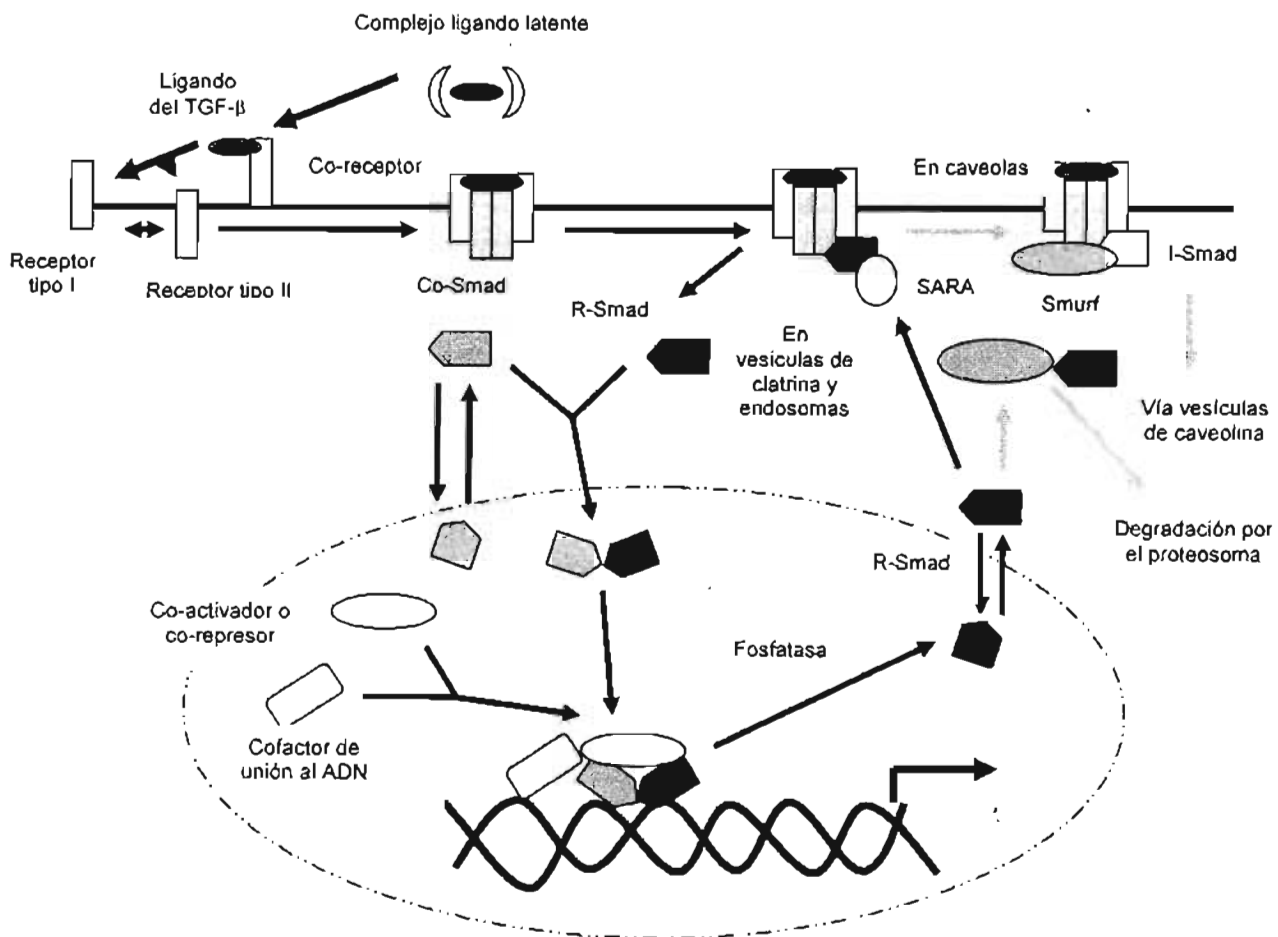


Figura 2. El TGF- β al unirse a sus receptores transmembranales, los induce a asociarse. El receptor tipo II fosforila el dominio cinasa del receptor tipo I el cual propaga entonces la señal a través de una serie de fosforilaciones sobre las proteínas Smad. Ya en el núcleo, las Smads se asocian con uno de los muchos sitios de unión del ADN, en el que varios cofactores transcripcionales, regulan positiva/negativamente la expresión de genes (Modificado de Yigong *et al*, 2003).

Actividades biológicas del TGF- β

El TGF- β es una citocina multifuncional pleiotrópica caracterizada principalmente por su actividad anti-inflamatoria e inmunoreguladora (Richards *et al*, 1998). Se encuentra en una amplia variedad de tejidos fetales y adultos, así como en el suero; las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, solo se encuentran en tejidos de los mamíferos (Kloen, 1997). Las fuentes celulares del TGF- β son: los linfocitos, los osteoblastos, las células endoteliales, los fibroblastos, los queratinocitos, las plaquetas, las células de Sertoli, los macrófagos, las células leucémicas; en tejidos se encuentra en el pulmón, el riñón, la placenta y en el cordón umbilical y se halla en altas concentraciones en el hueso y el bazo (Meager, 1991; Mire *et al*, 1998).

El TGF- β tiene acciones diversas y efectos opuestos dependiendo del tipo celular y condiciones microambientales; es capaz de inducir la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis, la producción/degradación de la matriz extracelular e inhibir la formación de placas arteroescleróticas (Bollar *et al*, 2000; Fahey *et al*, 2001; Feldmann *et al*, 2002). El uso clínico del TGF- β , provoca efectos adversos como fibrosis en la piel, hígado, riñón y pulmón (Fahey *et al*, 2001). Es un regulador negativo del ciclo celular por excelencia, en una extensa variedad de tipos celulares normales y tumorales frenando el ciclo celular generalmente en la fase G1 (Alexandrow *et al*, 1995). Es un potente inhibidor de la proliferación de células de origen mieloide, actúa sobre los monocitos-macrófagos promoviendo su quimiotaxis e inhibiendo o estimulando la secreción de citocinas, suprime la hematopoyesis dependiente de IL-3 (Fortunel *et al*, 2000; Peralta *et al*, 2001). Paradójicamente, el TGF- β fomenta el crecimiento tisular y la morfogénesis durante el desarrollo embrionario (Chen *et al*, 2002). Adicionalmente, se ha descrito la capacidad del TGF- β de inducir la quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos, células Mast y fibroblastos. Finalmente, se ha demostrado que las células mononucleares de sangre periférica provenientes de individuos infectados con el HIV (virus de la inmunodeficiencia

humana), son capaces de sobre-expresar el TGF- β lo que resalta su poderoso papel inhibitor (Richards *et al*, 1998).

EL TGF- β Y EL CANCER

En los tejidos normales los mecanismos que permiten a una célula entrar al ciclo celular y transitar a través de él hasta su división, dependen de un estricto balance entre las diversas señales estimulantes o mitogénicas y las inhibitorias que recibe de su microambiente. El TGF- β es una potente citocina capaz de producir señales al microambiente celular para que la célula se detenga en alguna parte del ciclo, contrarrestando de este modo los efectos que pueden producir diversos factores de crecimiento (Masague, 1998; Reiss, 1999).

Una característica fundamental de la célula tumoral, es su habilidad de transitar a través del ciclo celular de manera independiente a los controles normales que le impone el organismo, sin embargo, esta característica no es suficiente para la transformación neoplásica, sino que se deben adquirir otras ventajas selectivas que les permita sobrevivir y en ese sentido el TGF- β puede representar un mecanismo importante para completar dicha transformación (Sporn *et al*, 1989; Markowitz *et al*, 1996; Beverly, 2001; Kim *et al*, 1999; Pasche, 2001).

A la fecha se ha demostrado que algunas líneas celulares infectadas con virus como el citomegalovirus y el HPV son directamente activadas por la presencia del virus a producir TGF- β quizás como una respuesta fisiológica para contrarrestar los efectos de una proliferación excesiva (Corcione *et al*, 1993; Cupp *et al*, 1993; Michelson *et al*, 1994; Cayrol *et al*, 1995; Schultz-Cherry *et al*, 1996). Sin embargo, el virus le provee a la célula infectada ciertas propiedades que le permiten escapar a dicho control. Adicionalmente numerosos estudios muestran que la concentración del TGF- β en tejidos tumorales como en el cáncer de mama, carcinoma gástrico, cáncer de colon, cáncer de próstata y de endometrio, entre otros, es mayor que en tejidos normales y además esta concentración aumenta de forma proporcional con el avance de la enfermedad (Travers *et al*, 1988; Walker *et al*, 1992; Kai *et al*, 1996; Picon *et al*, 1998; Merz *et al*, 1994; Gold *et al*, 1994).

Del mismo modo, el epitelio normal de cérvix uterino expresa la mitad del TGF- β que un cáncer *in situ* y la cuarta parte que un carcinoma invasivo, sugiriendo que las células de carcinoma cervical van aumentando la secreción de TGF- β conforme se van transformando en carcinoma invasivo (Kloen *et al*, 1997). Esto sugiere entonces, que el incremento en la secreción del TGF- β en el cáncer, está directamente relacionado con la progresión del tumor y que de alguna forma le confiere ventajas selectivas sobre las células normales.

Por otro lado, se han estudiado diferentes mecanismos a través de los cuales se podría explicar como el TGF- β podría proporcionar estas ventajas selectivas. Algunos estudios han mostrado que el TGF- β es capaz de aumentar las propiedades invasivas en algunas células, por ejemplo, las células provenientes de cáncer de mama que han sido expuestas al TGF- β *in vitro* fueron significativamente más tumorigénicas que las no tratadas cuando fueron inyectadas en ratones desnudos (Welch *et al*, 1990), del mismo modo Arrick (1992), muestra que en líneas celulares transfectadas con un vector que expresa TGF- β , se observa un incremento en la adhesividad *in vitro* así como el aumento del potencial tumorigénico en ratones desnudos (Arrick *et al*, 1992). Estos trabajos nos indican que el TGF- β es capaz de facilitar la invasión de células tumorales y la metástasis, no solo aumentando la adhesividad celular, sino probablemente inhibiendo la respuesta inmunológica (Figura 3).

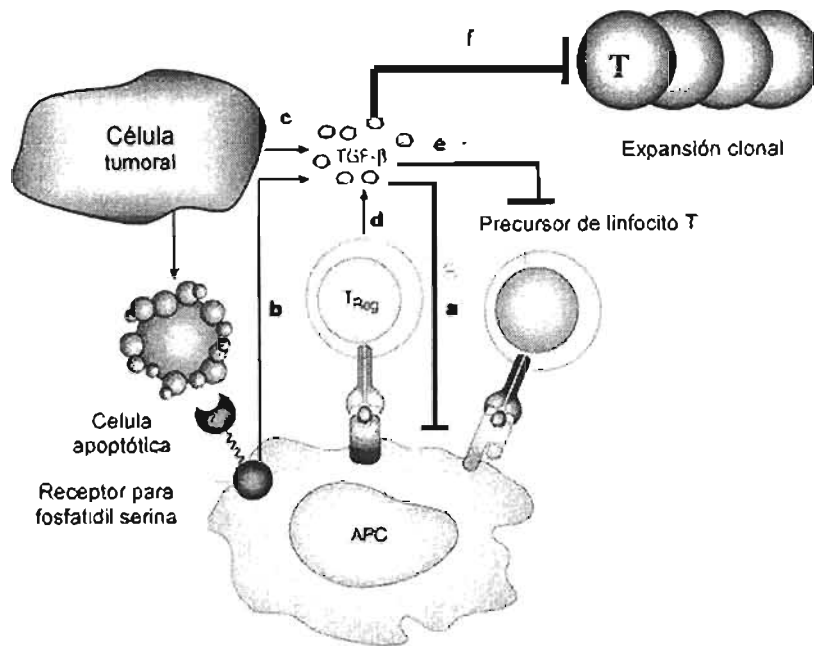


Figura 3. El TGF- β producido por diferentes tipos celulares como las células T reguladoras (d), células apoptóticas (b) o células tumorales (c) es capaz de inhibir la activación de las células T (f), a las células presentadoras de antígeno (a) así como la diferenciación de los precusores de los linfocitos T citotóxicos (CTLp) hacia células efectoras (e) (Modificado de Gorelik *et al*, 2002)

También se sabe que durante el desarrollo embrionario, el TGF- β juega un papel fundamental en la vasculogénesis (Dickson *et al*, 1995; Oshima *et al*, 1996; Bredow *et al*, 2000; Fidler, 2000) y se ha mostrado que induce la angiogénesis en diferentes ensayos *in vivo*, además de que en algunos casos este efecto puede ser bloqueado cuando se administran anticuerpos neutralizantes contra el mismo (Pepper, 1997). En el caso del cáncer, se ha encontrado que en regiones donde se tiene una densidad de microvasos sanguíneos las concentraciones del TGF- β son altas tanto en cáncer de mama, cáncer de ovario y carcinoma gástrico (De Jong *et al*, 1998; Nakanishi *et al*, 1997; Choi *et al*, 1997). Esta evidencia puede fortalecer la idea de que el TGF- β puede estar involucrado en la angiogénesis tumoral.

Una pregunta importante por resolver es: ¿Cómo le hace la célula tumoral para no responder a la inhibición que el TGF- β produce en células normales?. En realidad es muy difícil medir la respuesta celular al TGF- β en organismos intactos. Sin embargo, extensos estudios *in vitro* han demostrado que los cultivos primarios

de carcinomas, melanomas y cánceres linfoides son sensibles al TGF- β y solo adquieren resistencia después de prolongados periodos de cultivo (Rodeck *et al*, 1994; Hurteau *et al*, 1994; Havrilesky *et al*, 1995), lo que indica que dentro del cultivo el TGF- β realiza una importante selección clonal. Otros trabajos experimentales han proporcionado también información aunque de forma indirecta, que *in vivo* la resistencia contra el TGF- β solo se adquiere en etapas relativamente tardías de la carcinogénesis (Haddow *et al*, 1991; Mísero *et al*, 1991; Manning *et al*, 1991; Hague *et al*, 1993; De Geest *et al*, 1994). Ya en estudios posteriores sobre estos fenotipos resistentes, se han encontrado mutaciones que inducen la pérdida de la expresión de importantes moléculas que intervienen en la transducción de la señal de esta molécula como son los receptores T β RI, T β RII (Guo *et al*, 1997; Lu *et al*, 1997; Kimch *et al*, 1988; Baldwin *et al*, 1996; Kretzschmar *et al*, 1999) y las proteínas Smad (Derynck *et al*, 1996; Wieser, 2001; Macias-Silva *et al*, 1996; Hayashi *et al*, 1997; Derynck *et al*, 1998), por lo que no responden al efecto del TGF- β . En el caso del CaCu se ha encontrado una disminución de la expresión de los receptores T β RI y T β RII hasta en un 80% además de sus mutaciones, así como inestabilidad de los microsátélites en un 5%, lo que lleva a estas células a una pérdida gradual de la respuesta ante el TGF- β (De Gees *et al*, 1994; Larson *et al*, 1996; Ou *et al*, 1999; Chu *et al*, 1999; Okamoto *et al*, 1994).

EL SISTEMA INMUNOLÓGICO Y EL CÁNCER

El cuerpo humano tiene muchas maneras de protegerse a sí mismo; algunas son solamente barreras físicas o sustancias bioquímicas que pueden proporcionar protección relativa contra una gama amplia de microorganismos, pero las estrategias de defensa que son por mucho las más complejas, dinámicas y eficaces son realizadas por células especializadas que se desplazan a través del cuerpo para buscar y destruir microorganismos y otras sustancias extrañas. Hay tres grupos principales de células que proporcionan este tipo de defensa, los neutrófilos, la serie de monocitos macrófagos y el los linfocitos, los cuales

participan en un número considerable de mecanismos de protección que se conocen colectivamente como respuesta inmunitaria (Abbas *et al*, 2000; Roitt *et al*, 2003).

Los linfocitos pueden dividirse en tres líneas principales: las células T (derivadas de timo), las células B (derivadas de la médula ósea) y las células NK. Las células T y B se originan de un subgrupo de células madre hematopoyéticas en la médula ósea o en el hígado fetal. El desarrollo del linfocito B humano se lleva a cabo en su totalidad dentro de la médula ósea, las células T se desarrollan a partir de precursores inmaduros que abandonan la médula ósea y se desplazan a través de la corriente circulatoria hasta el timo, donde proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros (Roitt *et al*, 2003). La característica definitoria de la línea de células B es su capacidad para sintetizar proteínas llamadas inmunoglobulinas a la sangre y otros líquidos corporales, también pueden funcionar como células presentadoras de antígeno al transformar y mostrar las sustancias extrañas de manera que los linfocitos T puedan reconocerlas, además, las células B activadas pueden secretar ciertas linfocinas y otros factores que influyen en el crecimiento y las actividades de otras células inmunológicamente importantes (Abbas *et al*, 2000). Los linfocitos T por su parte, no expresan inmunoglobulinas, pero en vez de esto, detectan la presencia de sustancias extrañas por medio de proteínas de superficie llamadas receptores de células T. Este tipo de linfocito reconoce una proteína extraña solo si ésta primero se divide en péptidos pequeños que luego se muestran sobre la superficie de una segunda célula huésped llamada célula de presentación de antígeno; dicha presentación depende en parte de proteínas específicas llamadas proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la superficie de las células de presentación (Roitt *et al*, 2003).

La respuesta inmunitaria puede empezar sólo después de que el inmunógeno ha sido capturado, procesado y presentado por las células presentadoras de antígeno (APC), ya que las células T solo reconocen inmunógenos que están unidos a proteínas del CMH en las superficies de las células. Hay dos clases de proteínas de CMH cada una de las cuales es reconocida por uno de los dos grupos principales de linfocitos T. Las proteínas del

CMH clase I son expresadas por prácticamente todos los tipos de células somáticas y se usan para presentar sustancias a las células T CD8+. Las proteínas del CMH clase II son expresadas únicamente por macrófagos y algunos otros tipos celulares y son necesarias para la presentación de antígenos a células T CD4+. Los inmunógenos que son capturados por una APC quedan encerrados en el citoplasma dentro de vesículas recubiertas de membrana en donde sufren una serie de alteraciones llamadas procesamiento del antígeno que lo rompe en péptidos cortos que se transportan a la superficie celular donde pueden ser detectados por las células T cooperadoras (TH) necesarias para la activación de las células T citotóxicas (TC) y células secretoras de anticuerpos. Las células TH activadas secretan citocinas que promueven crecimiento, diferenciación y funciones de células B, macrófagos y otros tipos celulares. Las células TC ya activadas liberan toxinas específicas sobre las células blanco provocando su muerte (Gavin *et al*, 2003).

En el cáncer, la presencia de linfocitos infiltrados del tumor (TIL) se considera como un parámetro de pronóstico favorable para el paciente que padece cáncer. No obstante, la mayoría de los estudios han revelado que el aislado fresco de TIL es incapaz de matar tumores autólogos pareciendo ser inmunológicamente no responsivos. Sin embargo, su estimulación *in vitro* activa la respuesta citotóxica contra el tumor autólogo, sugiriendo que existen factores dentro del microambiente tumoral, responsables de su incompetitividad (Ortegel *et al*, 2002). Las citocinas presentes dentro del microambiente tumoral influyen en el crecimiento y sobrevivencia del tumor. El perfil de citocinas tipo I, el IFN γ y la IL-2, asociadas a una respuesta inmune celular, atenúan el crecimiento tumoral (Santín, 2001). En tanto, el perfil de las citocinas tipo II, IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10 las cuales están asociadas a una respuesta inmune humoral, son capaces de disminuir una respuesta inmune antitumoral (Ortegel *et al*, 2002).

El reclutamiento y la acumulación de altas concentraciones de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ activados por su antígeno, en el tumor cervical, puede representar una barrera local para evitar la diseminación neoplásica. Aunque las interacciones entre el sistema inmune del hospedero y las células infectadas con HPV todavía

no está completamente comprendido, varias observaciones han sugerido que una respuesta inmune celular es crucial en controlar tanto las infecciones por HPV así como su progresión cuando existen células ya infectadas (Santin, 2001). Lo anterior se sustenta en que hay una alta incidencia de cánceres genitales asociados con inmunosupresión; los TIL TCD4⁺ y TCD8⁺ han estado involucrados en regresión espontánea de verrugas asociadas al HPV y al inmunizar un animal, se ha demostrado que éstos se protegen contra infecciones del HPV así como de transplantes de células portadoras del HPV capaces de expresar las proteínas virales E6 y E7 (Santin, 2001).

Hay evidencias importantes que indican que las verrugas y las neoplasias asociadas al HPV ocurren con mayor frecuencia en la población con depresión de la inmunidad celular, en pacientes receptores de transplantes de órganos, con terapia inmunosupresora, pacientes con SIDA o mujeres embarazadas. En estos pacientes, las verrugas desaparecen frecuentemente cuando la inmunosupresión disminuye o es eliminada. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con alguna lesión neoplásica asociada al HPV no tiene deprimido el sistema inmunológico a nivel sistémico y, más bien, se encuentran alteraciones en un nivel local inducidas por el HPV y otros eventos del tumor. En las etapas previas al cáncer invasor, como son el condiloma acuminado y las neoplasias preinvasoras, el sistema inmune es capaz de combatir y promover la regresión o mantener el tumor localizado. Por ejemplo, durante la regresión de las verrugas genitales se encuentra infiltrados locales de células mononucleares, incluyendo linfocitos TC, células NK y macrófagos quienes invaden la dermis y destruyen las células neoplásicas. Durante la evolución del tumor, las células tumorales adquieren 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).

EL TGF- β Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

La acción principal del TGF- β en el sistema inmunitario es inhibir la activación y proliferación de los linfocitos, también actúa sobre otras células como

los leucocitos polimorfonucleares y las células endoteliales, en gran medida para contrarrestar los efectos de las citocinas pro-inflamatorias, lo que indica que esta citocina es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria. Actualmente se reconoce que uno de los papeles fundamentales del TGF- β es su efecto antiproliferativo de las células T a través de la inhibición de la producción de la IL-2, la cual es una citocina fundamental para la proliferación de las células T a través de un mecanismo autócrino, además de su potente efecto inhibitorio en la diferenciación de las células T (Sad *et al*, 1994; Swain *et al*, 1991).

La activación de las células T vírgenes durante la respuesta inmune las conduce a su diferenciación hacia las subpoblaciones de células T efectoras con una actividad citotóxica en el caso de las células CD8+, o una función cooperadora en el caso de las células CD4+. Se ha reportado que el TGF- β es capaz de inhibir la adquisición de algunas o todas las funciones efectoras de las células T vírgenes, en el caso de CD4+, inhibe completamente la diferenciación y proliferación de las células T_{H2} (Parris, 2003; Bjorn *et al*, 2000), e inhibe la diferenciación de las células T_{H1} aun que en este caso depende de otros factores como de moléculas co-estimuladoras (Thompson *et al*, 2004).

Algunos autores han tratado de describir el mecanismo a través del cuál el TGF- β inhibe la diferenciación de células T y nos muestran que es capaz de inhibir la expresión de Gata-3, un activador transcripcional clave en el desarrollo de las células T_{H2} (Gorelik *et al*, 2000; Heath *et al*, 2000; Zheng *et al*, 1997). El mecanismo a través del cual logra inhibir a T_{H1} aun se desconoce aunque se ha encontrado que produce una disminución en la expresión de la cadena β 2 del receptor para la IL-12, bloqueando la señalización de esta molécula que es fundamental para el desarrollo de T_{H1} (Gorham *et al*, 1998; Sakaguchi, 2000).

En trabajos recientes se ha mostrado el importante papel que juega una tercera subpoblación de linfocitos T, las T_{H3} o T reguladoras (T_{Reg}). La principal población de estas células reguladoras la constituyen las células CD4+ que expresan de manera constitutiva a CD25, la cadena α para el receptor de la IL-2 (Gorelik *et al*, 2002; Shevach, 2002; Matceld, 2003). Algunos reportes indican que este tipo celular regula la respuesta inmunológica a través de un contacto

directo entre células (Horwitz *et al*, 2003; Maloy *et al*, 2002; Beacher-Allan *et al*, 2002); sin embargo, se ha presentado evidencia de que las células T_{Reg} pueden inhibir la proliferación a través de la producción de citocinas como la IL-10 y el TGF- β sin necesidad de contacto celular directo (Levings *et al*, 2002., Song *et al*, 2004; Nakamura *et al*, 2001) e inclusive que el TGF- β es capaz de cambiar el fenotipo de las células CD4+CD25- a CD25+ (Yamagiwa *et al*, 2001; WuanJun *et al*, 2003; Wahl *et al*). Lo anterior indica que posiblemente el principal mecanismo mediante el cual el TGF- β logra su importante papel inmunorregulador es favoreciendo la diferenciación de células T_{Reg} e incrementado la apoptosis en células T (WuanJun, 2001; Cerwinka *et al*, 1996), y que puede actuar no solo para mantener la homeostasis del organismo, sino que podría jugar un papel en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Figura 4).

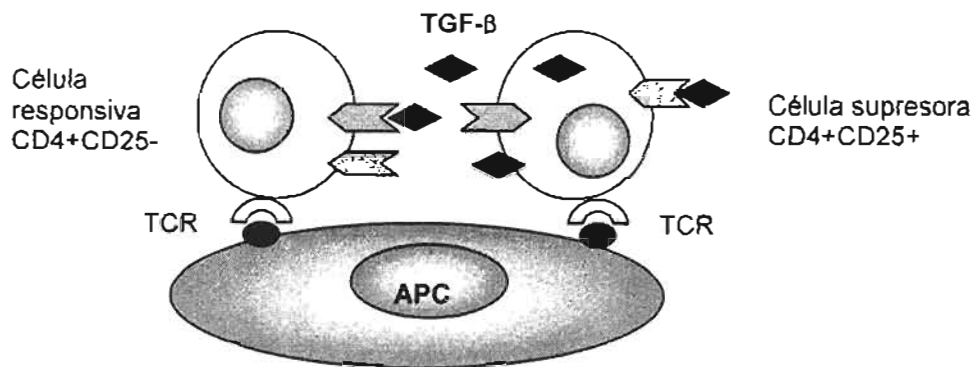


Figura 4. La principal población de células reguladoras la constituyen las células CD4+ que expresan de manera constitutiva a CD25. Algunos trabajos indican que este tipo celular regula la respuesta inmunológica a través de un contacto directo entre células o a través de la secreción de citocinas como el TGF- β .

JUSTIFICACIÓN

Actualmente en nuestro país, el cáncer cervico uterino (CaCu) es la primer causa de mortalidad en la mujer y representa uno de los problemas de salud mas importante a nivel mundial (Lazcano *et al*, 1999). La capacidad de un tumor para invadir órganos adyacentes o lejanos (metástasis), es lo que lo hace muy peligroso y difícil de erradicar, puesto que las terapias existentes parecen ser insuficientes e inadecuadas, ya que no sólo no resuelven el problema sino que demeritan la calidad de vida del paciente, lo que a llevado a la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad. A la fecha y a pesar de los esfuerzos encaminados a entender los mecanismos mediante los cuales una displasia avanza hasta convertirse en un cáncer invasivo, los resultados son insuficientes, por lo que surge la necesidad de implementar nuevos proyectos de investigación que aborden al cáncer, desde el punto de vista inmunológico, dando respuesta a preguntas tales como: ¿De qué manera las células tumorales son capaces de evadir la vigilancia inmunológica del hospedero?, ¿Cuántas y cuáles citocinas son las que intervienen en este proceso?, entre otras. Por ello, el interés de este trabajo es el de aportar información sobre si las células tumorales son capaces de evadir la vigilancia inmunológica a través de la participación de citocinas secretadas por ellas mismas, específicamente en células tumorales provenientes de CaCu, generando de este modo información que nos lleve a una mejor comprensión del desarrollo del CaCu y a largo plazo sirva para proponer nuevas y mas efectivas terapias contra esta enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que algunos tumores son capaces de secretar citocinas que les permiten favorecer su estado tumorigénico e invasivo, por lo que nos planteamos la posibilidad de que las células tumorales provenientes CaCu estén secretando una o varias citocinas que les permitan inhibir la acción de los linfocitos que actúan sobre ellas, como una estrategia para evadir al sistema inmunológico durante su desarrollo.

HIPÓTESIS:

Durante la respuesta inmunológica contra las células tumorales, intervienen tanto células linfocíticas como una gama de citocinas que regulan dicha respuesta, por lo que es posible que en el caso específico de las células tumorales de CaCu, se estén secretando citocinas que les permitan sobrevivir al ataque del sistema inmunológico del hospedero y sabiendo que el TGF- β es reconocido como un potente regulador negativo de la respuesta inmunológica, permite pensar en la posibilidad de que las células de CaCu bloqueen la respuesta inmunológica a través de la secreción del TGF- β , inhibiendo la activación y proliferación de los linfocitos que actúan contra ellas.

OBJETIVOS GENERALES:

- Determinar si las células tumorales HeLa secretan una actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH) y si dicha actividad es debida a la presencia del TGF- β .
- Determinar si las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de linfocitos de sangre periférica humana son afectadas por la AIPCLH presente en el medio condicionado (MC) de células HeLa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar si el MC de células HeLa presenta una AIPCLH
- Evaluar si la AIPCLH presenta actividad similar a la del TGF- β utilizando la línea celular Mv1Lu.
- Determinar la concentración del TGF- β presente en el MC proveniente de cultivos de la línea celular HeLa, a través de la técnica de ELISA.
- Determinar si la AIPCLH es bloqueada por un anticuerpo neutralizante contra el TGF- β .
- Determinar si el TGF- β presente en el MC de células HeLa inhibe la proliferación de la subpoblación de células linfocíticas CD4+ y CD8+.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de linfocitos humanos

Los cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana se realizaron a partir de 15 ml de sangre obtenida con una jeringa heparinizada (Heparina 5000 UI/mL, PiSA, México). En un tubo de fondo cónico de vidrio, se depositaron 5 ml de Ficoll-Hypaque (densidad de 1.077, +/- 0.001, Sigma, E.U.). Inmediatamente se agregó lentamente por la pared del tubo la sangre, de tal forma que la proporción ficoll-sangre fue de 1:1. Se centrifugó el tubo a 750 rpm durante 5 min. Al término del tiempo se aumentó la velocidad a 1500 rpm durante 25 min. más. De esta manera, las células mononucleares se separaron al centrifugarlas por gradiente de densidad. Se colectó el anillo de linfocitos con una pipeta de 5 ml (evitando extraer la fase Ficoll) se depositó en un tubo cónico de vidrio y se lavó con 10 ml de RPMI-1640. Se centrifugó a 1500 rpm/5 min, se retiró el líquido por decantación y se volvió a lavar con RPMI-1640 y centrifugó a 1500 rpm/5 min.

El botón celular se resuspendió con RPMI-1640 suplementado con 20% (v/v) de suero fetal de bovino (SFB), se vertió a una caja petri y las células se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ y humedad a punto de rocío por 1 h (con esto se adhieren al fondo de la caja los monocitos, permaneciendo en suspensión los linfocitos). Al término de este tiempo se colectó el medio, el cual contenía los linfocitos que se ocuparon para los ensayos biológicos.

Obtención del MC

Para obtener el MC de células HeLa se sembraron dichas células en RPMI 1640 al 10% V/V de SFB en cajas de tres niveles, un número celular que nos permitiera tener a las 24 h el 50% de confluencia y se mantuvieron a 37° C, con 5% de CO₂ y humedad a punto de rocío. Transcurrido éste tiempo se les retiró el medio de cultivo y se lavaron suavemente 5 veces con 5 ml de solución salina de fosfatos (PBS) hasta eliminar completamente el medio de cultivo, posteriormente se agregó RPMI libre de SFB y se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo durante 48 h mas, tiempo en el cual el cultivo llega a una etapa de

confluencia. Transcurrido este tiempo se colectó el medio de cultivo (MC) se centrifugó a 3000 rpm para retirar el detrito celular y se almacenó a 4°C en recipientes de vidrio estériles, hasta iniciar la concentración. Las células se sembraron en RPMI 1640 al 10% V/V de SFB bajo las mismas condiciones de cultivo y se utilizaron una vez más para obtener MC después de lo cual fueron desechadas.

Concentración del MC

El MC obtenido fue colectado en tubos para centrifuga de 50 ml y se concentró hasta sequedad por liofilización en un liofilizador Speed Vac (SAVANT AES2000). El concentrado fue resuspendido en 15 ml de PBS, se colocó en una bolsa de diálisis con poro de 1 kDa (Spectra/Poor MWCO 1000) y se introdujo en un recipiente con 1 litro de PBS 0.25X durante 48 h con cambios cada 8 h.

Por último, el PBS 0.25X se cambió por PBS 1X en donde se dejó dializando por otras 24 h. Una vez concluido este tiempo, el contenido de la bolsa de diálisis se recuperó en tubos Eppendorf y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C. El MC concentrado se esterilizó con una membrana de poro de 0.22 micras y se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

Evaluación de la Proliferación Celular mediante la técnica de Cristal Violeta

El colorante cristal violeta posee características alcalinas que le permiten teñir al ADN del núcleo celular. El número de núcleos con tinción aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida. Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% durante 10 min, para posteriormente ser lavadas con agua bidestilada y secadas al aire. A las placas secas se les agregó una solución de cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico (hasta cubrir completamente las células), manteniéndose en agitación durante 10 min. Una vez concluido este tiempo las placas de cultivo se lavaron exhaustivamente con agua desionizada (de manera que el colorante no incorporado fue retirado), para posteriormente secarse al aire a temperatura ambiente. A las cajas de cultivo se les añadió ácido acético al 10% (que solubiliza el colorante de los núcleos

celulares), dejando en agitación durante 20 min. Posteriormente a eso, se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA (E1 800; Bio-Tek) a 570 nm y las densidades ópticas se graficaron como el porcentaje de proliferación celular con respecto al control.

Ensayo de Proliferación con Incorporación de Timidina Tritiada

Esta evaluación consiste en la incorporación del nucleótido timidina (un análogo de la timina) marcada con tritio al ADN de las células en cultivo, cuando las células se encuentran en fase de síntesis del ciclo celular (Bulbulian, 1987; Karp, 1996).

La población celular se puso con 1 μ Ci de timidina tritiada (Amersham), al tiempo indicado para la condición planeada, las células se colectaron con una cosechadora en papel filtro cargado lavando 3 veces. Se cortó el papel filtro que contenía la marca y se depositaron en viales con 2 ml de líquido de centelleo (Beckman, E.U.) Los destellos del producto de la radiación, se amplificaron con el líquido de centelleo y la reacción se evaluó en un contador de centelleo programado para registrar emisiones β (Beckman E.U., modelo LS-6500). Las lecturas CPM (cuentas por minuto) se convirtieron a porcentaje de proliferación; los cultivos sin tratamiento (basal) representaron el 100%.

Viabilidad celular por el método de exclusión por azul tripano

El colorante azul tripano solamente es asimilado por la célula cuando ésta se encuentra deteriorada de la membrana, en cambio, las células que no lo incorporan se consideran como células viables.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos e inducidas con el MC, transcurrido el tiempo de estímulo, el sobrenadante fue retirado de los pozos y se desprendieron las células con tripsina o verseno, éstas se diluyeron 1:1 con azul tripano. Las células se contaron en una cámara de Neubauer (Boeckel Co) y el porcentaje de viabilidad se obtuvo mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Células no teñidas}}{\text{Células teñidas} + \text{células no teñidas}} \times 100$$

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se evaluó con un kit de detección de los aminoácidos cisteína, triptofano y tirosina los cuales forman un color púrpura cuando reaccionan con ácido bicinconínico (BCA) en combinación con el método de Biuret (BCA Protein Assay Reagent, PIERCE) (Smith *et al*, 1985). El color obtenido exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm y las lecturas de las muestras fueron comparadas con una curva patrón de albúmina sobre la cual se hizo la determinación.

Evaluación de la bioactividad del TGF- β en las células Mv1Lu

La línea celular Mv1Lu tiene como principal distinción, inhibir su proliferación en presencia del TGF- β (Wu *et al*, 1996), por lo que usualmente se emplea para ensayos de actividad biológica del TGF- β . Se cultivaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Nunc, Dinamarca), 5,000 células/pozo-100 μ l de RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB y estimuladas con 975 μ g/ml de proteína total contenida en el MC de células HeLa. A las 48 h de tratamiento, se evaluó la proliferación celular por tinción con cristal violeta.

Inmunoanálisis enzimático de ELISA para detectar el TGF- β 1 en los sobrenadantes

Para la detección del TGF- β 1 en los sobrenadantes de células tumorales se utilizó un kit de ELISA (Bio Source Internacional, Inc.). Para lo que se realizó una extracción de cada muestra para liberar el TGF- β que pudiera estar formando complejos latentes y quede de modo accesible para ser medido. En tubos de polipropileno se agregaron 0.25 ml del MC de células tumorales y 0.05 ml de la solución de extracción, se agitaron en un vortex y se incubaron a 4^o C durante 30 min. Después de lo cual se agregaron 0.25 ml de buffer de azida de sodio por

tubo. Posteriormente se tomaron 200 μ l de cada muestra (después de la extracción) y se colocaron en una placa de 96 pozos recubierta con el anti-TGF- β 1. agregando posteriormente 50 μ l/pozo de anti-TGF- β 1 biotinado (Conjugado con biotina) agitando gentilmente. Se cubrió la placa y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente, después de este tiempo, se eliminó la solución de los pozos y se lavó 4 veces con 400 μ l/pozo de solución de lavado y se dejó secar por 30 segundos. Se agregaron 100 μ l/pozo de solución de trabajo de Streptavidina-peroxidasa (HRP), se cubrió la placa y se incubó por 30 min más a temperatura ambiente después de lo cual se eliminó la solución y se lavó 4 veces mas con 400 μ l/pozo de solución de lavado. Posteriormente se agregaron 100 μ l/pozo de solución estabilizadora del cromógeno (el liquido de los pozos se tornó azul) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad al término del cual se adicionaron 100 μ l/pozo de solución de paro mezclando gentilmente y finalmente se leyó la placa a 450 nm en un lector de placas ELISA (EL. 800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC EU).

Evaluación de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de linfocitos por citometría de flujo

Se cultivaron 2×10^5 linfocitos/pozo-200 μ L de RPMI-1640 suplementado con 20 % (v/v) de SFB y adicionado con 15 μ g/mL de fitohemaglutinina en una placa de 96 pozos de fondo plano. Los linfocitos se trataron con diferentes concentraciones del TGF- β presente en el MC de la línea celular HeLa. A las 64 h de cultivo, se resuspendieron las células, se transfirieron a tubos eppendorf y se lavaron 2 veces con PBS centrifugando a 1500 rpm X 10 min . Se resuspendieron en 1 ml de PBS-Azida de sodio 0.2%, albumina, (BSA) 0.2% (PBA) y se centrifugaron a 1500 rpm X 10 min. Se retiró el sobrenadante hasta dejar el mínimo volumen posible y se agregaron 5 μ l de anticuerpo α CD4-Fit C (Sta. Cruz) diluido en PBA 1:5 y 5 μ l de anticuerpo α CD8-PE (Sigma) diluido en PBA 1:5 y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Una vez transcurrido el tiempo se lavaron con 1 ml de PBA y se centrifugaron a 1500 rpm. Se descartó el

sobrenadante y se resuspendieron en 0.5 ml de solución de FACS para evaluar en un citómetro de flujo (Becton Dickson).

Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo

Los linfocitos fueron cosechados y centrifugados a 1500 rpm durante 3 min y se lavaron una vez con PBS, posteriormente se fijaron con etanol al 70% en PBS. Se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 50 UI/ml de RNAsa en PBS durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se tiñeron con 20 UI/ml de ioduro de propidio (200 mg/l) en PBS durante 2 min. Se resuspendieron en PBS y se evaluaron en un citómetro de flujo (Becton Dickson).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos experimentales fueron sometidos a tres pruebas estadísticas, una denominada ANDEVA o análisis de varianza, que establece un valor medio denominado Gran Media, con una distribución de los datos de una manera normal y nos dice que tan alejados están los valores promedios de las muestras de nuestros ensayos con respecto a la Gran Media, lo que determina si la muestra presenta un comportamiento de distribución normal; la segunda prueba denominada Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher, se realiza para saber si existe diferencia significativa entre mas de dos pares de medias. Finalmente se aplicó la prueba de Tukey para determinar entre que pares de medias existía diferencia. En el caso en que se compararon dos pares de medias, el análisis se realizó mediante la prueba de "t" de Student. En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor al 0.05.

RESULTADOS

Algunos tumores son capaces de modificar su medio a través de la secreción de diversas citocinas que favorecen su proliferación, sobrevivencia y muy probablemente les ayudan a evadir la vigilancia inmunológica durante el proceso de metástasis; sin embargo, aún no se ha demostrado cuáles citocinas podrían estar interviniendo en este proceso. En el caso particular del CaCu, no se ha aclarado si estas células son capaces de secretar factores o citocinas que les permita evadir o bloquear el ataque del sistema inmune, por lo que, con el fin de determinar si las células tumorales HeLa provenientes de CaCu son capaces de secretar factores que permitan lograr esta acción, se evaluó el efecto del MC proveniente de cultivos de estas células sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana (Figura 5).

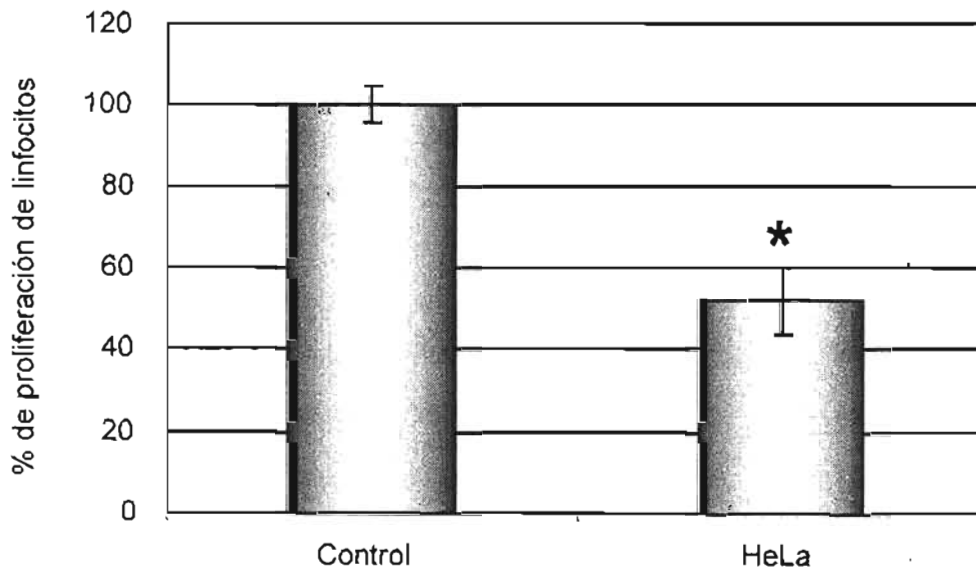


Figura 5. Efecto del MC de la línea tumoral HeLa sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y activadas con 15 μ l/ml de fitohemaglutinina (PHA), el MC de células HeLa fue puesto al momento de la siembra. Las células fueron estimuladas con 975 μ g/ml de proteína total contenida en el MC. El número celular fue evaluado por conteo directo con hemocitómetro a las 64 h.

* $p < 0.05$ vs. Control (Prueba "t" de student).

Los resultados muestran que el MC proveniente de las células tumorales HeLa, presentan una actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH) que disminuye el número de linfocitos hasta un 50%. Sin embargo, el decremento observado no explica si es debido a una muerte celular por citotoxicidad o las células solo dejan de dividirse. Para esclarecer este punto, cultivos de linfocitos fueron tratados con el MC de HeLa y la síntesis de ADN fue evaluada a través del marcaje radiactivo con timidina tritiada, como un indicativo de la duplicación del ADN y por consecuencia de la división celular (Figura 6).

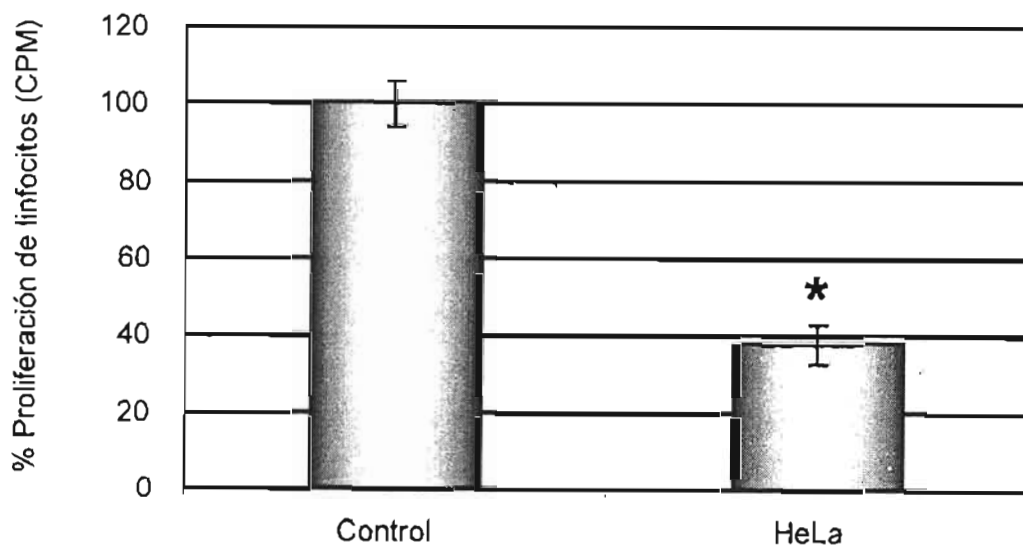


Figura 6. Efecto del MC de la línea tumoral HeLa, sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y activadas con 15 μ l/ml de PHA y el MC de células HeLa fue puesto al momento de la siembra. Las células fueron estimuladas con 975 μ g/ml de proteína total contenida en el MC. El número celular fue evaluado por incorporación de timidina tritiada a las 64 h.

* $p < 0.05$ vs. Control (Prueba "t" de student).

Estos datos nos muestran que cuando los linfocitos son tratados con el MC de HeLa se produce una disminución en la incorporación de timidina y por tanto en la síntesis del ADN, lo que indica que los linfocitos no se dividen y no proliferan, lo cual puede observarse en fotografías de los cultivos de linfocitos tratados con el MC de células HeLa (Figura 7).

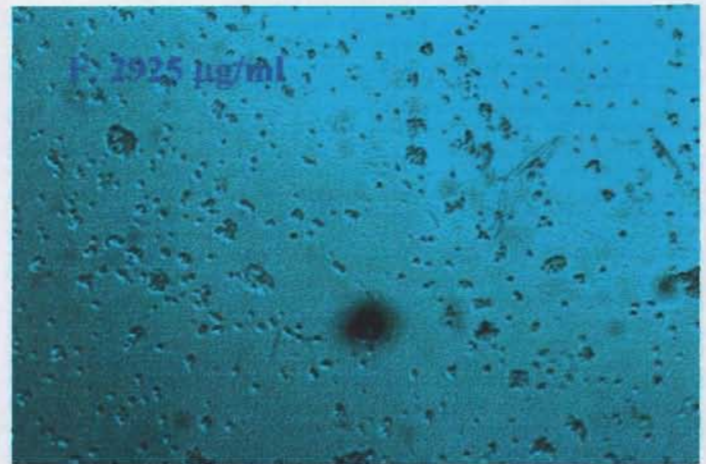
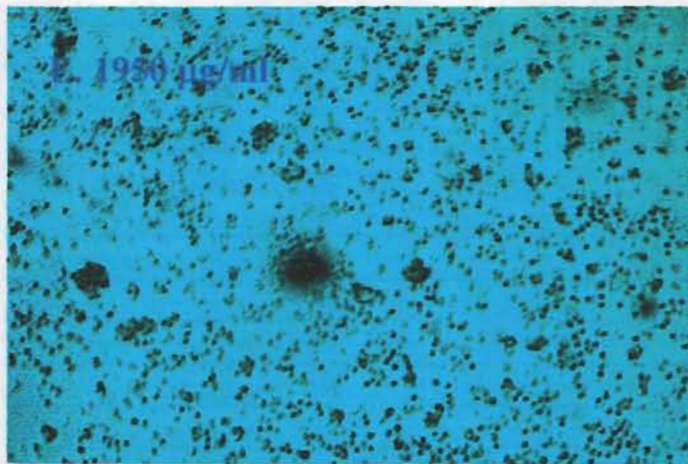
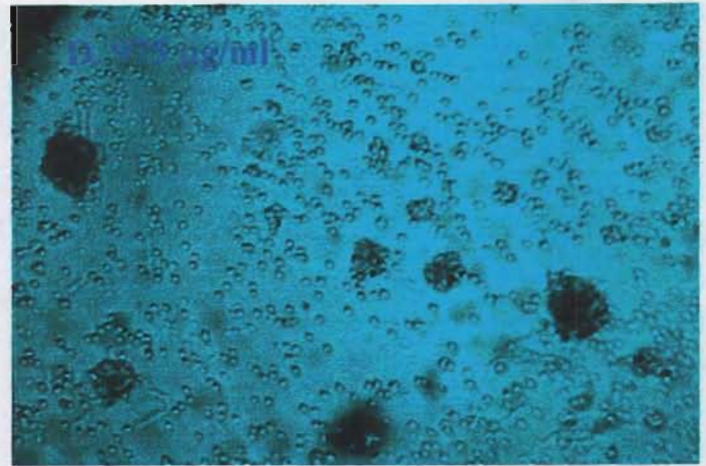
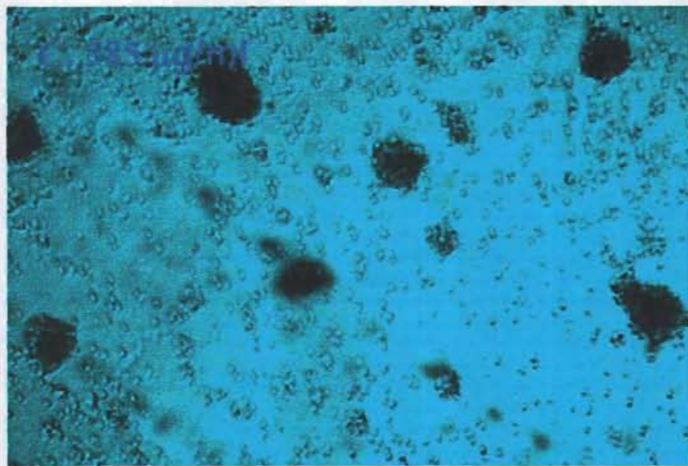
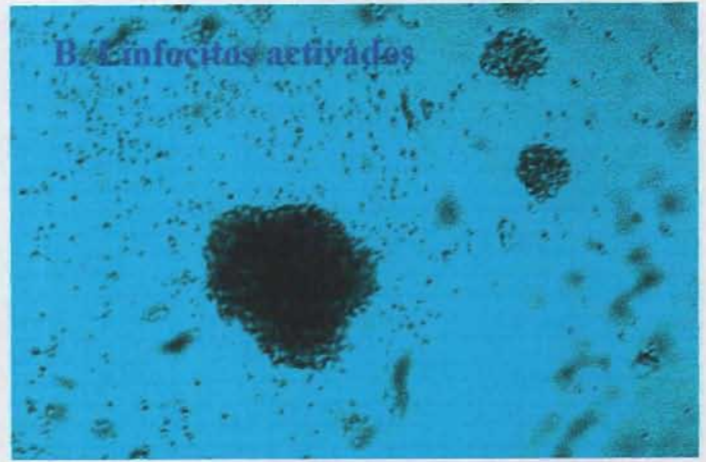


Figura 7. Efecto del MC de células HeLa en la formación de colonias de activación de linfocitos. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos y el medio condicionado fue puesto al momento de la siembra. La evaluación se realizó a las 64 h de cultivo. A. Linfocitos sin tratamiento. B. Linfocitos activados con 15 μ /ml de PHA. C, D, E y F Linfocitos con 15 μ /ml de PHA y 195, 585, 975 y 1950 μ g/ml de proteína total contenida en el MC de células HeLa, respectivamente. Las fotografías son representativas de lo observado en tres ensayos diferentes con tres repeticiones cada uno.

En las imágenes se observa que los linfocitos cuando son tratados con la fitohemaglutinina (PHA) (B), forman colonias, lo que nos indica que se han activado y están proliferando, en comparación con el cultivo que no tiene PHA en donde no se observan colonias de activación (A); Sin embargo cuando se aplica el MC de células tumorales, cambia el aspecto de las colonias de activación volviéndose mas pequeñas y a medida que se incrementa la concentración de proteína del MC, las colonias disminuyen su tamaño hasta inhibir completamente la formación de colonias al tratarlas con 1950 $\mu\text{g/ml}$ de proteína lo que sugiere un comportamiento dosis dependiente. Estos datos aunados a la disminución en el número celular e incorporación de timidina, indican que los medios condicionados provenientes de células tumorales, son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos y la duplicación de su ADN.

Una vez demostrada la presencia de la AIPCLH en los medios condicionados de células HeLa, se procedió a determinar la naturaleza química de dicha actividad. Es sabido que dentro de los medios condicionados se encuentran una gran cantidad de moléculas de diversa naturaleza química, sin embargo se ha demostrado que la mayoría de los factores de crecimiento son polipéptidos de bajo peso molecular por lo que se procedió a determinar si la AIPCLH presenta una naturaleza proteica. Al respecto, el MC fue tratado con una proteasa y de manera paralela fue calentado a diferentes temperaturas para observar si este tratamiento bloquea su actividad inhibidora, como una prueba para determinar la naturaleza proteica (Figuras 8 y 9).

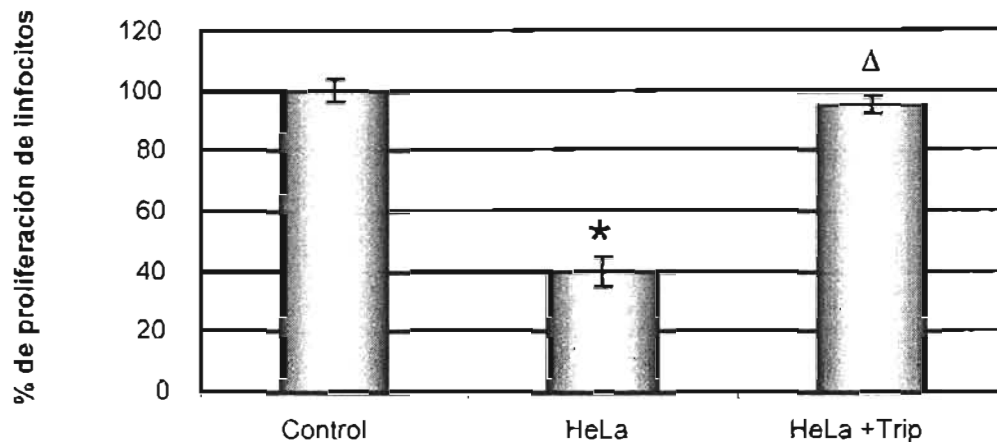


Figura 8. Efecto del MC de c3lulas HeLa incubado previamente con tripsina al 0.05% sobre el potencial proliferativo de linfocitos. Las c3lulas fueron sembradas en placas de 96 pozos, activadas con 15 μ l/ml de PHA y tratadas con 975 μ g/ml de prote3na total contenida en el MC, el cual fue incubado una hora antes de la siembra con tripsina (1:1 v/v). La evaluaci3n del n3mero celular se realiz3 a las 64 h por incorporaci3n de timidina tritiada.

$\Delta p < 0.05$ vs. HeLa (ANDEVA seguida de prueba de Tukey); * $p < 0.05$ vs. Control (prueba "t" de student).

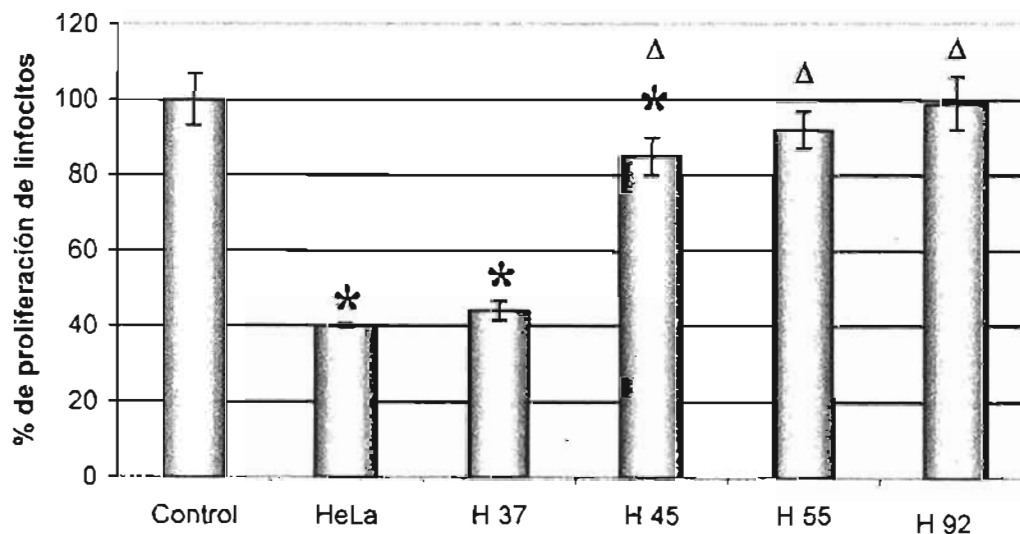


Figura 9. Efecto del MC de la l3nea tumoral HeLa sometido a calentamiento sobre el potencial proliferativo de linfocitos. Las c3lulas fueron sembradas en placas de 96 pozos, activadas con 15 μ l/ml de PHA y tratadas con 975 μ g/ml de prote3na total contenida en el MC, el cual fue previamente sometido a calentamiento a 37, 45, 55 y 92 $^{\circ}$ C durante una hora. La evaluaci3n se realiz3 a las 64 h por incorporaci3n de timidina tritiada.

$\Delta p < 0.05$ vs. HeLa (ANDEVA seguida de prueba de Tukey); * $p < 0.05$ vs. Control (prueba "t" de student).

Los datos obtenidos sugieren que la AIPCLH posee una naturaleza proteica, ya que la actividad fue bloqueada al ser tratada con la proteasa tripsina y al calentarla a más de 45 °C.

Una vez determinado que las células HeLa secretan una AIPCLH de naturaleza proteica y dado que entre las diversas citocinas producidas por algunos tumores se encuentra el TGF- β , el cual tiene un importante papel en la modulación de la respuesta inmune, (Welch *et al*, 1990 ; Arrick *et al*, 1992), surge la duda si en el CaCu esta citocina está siendo secretada y si está ejerciendo el efecto antiproliferativo sobre los linfocitos; para determinarlo, se utilizó la línea celular Mv1Lu que se sabe frena su proliferación con el TGF- β . Para ello se sembraron las células Mv1Lu en presencia del MC de células HeLa (Figura 10)

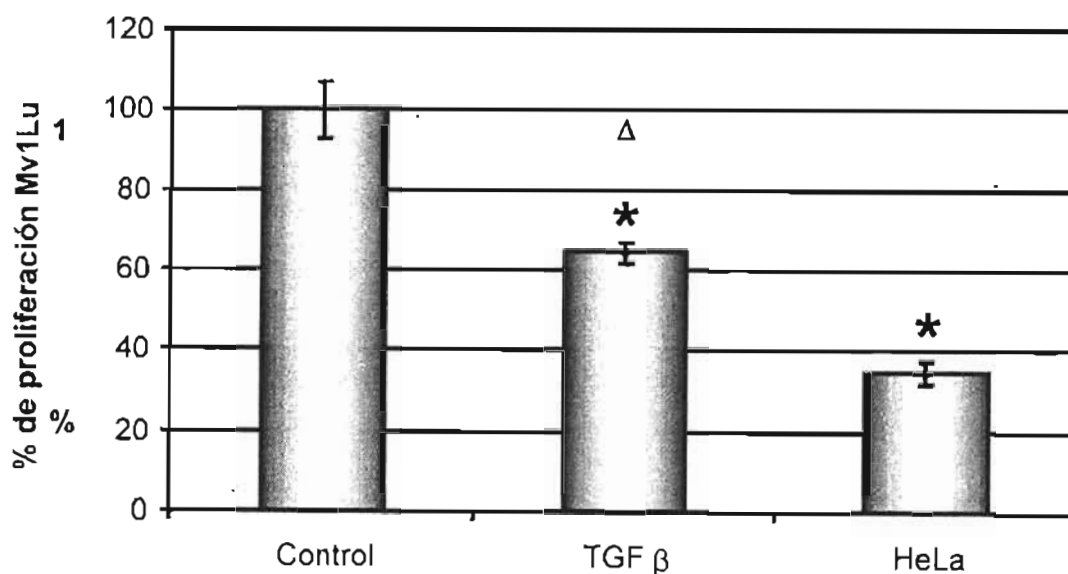


Figura 10. Determinación de la bioactividad del TGF- β soluble procedente del MC de células HeLa sobre la línea celular Mv1Lu. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos, activadas con 15 μ l/ml de PHA y tratadas con 975 μ g/ml de proteína total contenida en el MC. La evaluación se realizó a las 48 h por cristal violeta.

Δ p<0.05 vs. HeLa (ANDEVA seguida de prueba de Tukey); * p<0.05 vs. Control (prueba "t" de student).

En la figura podemos observar que la proliferación de las células Mv1Lu es inhibida en un 60 % por el MC de células HeLa, lo que nos indica la presencia del TGF- β activo y que es posible que esta citocina sea responsable de la AIPCLH

observada. Considerando esta posibilidad se procedió a determinar la concentración del TGF- β en el MC. Para ello se realizó un inmunoanálisis de ELISA para determinar la concentración del TGF- β presente en el MC (Tabla 2).

	Concentración de TGF- β
M C de Células HeLa	815pg/975 μ g de proteína total

Tabla 2. Cuantificación del TGF- β presente en el medio condicionado de células HeLa, a través de la técnica de ELISA.

La tabla nos muestra únicamente la concentración del TGF- β presente en el MC de HeLa; sin embargo, de manera paralela se realizó la misma prueba para detectar TGF- β en MC de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano como un parámetro de comparación, pero no se detectó a esta citocina en dicho MC, hecho que demuestra que estas células incrementan fuertemente la producción de esta citocina y dada su importante función inmunomoduladora, es probable que sea la responsable de la AIPCLH presente en el MC. Para corroborarlo se procedió a bloquear la actividad del TGF- β presente en el MC utilizando un anticuerpo neutralizante (Figura 11).

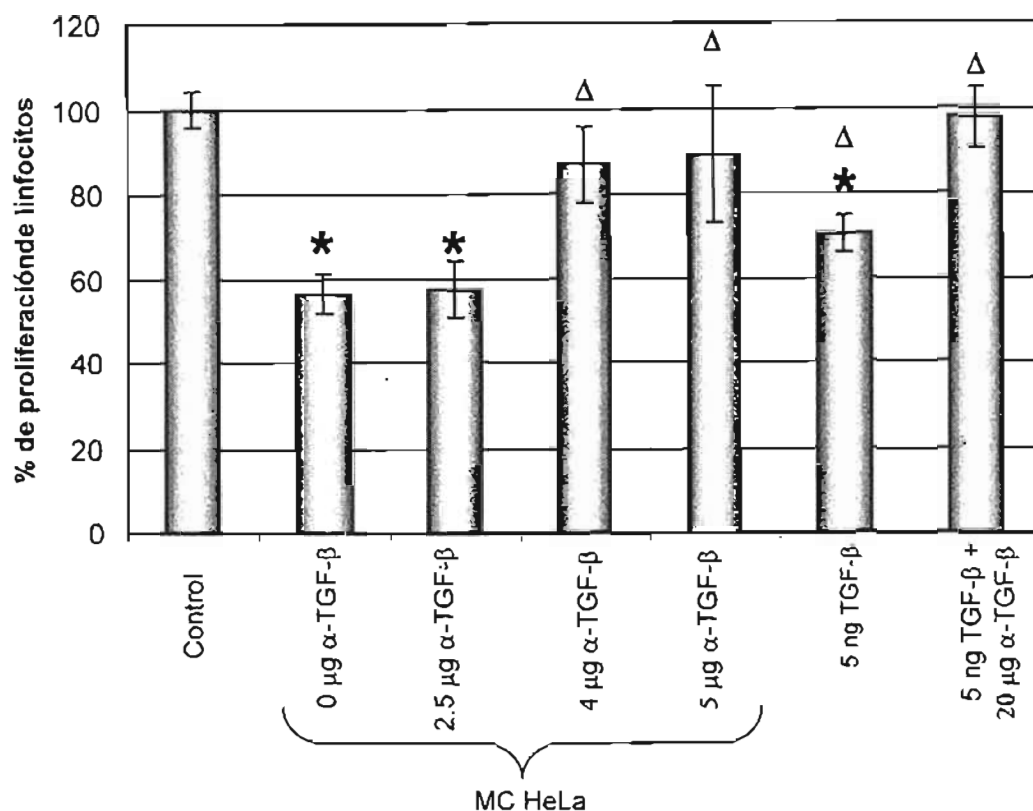


Figura 11. Efecto del MC proveniente de c3lulas HeLa sobre linfocitos de sangre perif3rica humana, asi como el bloqueo del TGF-β secretados por dichas c3lulas. Las c3lulas fueron sembradas en placas de 96 pozos, activadas con 15 μl/ml de PHA y tratadas con 815 pg/ml de TGF-β contenido en el MC de c3lulas HeLa o 5 ng de TGF-β recombinante durante 1 h y con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-TGF-β1. La evaluaci3n se realiz3 a las 64 h por incorporaci3n de timidina tritiada.

Δp<0.05 vs. HeLa (ANDEVA seguida de prueba de Tukey); * p<0.05 vs. Control (prueba "t" de student).

Los resultados muestran que en los cultivos de linfocitos tratados con el MC de c3lulas HeLa, incubados en presencia de un anticuerpo neutralizante contra el TGF-β, se logra una recuperaci3n tanto en el n3mero celular (datos no mostrados) como en la s3ntesis de ADN, lo que sugiere que la actividad de dicho medio se neutraliza completamente cuando se utiliza 4 μg/ml del anticuerpo, comport3ndose como el cultivo control, se muestra tambi3n que se presenta un efecto similar cuando se utiliza TGF-β recombinante asi como cuando este es bloqueado con el anticuerpo, hecho que muestra el importante papel que juega el TGF-β en la AIPCLH presente en el MC de c3lulas HeLa.

Cuando los cultivos son vistos al microscopio, se observa un incremento en el tama3o de las colonias de activaci3n en los que fueron tratados con el MC

de HeLa y con el TGF- β recombinante que son bloqueados con el anticuerpo neutralizante, lo que confirma que la AIPCLH se debe a la presencia del TGF- β en el MC (figura 12)

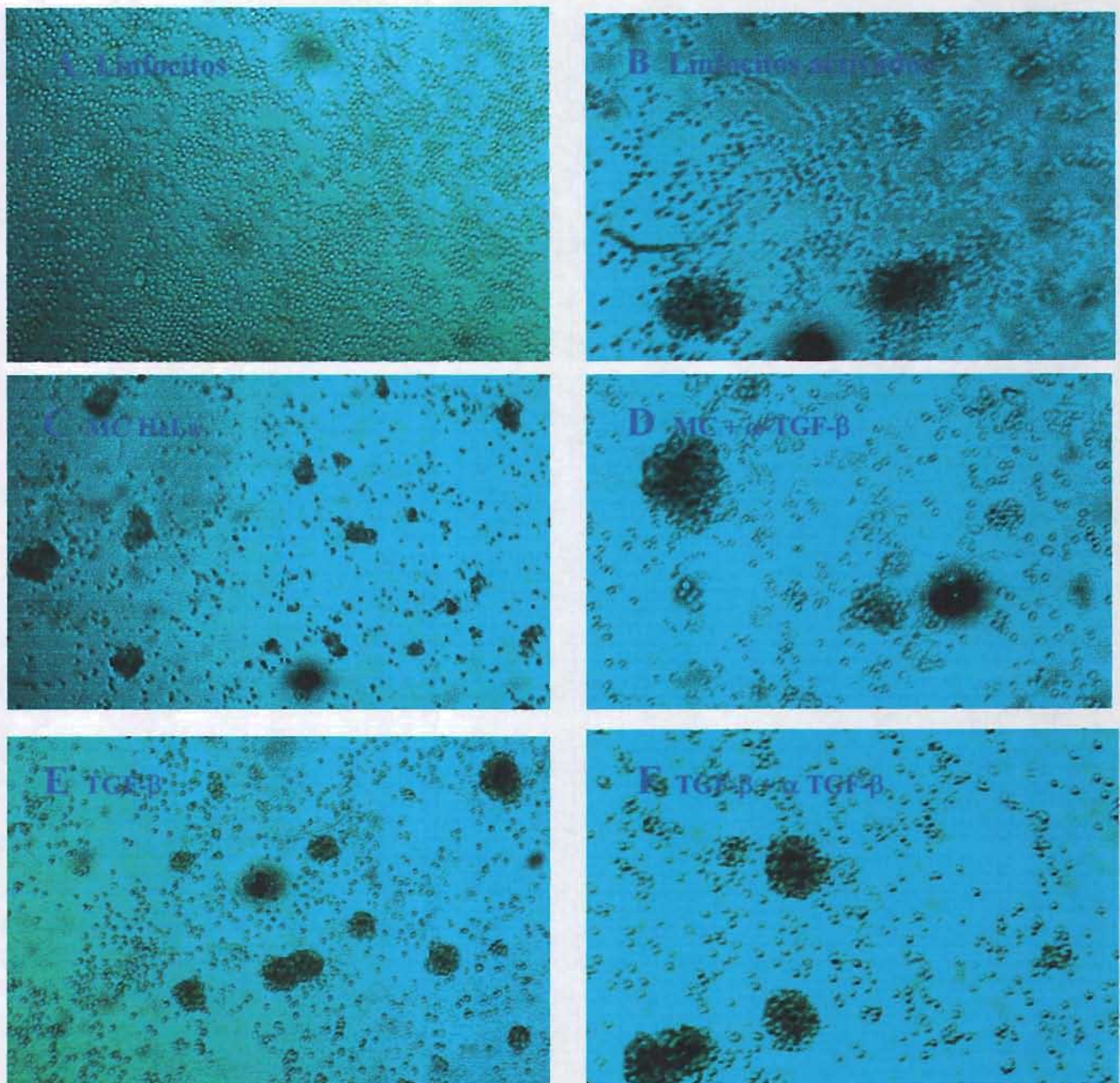
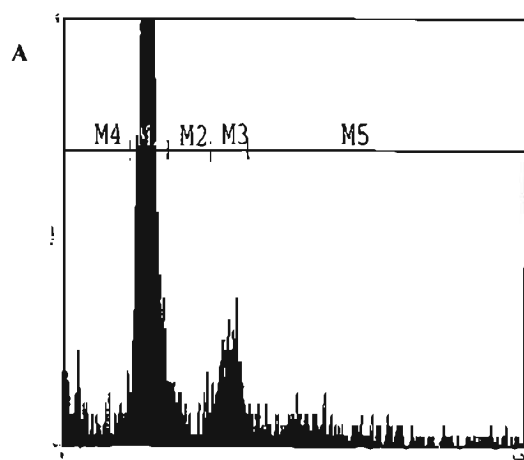


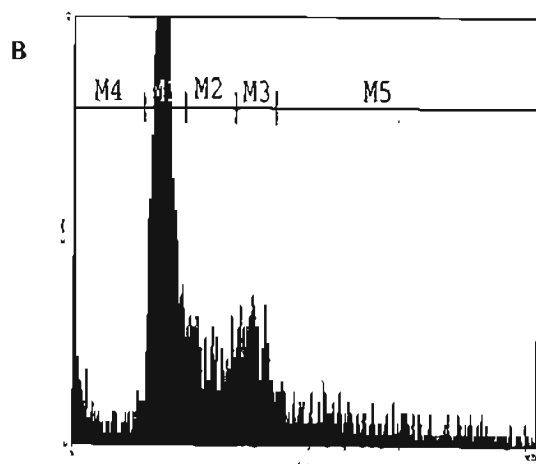
Figura. 12 Efecto del MC de células HeLa y del TGF- β recombinante en la formación de colonias de activación de linfocitos y su bloqueo con un anticuerpo neutralizante contra el TGF- β . Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos y el MC fue puesto al momento de la siembra. La evaluación se realizó a las 84 h de cultivo. A. linfocitos sin tratamiento. B. Linfocitos activados con 15 μ l/ml de fitohemaglutinina. C. Linfocitos tratados con 815 pg/ml del TGF- β presente en el MC. D. Linfocitos tratados con 815 pg/ml de TGF- β presente en el MC y 4 μ g/ml de anti-TGF- β . E. Linfocitos tratados con 5 ng/ml del TGF- β recombinante. F. Linfocitos tratados con 5 ng/ml del TGF β recombinante y 20 μ g/ml de anticuerpo anti-TGF- β .

El hecho de que la inhibición de la proliferación se encuentre asociada a una disminución en la síntesis del ADN podría indicar que los linfocitos quedan detenidos en alguna fase del ciclo celular, por lo que se procedió a evaluar el efecto del TGF- β del MC en el ciclo celular de los linfocitos a través de citometría de flujo, determinando la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. (Figura 13).



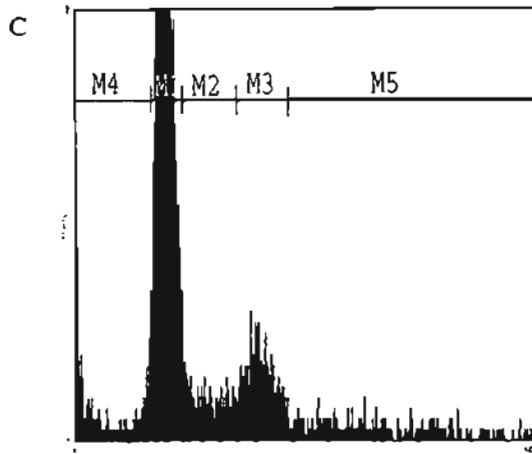
Linfocitos

Marcador	Eventos	% Total	
Todos	5000	100.00	
M1	3166	63.32	Fase G1
M2	231	4.62	Fase S
M3	459	9.18	Fase G2-M
M4	6.91	13.82	Apoptosis
M5	473	9.06	



Linfocitos activados con fitohemaglutinina

Marcador	Eventos	% Total	
Todos	5000	100.00	
M1	2434	48.68	Fase G1
M2	720	14.40	Fase S
M3	653	13.06	Fase G2-M
M4	546	10.92	Apoptosis
M5	690	13.80	



Linfocitos activados + 815 pg/ml del TGF- β presente en el MC de células HeLa.

Marcador	Eventos	% Total	
Todos	5000	100.00	
M1	2609	52.18	Fase G1
M2	303	6.06	Fase S
M3	178	9.56	Fase G2-M
M4	1137	22.74	Apoptosis
M5	487	9.74	

Figura 13. Efecto del MC de células HeLa sobre el ciclo celular de células linfocíticas humanas. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos con el TGF- β presente en el MC de células HeLa y evaluados a las 64 h de cultivo por citometría de flujo. A) Linfocitos sin tratamiento. B) Linfocitos activados con fitohemaglutinina. C) Linfocitos tratados con 815 pg/ml de TGF- β presente en el MC de células HeLa. Las regiones M1, M2 y M3 corresponden a las fases G1, S y G2-M del ciclo celular respectivamente. En la región M4 se ubican las células apoptóticas.

Los resultados muestran que cuando los cultivos de linfocitos son activados con la PHA incrementan su proporción en la fase S del ciclo celular; sin embargo, cuando son tratados con el TGF- β del MC de células HeLa, no se ve afectada significativamente la distribución del ADN a través del ciclo y se observa un incremento considerable en la región M4, lo que es indicativo de que las células están muriendo por apoptosis. Para tratar de esclarecer esta observación, se procedió a evaluar el TGF- β del MC induce apoptosis en las células linfocíticas, a través de la observación de la formación de cuerpos apoptóticos así como de la detección de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana citoplasmática, como dos parámetros de apoptosis (Figuras 14 y 15).

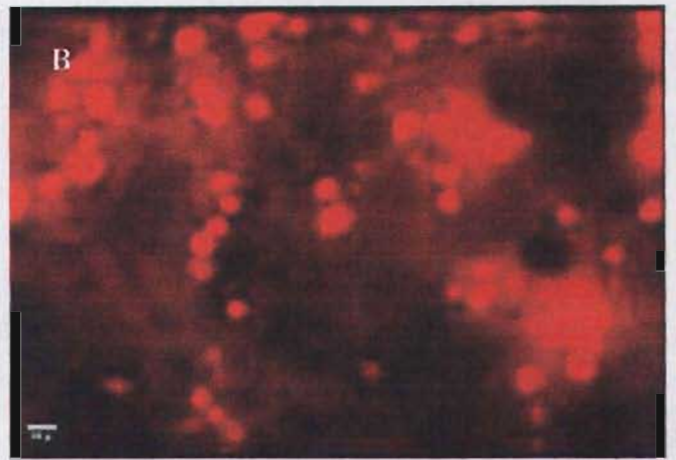
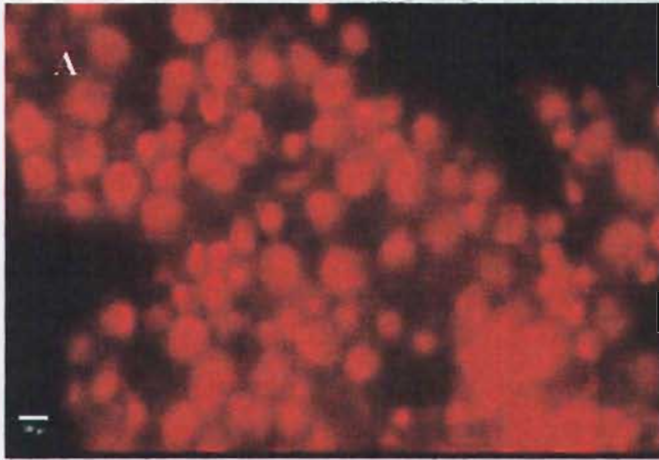
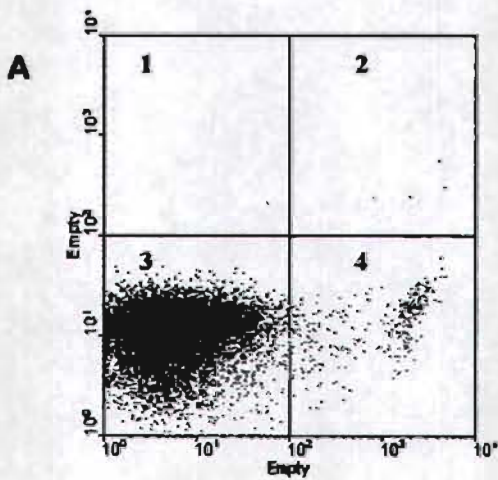
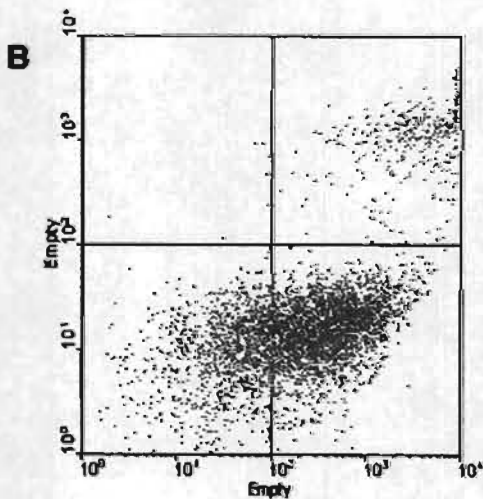


Figura 14. Efecto del TGF- β del MC de células HeLa en la formación de cuerpos apoptóticos de células linfocíticas humanas. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos, tratados con el MC y teñidos a las 64 h con yoduro de propidio. A. Linfocitos sin tratamiento. B. Linfocitos tratados con el MC de HeLa que contiene 815 pg/ml del TGF- β .



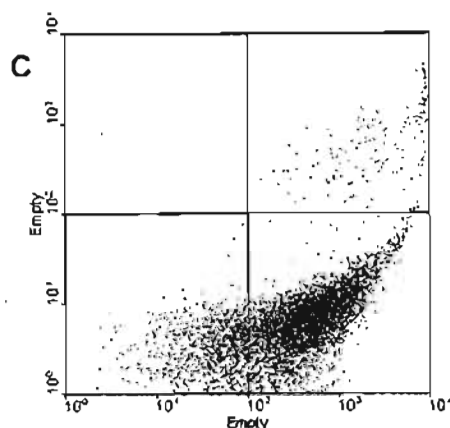
Linfocitos

Cuad	% Total
1	0.01
2	0.06 Células necróticas
3	96.06 Células viables
4	3.87 Células en apoptosis



Linfocitos + 5 ng/ml de TGF- β recombinante

Cuad	% Total
1	0.30
2	8.63
3	28.90
4	62.17



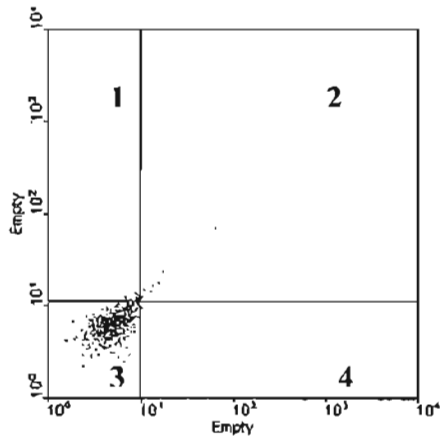
Linfocitos + MC HeLa (815 pg/ml del TGF- β)

Cuad	% Total
1	0.02
2	3.26
3	17.35
4	79.37

Figura 15. Detección de fosfatidilserina a través de Anexina V en cultivos de linfocitos tratados con TGF- β recombinante y con TGF- β del MC de HeLa. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos y evaluados a las 64h por citometría de flujo. A) Linfocitos sin tratamiento. B) Linfocitos tratados con 5 ng/ml de TGF- β recombinante C) Linfocitos tratados con el MC de HeLa que contiene 815 pg/ml del TGF- β .

En la figura 14 se observa que cuando los cultivos de linfocitos son tratados con el MC de células HeLa se presenta una condensación y fragmentación del material genético (cuerpos apoptóticos), concordando con la citometría de flujo (Figura 15), donde se muestra un aumento en el porcentaje de células marcadas con anexina-V conjugada con Isotiocianato de fluoresceína (FIT-C), indicando que los cultivos de linfocitos tratados con el MC son inducidos a la apoptosis.

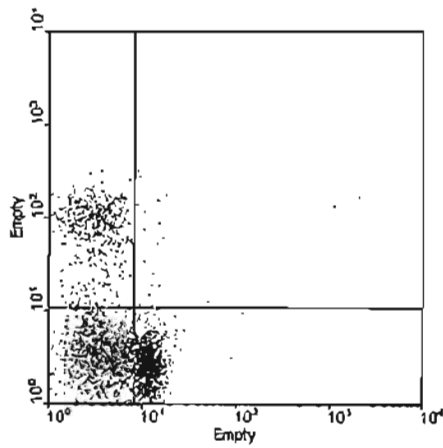
Finalmente, sabiendo que las células tumorales son capaces de secretar al medio de cultivo al TGF- β activo, el cual es utilizado para inhibir la proliferación de células linfocíticas y dado que en nuestros experimentos se utilizó el paquete total de linfocitos, surge la duda si el TGF- β del MC ejerce su efecto sobre una subpoblación específica de células linfocíticas. Se sabe que el TGF- β es un potente modulador negativo de los linfocitos y que ejerce su efecto principalmente sobre los linfocitos T por lo que se evaluó si el MC disminuye la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, a diferentes concentraciones (Figura 16).



A

Linfocitos

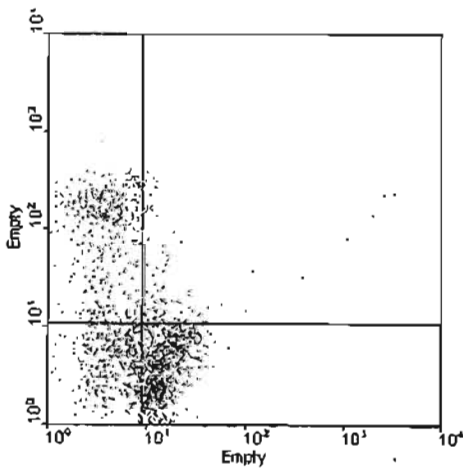
Cuad.	%Total	
1	2.10	CD8+
2	3.01	
3	93.84	
4	1.05	CD4+



B

Linfocitos + PHA

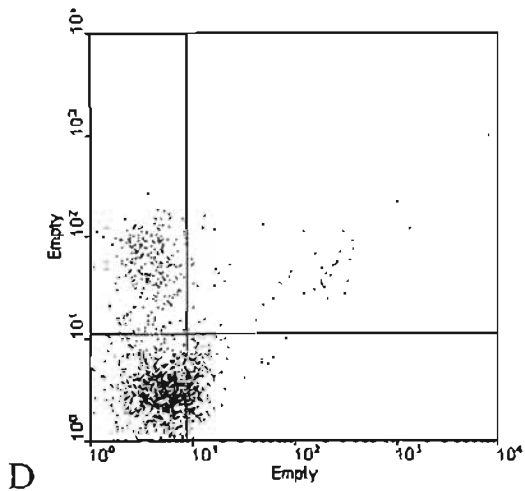
Cuad	%Total	
1	21.56	CD8+
2	1.21	
3	37.71	
4	39.51	CD4+



C

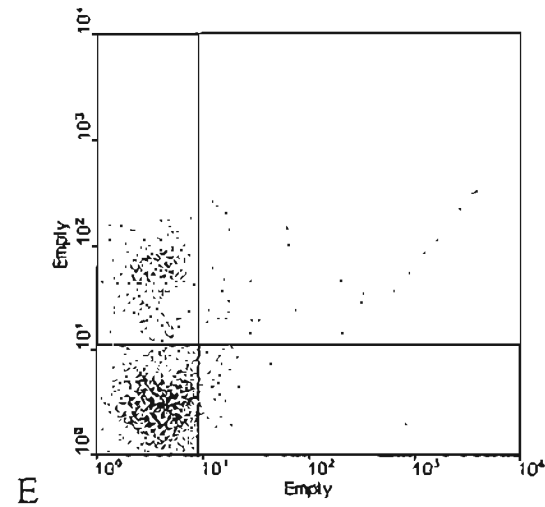
Linfocitos + PHA + MC HeLa (489 pg/ml de TGF- β)

Cuad	%Total	
1	25.92	CD8+
2	6.87	
3	24.08	
4	43.13	CD4+



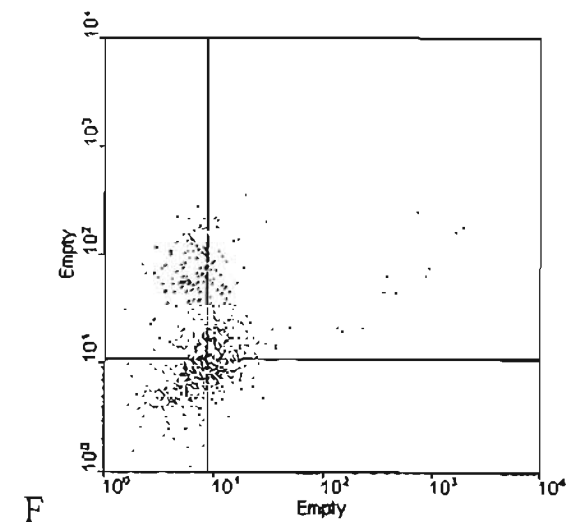
Linfocitos + PHA + MC HeLa (815 pg/ml de TGF- β)

Cuad	%Total	
1	19.99	CD8+
2	4.39	
3	59.24	
4	16.39	CD4+



Linfocitos + PHA + MC HeLa (1304 pg/ml de TGF- β)

Cuad	%Total	
1	20.21	CD8+
2	3.01	
3	72.34	
4	4.43	CD4+



Linfocitos + PHA + 5ng/ml de TGF- β recombinante

Cuad	%Total	
1	24.64	CD8+
2	29.60	
3	28.80	
4	16.96	CD4+

ESTÍMULO	% DE CELULAS CD8+	% DE CÉLULAS CD4+
Linfocitos	2.10	1.05
Linfocitos activados	21.56	39.51
489 pg/ml de TGF- β contenido en el MC HeLa	25.92	43.13
815 pg/ml de TGF- β contenido en el MC HeLa	19.99	16.39
1304 pg/ml de TGF- β contenido en el MC HeLa	20.21	4.43
5ng/ml de TGF- β	24.64	16.96

Figura 16. Efecto del MC de células HeLa sobre las subpoblaciones de linfocitos CD4+, CD8+. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos y tratados con diferentes concentraciones del TGF- β presente en el MC de células HeLa o con el TGF- β recombinante y marcados con anticuerpos conjugados anti CD4-FIT-C, anti CD8-PE. Los linfocitos fueron evaluados a las 64 h de cultivo por citometría de flujo. A. Linfocitos sin tratamiento. B. Linfocitos activados con PHA. C, D, E. Linfocitos activados con PHA y tratados con 490, 815 y 1304 pg/ml del TGF- β presente en el MC de células HeLa respectivamente F) Linfocitos activados con PHA y tratados con 5 ng /ml del TGF- β recombinante.

Los resultados de la figura 16 muestran una disminución en el porcentaje de linfocitos CD4+ cuando los cultivos son tratados tanto con el TGF- β recombinante como con el MC de células HeLa y que dicha población se ve casi eliminada cuando se incrementa la concentración del MC mientras que el porcentaje de linfocitos TCD8+ presenta una variación mínima, lo que indica que la subpoblación de linfocitos T mas responsiva al TGF- β del MC es la TCD4+.

DISCUSIÓN

Las células tumorales son capaces de modificar su microambiente para favorecer su proliferación y sobrevivencia, a la vez que adquieren ventajas selectivas sobre el resto de las poblaciones celulares del organismo (Balkwill, 2003). A la fecha se han realizado diversos estudios para entender como se lleva a cabo este proceso, sin embargo aun quedan muchas incógnitas por resolver, como el mecanismo a través del cual la célula tumoral escapa a los controles que regulan el crecimiento normal de los diversos tipos celulares, cómo se transforma para convertirse en una célula maligna y qué eventos favorecen el proceso de metástasis. Se ha mostrado que las células tumorales son capaces de secretar diferentes citocinas como el FGF, VEGF, IL-4, IL-6, IL-10 y el TGF- β (Chopra *et al*, 1998; Conerci *et al*, 1996; Giannini *et al*, 1998; Le Gros *et al*, 1990; Clerici *et al* 1997; Huang *et al*, 1995; Huettnner *et al*, 1995), que pueden contribuir a su crecimiento, favorecen el proceso angiogénico, a la vez que contribuyen a disminuir o bloquear la respuesta antitumoral del hospedero y contribuyen a generar un ambiente inmunosupresor (Vicari *et al*, 2002; Balkwill, 2001; Murphy, 2001). Por otro lado se han encontrado macrófagos y linfocitos infiltrados en diversos tumores sólidos como el de mama y cérvix, así como en diversos sarcomas y gliomas (Negus *et al*, 1997; Bottazzi *et al*, 1983; Luboshits *et al*, 1999) estas células mantienen a la masa tumoral localizada, pero en algún momento dejan de ser responsivos al tumor permitiendo el proceso tumoral. Al respecto, en el presente trabajo se encontró que las células tumorales de CaCu secretan un factor de naturaleza proteica con actividad inhibidora de la proliferación de las células linfocíticas humanas (AIPCLH), que además es capaz de inducir las a entrar en apoptosis, favoreciendo de este modo el crecimiento tumoral. En ese sentido se ha reportado que las células tumorales en diversos tipos de canceres como el de mama y el de pulmón, aumentan la producción de citocinas tipo Th2 específicamente la IL-6, IL-10 y TGF- β , tanto *in Vitro* como en modelos *in vivo* (Giannini *et al*, 1998), y se afirma que esta condición puede representar un

factor de supresión de la respuesta inmunológica durante el desarrollo del tumor. Nuestros datos aportan evidencia de que la actividad inhibidora observada en los cultivos de linfocitos, se debe a la presencia del TGF- β dentro del MC de células de CaCu ya que al ser tratado con un anticuerpo neutralizante contra esta citocina, el efecto se ve revertido completamente; en ese sentido nuestros datos muestran que el TGF- β es el principal responsable de dicha actividad. De igual manera, se ha aportado evidencia de que las células tumorales en diversos cánceres, aumentan los niveles de ARNm del TGF- β comparado con tejidos normales (Miyamoto *et al*, 1995) nuestros datos aportan evidencia de que en el caso específico del CaCu no solo se produce un aumento en la producción del TGF- β (las células HeLa producen 32.619 pg/ μ l de TGF- β y en fibroblastos no fue detectado bajo las mismas condiciones de cultivo), sino que es secretado de forma activa y ejerce un efecto directo sobre los cultivos de células linfocíticas. Este hecho sugiere que el TGF- β actúa de modo directo sobre la proliferación de los linfocitos además de favorecer el aumento de la IL-10 en contraste con algunos reportes que sugieren que el TGF- β no ejerce su efecto de modo directo sino que lo hace aumentando la expresión de la IL-10 y que es esta la responsable de la supresión de la respuesta inmune (Peralta *et al*, 2001, Nakagomi *et al*, 1995). Adicionalmente, se ha encontrado que existe una relación directa entre las concentraciones del TGF- β y la progresión del cáncer como el de mama, ovario y de cérvix, que en un principio puede estar jugando un papel importante en la selección clonal de las células tumorales, ya que se tienen reportes de que los tumores incipientes si presentan sensibilidad al TGF- β y que esta se va perdiendo conforme avanza la enfermedad, lo mismo que en cultivos primarios de líneas celulares transformadas que pierden la sensibilidad al TGF- β después de periodos prolongados de cultivo (Fynan *et al*, 1993); esta pérdida de sensibilidad, puede ser la que lleve a diferentes tumores a secretar TGF- β de forma constitutiva aumentando su concentración conforme el cáncer se desarrolla. En ese

sentido, diversos estudios muestran que la pérdida de sensibilidad al TGF- β por la célula tumoral se debe a que dicha selección clonal favorece la proliferación de células que van adquiriendo mutaciones tanto en los receptores para esta citocina como en algunas moléculas necesarias para la transducción de la señal como son las proteínas Smad, haciendo que ya no respondan al efecto inhibitorio de esta citocina generando un microambiente óptimo para ellas al inhibir a las células vecinas y aumentar la vasculogénesis del tejido (Guo *et al*, 1997; Lu *et al*, 1997; Kimch *et al*, 1988; Baldwin *et al*, 1996; Derynck *et al*, 1996; Macias-Silva *et al*, 1996; Hayashi *et al*, 1997; De Caester *et al*, 2000).

Por otro lado, observamos que el TGF- β del MC ejerce su efecto principalmente sobre la subpoblación de linfocitos TCD4⁺ (Figura 16), lo que resulta interesante ya que se ha descrito que estas células tienen un papel fundamental en el inicio y dirección de la respuesta inmune adaptativa (Maloy *et al*, 2001; Gavín *et al*, 2003). Se ha demostrado que existe una subpoblación que representa aproximadamente el 5-10% de células TCD4⁺ que expresan en su superficie celular a CD25, el receptor de la cadena α para la IL-2 a las que se ha denominado como células T reguladoras (T_{Reg}), las cuales llevan a cabo una regulación negativa en la respuesta inmunológica (Sakaguchi, 2000; Julien *et al*, 2005). Se propuso primero que este grupo celular CD4⁺CD25⁺ lleva a cabo un control negativo de la proliferación de los linfocitos CD4⁺CD25⁻ a través de un contacto celular directo (Song *et al*, 2002); sin embargo, trabajos recientes muestran que esta subpoblación de linfocitos TCD4⁺CD25⁺ secreta de forma constitutiva TGF- β creando un microambiente rico en esta citocina que es capaz de bloquear la activación de los linfocitos TCD4⁺CD25⁻ en su totalidad (Levings *et al*, 2002; Song *et al*, 2004; Park *et al*, 2004).

También se ha demostrado que el TGF- β actúa sobre los linfocitos T vírgenes favoreciendo su diferenciación hacia el fenotipo CD4⁺CD25⁺ (Nakamura *et al*, 2001; Yamagiwa *et al*, 2001; Julien *et al*, 2005). En ese sentido la célula tumoral podría estar generando una estrategia similar a la

que lleva a cabo el sistema inmunológico de forma normal y utilizar al TGF- β para generar un microambiente rico en esta citocina, que favorece la diferenciación de los linfocitos hacia el perfil CD4+CD25+, propiciando un ambiente inmunosupresor que le permite evadir la respuesta inmunológica favoreciendo de este modo el proceso tumorigénico.

Los linfocitos después de ser activados, solo tienen un periodo de vida limitado y posteriormente se induce en ellos la muerte celular por vía apoptótica. En la fase de inicio de este proceso en linfocitos T, se incluye la unión de receptores de muerte, particularmente los receptores de Fas y del Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) que desencadenan una serie de eventos como cambios en el potencial de membrana mitocondrial, que culmina con la liberación de citocromo C y otros factores que inducen la apoptosis (Zamzami *et al*, 1995; Yang *et al*, 1997; Nagata *et al*, 1995; Dhein *et al*, 1995; Ju *et al*, 1995). En ese sentido, en algunos trabajos se ha propuesto que el TGF- β influye en la muerte celular por apoptosis aunque no queda claro el mecanismo de cómo lo hace; sin embargo, otros estudios indican que el TGF- β induce la expresión del ligando de Fas provocando la muerte celular mediada por esta molécula (Zheng *et al*, 1995; Genestier *et al*, 1999). En nuestro trabajo, mostramos evidencia de que el TGF- β que secretan las células tumorales, induce la muerte apoptótica de las células linfocíticas, logrando así, no solo detener su ataque, sino eliminándolas y de esta manera favorecer su sobrevivencia y la metástasis, como parte de la estrategia que le confiere ventajas selectivas sobre el resto de las células del organismo.

En resumen, nuestros resultados proporcionan nueva información que integrada a la ya existente, nos permite comprender parte de la compleja serie de cambios que llevan a una célula tumoral a adquirir ventajas selectivas sobre el resto de las poblaciones celulares, particularmente mediante el uso del TGF- β , ya que existen trabajos que nos muestran que algunas líneas tumorales entre las que se encuentra el CaCu, presentan mutaciones en los receptores T β RI y T β RII así como en proteínas Smad, por lo que se ve alterada su señalización y que en algunos casos las lleva a

secretar de forma constitutiva al TGF- β , y aprovechar las diversas funciones de esta citocina como la angiogénesis y la inmunosupresión tanto de modo directo como a través del aumento de la producción de otras citocinas como la IL-10 para favorecer su proliferación y posiblemente su diseminación por el organismo (Guo *et al*, 1997; Kimch *et al*, 1988; Derynck *et al*, 1996; Hayashi *et al*, 1997; Derynck *et al*, 1998)

El encontrar que la células de CaCu utilizan al TGF- β como parte del mecanismo que les permite evadir al sistema inmunológico, puede no ser un hecho aislado, sino que sabiendo que otros tumores sólidos como el de mama, de pulmón y carcinoma gástrico, entre otros, son capaces de aumentar la producción del TGF- β a la vez que adquieren mutaciones selectivas que les permite escapar a su actividad inhibidora pudiera ser una estrategia generalizada para el desarrollo del cáncer, por lo que el hecho de comprender mejor toda la serie de eventos que se van produciendo a lo largo del proceso tumoral, podrá permitir en un futuro proponer nuevas terapias más efectivas en la lucha contra esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- Las células tumorales provenientes de CaCu, secretan un factor con actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH).
- La AIPCLH esta dada por la presencia del TGF- β en el medio condicionado (MC) de células HeLa .
- La subpoblación de linfocitos TCD4+ disminuyen su proliferación en presencia del MC.
- El MC induce la muerte celular por apoptosis en los linfocitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Andrew HL, Jordan SP. 2000. Inmunología celular y molecular. Ed. Interamericana. España. 450 pp.
- Alberts B, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. Watson J.D. 1996. Molecular biology of the cell. Fourth edition. Garland Publishing Inc. New York. 1387 pp.
- Alexandrow MG, Moses HL. 1995. Transforming growth factor β and cell cycle regulation. *Cancer Research*. 55:1452-7.
- Arrick B, Lopez A, Elfman F, Ebner R, Damsky C, Derynck R. 1992. Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor β 1. *J. Cell Biol.* 118:715–726.
- Attisano L, Wrana JL. 2002. Mads and Smads in TGF β signalling. *Current Opinion in Cell Biology*. 10:188-94.
- Balkwill F. 2003. Chemokine biology in cancer. *Sem. Immunol.* 15: 49-55.
- Balkwil F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet* 357: 539-545.
- Baldwin R, Friess H, Yokoyama M, Lopez M, Kobrin M, Buchler M, Korc M. 1996. Attenuated ALK5 receptor expression in human pancreatic cancer correlation with resistance to growth inhibition. *Int. J. Cancer* 67:283–288
- Baecher-Allan C, Vissia V, David AH. 2002. Inhibition of human CD4+CD25+^{high} regulatory T cell function. *J. Immunol.* 169:6210-6217.
- Beverly AT. 2001. Malignant cells, directors of the malignant process: Role of transforming growth factor-beta. *Cancer and Metastasis Rev.* 20: 133-143.

- Bendtzen K. 1994. Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol. Letters*. 43: 111-1123
- Berumen J, Villegas N. 1997. Recombinant therapeutic vaccines against invasive cervical cancer. *Salud Publica Mex*. 39:288-297.
- Bjorn RL, Diana S, Andrew SR, Warren S. 2000. The effect of TGF- β 1 on immune response of naïve versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur. J. Immunol*. 30:2101-2111.
- Bottazzi B, Polentarutti N, Acero R, Balsari A, Boraschi D, Ghezzi P. 1983. Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science* 220: 210-212.
- Bollar CM, Rössing C, Calonge MJ, Huls H, Wagner HJ, Massagué J, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM. 2000. Adapting transforming growth factor β -related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood*. 99:3179-87.
- Bowcock AM, Koli KM, Arteaga CL. 1998. Transforming growth factor- β and breast cancer. Chaper IV. Breast cancer molecular genetics, pathogenesis and therapeutics. Human Press. Totawa, New Jersey. 581 pp.
- Bredow S, Lewin M, Hofmann B, Marecos E, Weissleder R. 2000. Imaging of tumor neovasculature by targeting the TGF- β binding receptor endoglin. *Eur. J. Cancer* 36: 675-681.
- Bristow RE, Baldwin RL, Yamada SD, Korc M, Karlan BY. 1999. Altered expression of transforming growth factor-beta ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma. *Cancer*. 85:658-668.
- Bulbulian, S. 1987. La radiactividad. La ciencia desde México. No. 42. Ed. Fondo de Cultura Económica. México. 120 pp.
- Buenemann CL, Willy C, Buchmann A, Schmiechen A, Schwarz M. 2001. Transforming growth factor-beta1-induced Smad signaling, cell-cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *Carcinogenesis*. 22:447-52.

Cavanee W, Hastie N, Stanbridge E. 1989. Recessive oncogenes and tumor suppression. Cold Spring Harbord. 687 pp.

Cayrol C, Flemington EK. 1995. Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta activation of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2. *J. Virol.* 69:4206–4212.

Cerwinka A, Kovar H, Majdic O, Holter O. 1996. Fas and activation-induced apoptosis are reduced in human T cells preactivated in presence of TGF- β 1. *J. Immunol.* 156: 459-464

Charge MJ, Zhang D, Kinnunen P, Schneider MD. 1998. A novel protein distinguishes between quiescent and activated forms of the type I transforming growth factor beta receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 9365-9368.

Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massague J. 1987. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell.* 48: 409-415.

Chen TP, de Vries EG, Hollema H, Yegen HA, Vellucci VF, Strickler HD, Hildesheim A, Reiss M, 1999. Structural alterations of transforming growth factor-beta receptor genes in human cervical carcinoma. *Int. J. Cancer.* 82: 43-51.

Chen SH, Oakes JE, Lausch RN. 2002. Synergistic anti-herpes effect of TNF- α and IFN- γ in human corneal epithelial cells compared with that in corneal fibroblasts. *Antiviral Res.* 25:201-213.

Choi YH, Choi KC, Park YE. 1997. Relationship of transforming growth factor beta 1 to angiogenesis in gastric carcinoma. *J. Korean Med. Sci.* 12:427–432.

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

Chu TY, Lai JS, Shen CY, Liu HS, Chao CF. 1999. Frequent aberration of the transforming growth factor-beta receptor II gene in cell lines but no apparent mutation in pre-invasive and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int. J. Cancer*. 80: 506-510.

Clerici M, Merola M, Ferrario E. 1997. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* . 89:245-250.

Conerci J, Runowicz C, Flanders K, de Victoria C, Fields A, Kadish A, Goldberg C. 1996. Altered expression of transforming growth factor- β 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. *Cancer*.77: 1107-1114.

Corcione AS, Roncella G, Cutrona PG, Mori M, Pistoia V. 1993. Transforming growth factor beta-1 (TGF-beta 1) released by an Epstein-Barr virus (EBV) positive spontaneous lymphoblastoid cell line from a patient with Kostmann's congenital neutropenia inhibits the growth of normal committed haemopoietic progenitors in vitro. *Br. J. Haematol*. 85:684–691.

Cupp C, Taylor JP, Khalili K, Amini S. 1993. Evidence for stimulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by HIV-1 Tat in cells derived from CNS. *Oncogene* 8 :2231–2236.

Darnell J, Havey L, Baltimore D. 1993. Molecular cell biology. Second edition. Scientific American Books. USA. 920 pp.

Datta PK, Moses HL. 2000. STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Mol. Cell. Biol*. 20: 3157-3167.

De Geest K., Bergman CA, Turyk ME, Frank BS, Wilbanks GD. 1994. Differential response of cervical intraepithelial and cervical carcinoma cell lines to transforming growth factor- β 1. *Gyn. Oncol*. 1:376–385.

De Caestercker MP, Ester P, Anita BR. 2000. Role of transforming growth factor - β signaling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 17: 1388-1402.

- De Jong JS, Van Diest PJ, Van DerValk P, Baak JP. 1998. Expression of growth factors growth-inhibiting factors and their receptors in invasive breast Cancer II Correlations with proliferation and angiogenesis. *J. Pathol.* 184:53–57
- De-Larco JE, Todazo GJ. 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:4001.
- Derynck R, Zhang Y. 1996. Intracellular signalling: The mad way to do it. *Curr. Biol.* 6:1226–1229.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Smads transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 95:737–740
- Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin K, Krammer P. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature.* 373: 438–441.
- Dickson MC, Martin JS, Côté FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development.* 121:1845–1854.
- Eifel P, Berek, Thigpen J. 2001. Cancer of cervix, vagina and vulva. In: De Vita V. Hellman S, Rosenberg S. (Eds) *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. 1526-1572.
- Elliot RL, Globe GC. 2005. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 23:2078-2093.
- Espinosa E, Bermúdez F. 2001. Relación conducta-inmunidad: el papel de las citocinas. *Rev Invest Clin.* 53:240-53.
- 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. *Anal. Biochem.* 290:272-273.

Feldmann K., Sebald W., Knaus P. 2002. Resistance to TGF- β 1-mediated growth inhibition correlates with sustained Smad2 phosphorylation in primary murine splenocytes. *European J of Immunology*. 32:1393-1402.

Fidler I. 2000. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J*. 6:134-141.

Franzén P, Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH. 1993. Cloning of a TGF- β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell* 75: 681-692.

Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. 2000. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 96:2022-36.

Fynan T, Reiss M. 1993. Resistance to inhibition of cell growth by Transforming Growth Factor- β and its role in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncogenesis*. 4:493–540

Gavin M, Rudensky A. 2003. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr Opin Immunol* 15: 690-696.

Genestier L., Kasibhatla S, Brinner T, yGreen D. 1999. Transforming growth factor β 1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cell via downregulation of c-Myc. *J. Exp. Med*. 189: 231-239.

Giannini A, Piron J, Dayen B. 1998. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol*. 113: 183.

Gold LI, Saxena B, Mittal KR, Marmor M, Goswami S, Nactigal L, Korc M, Demopoulos RI. 1994. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Res*. 54:2347–2358.

Gorelik L, Richard AF. 2002. Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 2:46-53.

Gorelik L, Gields PE, Flavell RA. 2000. Cutting edge: TGF- β inhibits T_H type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J. Immunol.* 165:4773-4777.

Gorham JD, Guler ML, Fenoglio D, Gubler U, Murphy KM. 1998. Low dose TGF- β attenuates IL-12 responsiveness in murine T_H cells. *J. Immunol.* 161:1664-1670.

Guo Y, Jacobs SC, Kyprianou N. 1997. Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor-beta (TGF-beta1) type I and type II receptors in human prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 71:573-579.

Haddow DJ, Fowles K, Parkinson R, Akhurst J, Balmain A. 1991. Loss of growth control by TGF-beta occurs at a late stage of mouse skin carcinogenesis and is independent of ras gene activation. *Oncogene* 6:1465-1470.

Hague A, Manning AM, Van DerStappen JW, Paraskeva C. 1993. Escape from negative regulation of growth by transforming growth factor beta and from the induction of apoptosis by the dietary agent sodium butyrate may be important in colorectal carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 12:227-237.

Havrilesky LJ, Hurteau JA, Whitaker RS, Elbendary A, Wu S, Rodriguez GC, Bast Jr. RC, Berchuck A. 1995. Regulation of apoptosis in normal and malignant ovarian epithelial cells by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 55:944-948.

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu Y, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone Jr. MA, Wrana JL, 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.

Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson M, O'Garra A. 2000. TGF- β 1 down-regulates T_H2 development and results in decrease IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur. J. Immunol.* 30:2639-2649.

Horwitz D, Song GZ, Dixon JG. 2003. The role of the combination of IL-2 and TGF- β or IL-10 in the generation and function of CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺ regulatory T cell subsets. *J. Leukocyte Biol.* 74:471-478.

Huang M, Wang J, Lee Pef. 1995. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res.* 55:3847-3853.

Huettner C, Paulus W, Roggendorf W. 1995. Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. *Am. J. Pathol.* 146:317-322.

Hurteau J, Rodriguez GC, Whitaker RS, Shah S, Mills G, Bast R, Berchuck A. 1994. Transforming growth factor-beta inhibits proliferation of human ovarian cancer cells obtained from ascites. *Cancer* 74:93-99.

Janeway-Travers. 2001. Immunobiology, the immune system in health and disease. Fourth edition. Garland Publishing. New York. 774 pp.

Jiménez LF, Merchant LH. 2003. Biología celular y molecular. Pearson Educación México. 853 pp.

Ju S, Panka D, Cul H, Ettinger R, El-Khatib M, Sherr D, Stanger B, Marshak R. 1995. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373: 444-448.

Julien CM, John JL, Marric G, Alexander YR. 2005. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201: 1061-1067.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Kai TF, Taketazu MK, Shimanuki K, Yamada S, Miyazono K, Kato M, Miyata M. 1996. Distribution of transforming growth factor-beta and its receptors in gastric carcinoma tissue. *Jpn J. Cancer Res.* 87:296–304.
- Karp G. 1996. *Biología Celular y Molecular*. Ed.. MacGraw-Hill. México. 792pp.
- Kim YS, Yi Y, Choi SG, Kim SJ. 1999. Development of TGF-beta resistance during malignant progression. *Arch. Pharm. Res.* 22:1-8.
- Kimchi A, Wang XF, Weinberg RA, Cheifetz S, Massague J. 1998. Absence of TGF-beta receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. *Science* 240:196–199.
- Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, Studer H. 1999. Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas a comparative study. *Thyroid.* 9:119-125.
- Kloen P, Gebhardt MC, Perez-Atayde A, Rosenberg AE, Springfield DS, Gold LI Mankin HJ. 1997. Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in osteosarcomas TGF-beta3 is related to disease progression. *Cancer* 80:2230–2239.
- Kretschmar M, Massagué J. 1998. SMADs: mediadors and regulators of TGF-beta signaling. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 8:103-111.
- Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. 1999. A mechanism of repression of TGF-beta/Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 13: 804-816.
- Lagman L. 2001. *Embriología Médica*. 8ª edición, Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 643 pp.
- Larson AA, Kern S, Sommers RL, Yokota J, Cavenee WK, Hampton GM. 1996. Analysis of replication error (rer+) phenotypes in cervical carcinoma. *Cancer Res.* 56: 1426-1431.
- Lazcano PR, López M, López A, Hernández C. 1999. Instituto Nacional de Salud Pública de México. 35: 65-73.

- Le Gross G, Ben-Sasson S, Seder R, Finkelman F, Paul W. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4) producing cells *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.* 172: 921-929
- Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. 2002. *J. Exp. Med.* 196: 1335-1346.
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. 1992. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell.* 68: 775-785.
- Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell.* 67: 785-795.
- Lu Z.H, Friess, HU, Graber X, Guo M, Schilling A, Zimmermann MK, Buchler MW. 1997. Presence of two signaling TGF-beta receptors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Dig. Dis. Sci.* 42:2054-2063.
- Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B. 1999. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res.* 59: 4681-4687.
- Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. 1996. MADR2 is a substrate of the TGF-beta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell.* 87:1215-1224.
- Machteld MT, Steffen K, Carsten B, Johan G, Carla A, Bruijnzeel-Koomen M, Edward FK, Van Hoffen E. 2003. Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-specific CD4+ T Cell proliferation without modulating the cytokine response. *Int. Immunol.* 15: 1495-1504.
- Maloy K, Powrie F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2: 816-822.

Manning AM, Williams AC, Game SM, Paraskeva C. 1991. Differential sensitivity of human colonic adenoma and carcinoma cells to transforming growth factor beta (TGF-beta) conversion of an adenoma cell line to a tumorigenic phenotype is accompanied by a reduced response to the inhibitory effects of TGF-beta. *Oncogene*. 6:1471-1476.

Markowitz SD, Roberts AB. 1996. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev*. 7:93-102.

Margni .1996. Inmunología Clínica. Ed. Medica-Panamericana. México.327 pp.

Massagué J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 67:753-91.

Massagué J. 2000. How cells read TGF-β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 1:169-178.

Massing AM, Epstein W. 1963. Study of human papillomavirus lesions. *Arch. Dermatol*. 87:306.

Mc Nab J. 1991. Human papillomaviruses and cervical cancer fro: Paterson Symposium No. 26 28-30th October 1991. England. 450 pp.

Meager A. 1991. Cytokines. Ed. Prentice Hall. USA. 280 pp.

Merz VW, Arnold AM, Studer UE. 1994 Differential expression of transforming growth factor-beta 1 and beta 3 as well as c-fos mRNA in normal human prostate benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *World J. Urol*. 12:96-98.

Michelson SJ, Alcami SJ, Kim DD, Bachelerie F, Picard L, Bessia C, Paya C, Virelizier JL. 1994. Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1. *J. Virol*. 68:5730-5737.

Mire-Sluis AR, Torpe R. 1998. Cytokynes. Ed. Academic Press. USA. 480 pp.

Missero C, Ramon Y, Cajal R, Dotto GP. 1991. Escape from transforming growth factor β control and oncogene cooperation in skin tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 88:9613-9617.

- Miyamoto H, Kubota Y, Shuin T, Torigoe S, Dobashi Y, Hosaka M. 1995. Expression of transforming growth factor-beta 1 in human bladder cancer. *Cancer*. 75:2565–2570
- Murphy P. 2001. Chemokines and molecular basis of cancer metastasis. *New. Engl. J. Med.* 354: 833-835.
- Nagata S, Goldstein P. 1995. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456.
- Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M, Tokumo K, Kamimura S, Okuda H, Kudo T. 1997. The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 16:256–262.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata N, Heldin NE, Heldin CH, Tendijke P. 1997. Identification of smad7, a tgf-beta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389: 631-635.
- Nakagomi H, Pisa P, Pisa E. 1995. Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 63:366-371
- Nakamura K, Atsushi K, Warren S. 2001. Cell contact-dependent Immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T Cells Is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J. Exp. Med.* 194: 629-644.
- Negus R, Stamp G, Hadley J, Balkwil F. 1997. A quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am. J. Phatol.* 150: 1723-1734.
- Okamoto A, Jian, W, Kim S, Spillare EA, Stoner GD, Weinstein IB, Harris CC. 1994. Overexpression of human cyclin D1 reduces the transforming growth factor beta (TGF- beta) type II receptor and growth inhibition by TGF- beta 1 in an immortalized human esophageal epithelial cell Line. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 11576-11580.

- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Dellus H, Massague J, Niehrs C. 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401: 480-485.
- Ortega JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP. 2002. Modulation of tumor-infiltrating lymphocyte cytolytic activity against human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 36:17-25.
- Oshima, M, Oshima H, Taketo MM. 1996. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* 179:297-302.
- Ou CY, Chang JG, Tseng HH, Wei HJ, Su TH, Hsu TY, Chang CP, Lee HH. 1999. Analysis of microsatellite instability in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 9: 67-71.
- Padgett RW. 1999. TGFβ signaling pathways and human diseases. *Cancer and Metastasis Reviews*. 18:247-59.
- Park HB, Doo-Jin P, Eunbyeong J, Seokmann H, Jeehee Y. 2004. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-β-coestimulated CD4+ CD25- T cell. *Int. Immunol.* 16: 1203-1213.
- Parris K. 2003. Th1/Th2 Balance: The hipótesis, its limitations, and implicatios for health and disease. *Altern. Med. Rev.* 8:223-232.
- Pasche B. 2001. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J. Cell. Phys.* 186: 153-168.
- Pepper MS. 1997. Transforming growth factor-beta vasculogenesis angiogenesis and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8:21-43.
- Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martinez A, Madrid-Marina V. 2001. TGFβ1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Publica Mex.* 43:340-5.
- Phelps W, Yee C, Munger K, Howley P. 1988. Benignant human larynx lesions and human papilloma virus type 6. *Cell* 53:539.

- Picon A, Gold LI, Wang J, Cohen A, Friedman E. 1998. A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor beta1. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7:497–504.
- Prempee T. 1982. radiation treatment of carcinoma of the cervix with extensión into the endometrium. *Cancer.* 49:20.
- Reiss M. 1999. TGF- β and cancer. *Microbes Infect.* 1: 1327-1347.
- Richards SM, Garman RD, Keyes L, Kavanagh B, McPherson JM. 1998. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell. Immunol.* 184:85-91.
- Rodeck U, Bossler A, Graeven U, Fox FE, Nowell PC, Knabbe C, Kari C. 1994. Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res.* 54:575–581.
- Roitt IM, Delves JP. 2003. Inmunología, fundamentos. Decima edición. Editorial Médica Panamericana. México. 679 pp.
- Rommery SL. 1980. Gynecology and obstetrics: The health care of women. Second edition. Mc. Graw Hill. Mexico. 430 pp.
- Sad S, Mosmann TR. 1994. Single IL-2-secreting precursor CD4 T Cell can develop into either T_H1 or T_H2 cytokine secretion phenotype. *J. Immunol.* 153: 3514-3522.
- Santin AD, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP, Hermonat PL. 2001. Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressor and DR+ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gyn. Oncol.* 81:424-32.
- Santos-Argumedo L. 1994. Principios básicos de la respuesta inmunológica. *Perinatol. Reprod. Hum.* 8: 4-11.

- Sakaguchi. S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 101: 455-458
- Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. 1996. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J. Virol.* 70:8624-8629
- Scott AG, Edward BL, Gary DS, Harold LM. 1986. Growth factors and cancer. *Can. Res.* 46:1015-1029.
- Shevach ME. 2002. CD4+CD25+ Suppressor T cells: More questions than answers. *Nat. Rev. Immuno.* 2: 389-400.
- Smith P, Kronh R, Hermanson G, Mallia A, Gartner FH. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76.
- Song GZ, Ju HW, Gray JD, Harold S, Horwitz AD. 2004. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: The Role of IL-2, TGF- β and IL-10. *J. Immunol.* 172:834-842.
- Song GZ, Gray JD, Kazuo O, Satoshi Y, Horwitz AD. 2002. Generation *ex vivo* of TGF- β producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J. Immunol.* 169:4183-4189.
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Glick AB, Danielpour D. 1989. Transforming growth factor-beta and suppression of carcinogenesis. *Princess Takamatsu Symp.* 20:259-266.
- Swain S, Huston G, Tonkonogy S, Weinberg A. 1991. Transforming growth factor- β and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype. *J. Immunol.* 147:2991-3000.
- Tak W, Munzenrider J, Mitchel G. 1979. External irradiation and one radium application for carcinoma of the cervix. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 5:29.

- Travers MT, Barrett-Lee PJ, Berger U, Luqmani YA, Gazet JC, Powles TJ, Coombes RC. 1988. Growth factor expression in normal benign and malignant breast tissue. *Br. Med. J.* 296:1621–1624.
- Thompson C, Powrie F. 2004. Regulatory T cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4: 408-414.
- Vicari A, Caux C. 2002. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 143-145.
- Verrecchia F, Tacheau C, Schorpp-Kistner M, Angel P, Mauviel A. 2002. Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene.* 20:2205-11.
- Vindelov L, Christensen I, Nissen N. 1985. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytom.* 6:348-356.
- Vogel G. 1999. A New Blocker for the TGF- β Pathway. *Science.* 286: 665.
- Wahl SM, WanJun C. 2003. TGF- β : the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 14: 85-89.
- Walker RA, Dearing SJ. 1992. Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur. J. Cancer* 28:641–644.
- WanJun C, Wenwen J, Hongsheng T, Sicurello P, Mark F, Jan M, Wahl MS. 2001. Requirement for transforming growth factor β 1 in controlling T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 194: 439-454.
- WanJun C, Wenwen J, Hardegen N, Ke-jian L, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl MS. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells TGF- β induction of transcription factor *Foxp3*. *J. Exp. Med.* 198: 1875-1886.
- Welch D, Fabra RA, Nakajima M. 1990. Transforming growth factor- β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:7678–7682.

- Wieser R. 2001. The transforming growth factor- β signaling pathway in tumorigenesis. *Curr. Opin. Oncol.* 13: 70-77.
- Wright JA, Huang A. 1996. Growth factors in mechanisms of malignancy: roles for TGF- β and FGF. *Histol. Histopathol.* 11: 521-536.
- Wu F, Buckley S, Bui K, Yee A, Wu H, Liu J, Warburton D. 1996. Cell cycle arrest in G0/G1 Phase by contact inhibition and TGF- β 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 270: 879-888.
- Xu J, Attisano L. 2000. Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 4820-4825.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim C, Ibrado A, Cai J, Peng T, Jones D, Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132.
- Yamaguchi S, Dixon GJ, Hashimoto S, David AH. 2001 A role for TGF- β in the generation and expression of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *J. Immunol.* 166: 7282-7289.
- Yigong S, Massague J. 2003. Mechanism of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113:685-700.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Sussin S, Petit P, Mignotte B, Kroemer G. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182: 367-377.
- Zheng W, Flavell RA. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for T_H2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 89: 587-596.