

9

dej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

PURIFICACION DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA
PROLIFERACION (FIP) Y EVALUACION DE SU
EFECTO EN EL CICLO CELULAR DE FIBROBLASTOS
DE CERVIX HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARIA ANTONIETA CHAVEZ GONZALEZ

MEXICO, D. F.,

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres:

María Asunción González G y Gustavo Chávez H, quienes me han dado la oportunidad de existir y quienes han colmado mi vida de amor y felicidad.

A mis hermanos.

Terc, Rocio y Gustavo, con quienes siempre he compartido momentos de alegría, amor y respeto, y quienes junto con mis padres me han dado la oportunidad de formar parte de una familia maravillosa, de la que todo lo que pueda decir es poco.

A mis abuelitos, tios y primos:

De quienes siempre he recibido cariño y quienes cada uno en su momento han llenado mi vida de ilusiones y fantasías.

A mis amigos.

Quienes siempre me han apoyado y que han hecho de mi paso por la escuela una aventura digna de repetirse.

**A todos ellos con profundo
amor y respeto.**

Gracias.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Benny Weiss S. por la oportunidad de integrarme a su laboratorio, donde he encontrado mi verdadera vocación.

Al M en C. Luis Sánchez S. por todos los conocimientos compartidos y porque además de mi asesor es un amigo.

Al M en C. Fabian Flores, al Dr. Benny Weiss S. al M en B E Enrique Mendieta y al Dr. Mario Altamirano, por sus comentarios y aportaciones a este trabajo

A todos los miembros del Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer, de quienes he aprendido mucho y quienes me han hecho sentir en un ambiente de amistad.

A los Señores José Chavarria y Ranulfo Pedraza por su valioso apoyo técnico.

Agradezco especialmente a todas las mujeres que sin saberlo han contribuido con la parte más importante del trabajo

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Marco Teórico	3
Inhibidores de la Proliferación	5
Ciclo Celular	19
Crecimiento Tumoral y CaCu	22
Planteamiento del Problema	24
Hipótesis	25
Objetivos	26
Método	27
Resultados	38
Discusión de Resultados	55
Conclusiones	60
Literatura Citada	61
Apéndice	67
Tabla de Abreviaturas	71

RESUMEN

Las células fibroblásticas presentan un crecimiento característico, tanto *in-vivo* como *in-vitro*, ellas regulan su proliferación por medio de la inhibición por contacto, actualmente conocida como inhibición del crecimiento dependiente de la densidad.

En este trabajo, se determinó que los fibroblastos de cérvix humano, regulan su proliferación a través de la secreción al medio de una molécula con actividad inhibidora de la proliferación. Esta molécula se ha denominado Factor Inhibidor de la Proliferación (FIP). Nuestros resultados establecen que dicha actividad inhibidora de la proliferación se incrementa cuando existe un mayor contacto entre las células, estableciéndose un efecto denso dependiente.

La caracterización bioquímica parcial de este factor, ha revelado que se trata de una molécula de naturaleza proteica; así mismo la separación por exclusión molecular en Sephacryl S-100 e Intercambiadores Iónicos, han mostrado que presenta un peso molecular entre 20 y 30 kDa, y un punto isoeléctrico (pI) entre 5.4 y 7.4 unidades de pH, además de que es eluida a bajas concentraciones de cloruro de sodio (0.015-0.125M), lo que indica su baja fuerza iónica.

En cuanto a la actividad biológica, el FIP ha mostrado inhibir no sólo la proliferación de fibroblastos de cérvix humano entre un 40 y 60%, sino que también detiene la proliferación de dos líneas celulares tumorales provenientes de cáncer cervico-uterino CaCu (CALO e INBL) hasta en un 60%.

Al comparar el FIP con los inhibidores mayormente caracterizados, se encontró que el TNF α , la IL-1 β y el IFN γ , tienen un efecto mitogénico sobre los fibroblastos de cérvix, mientras que para el caso del TGF β se presenta un efecto inhibitor parecido al del MCF. Sin embargo, cuando se comparó el efecto del FIP con el del TGF β en la línea celular MV1Lu, que es dependiente de TGF β para su inhibición, el FIP no mostró efecto, mientras que el TGF β inhibió fuertemente la proliferación de esta línea celular. Además de que el efecto del

TGF β sobre células tumorales es mitogénico, mientras que el efecto del FIP para estas mismas células es inhibidor. No obstante, cuando se realizaron análisis de Inmunoelotransferencia y Elisa no se detectó la presencia de las citocinas antes mencionadas, al menos en concentraciones mayores a 6 ng, lo que sugiere que el efecto inhibidor registrado en el MCF puede ser debido a alguna citocina diferente a las evaluadas o incluso a alguna molécula no caracterizada

Las evaluaciones del ciclo celular de fibroblastos de cérvix, demuestran que estas células poseen un ciclo celular de aproximadamente 56 horas, dentro de las cuales 16 corresponden a la fase de síntesis de ADN. Finalmente se demuestra que el efecto inhibidor del FIP, es ejercido en el tiempo que comprende la fase G1 del ciclo celular de estos fibroblastos.

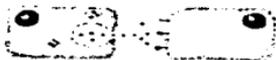
INTRODUCCION

MARCO TEORICO

Los organismos están constituidos por células que se encuentran finamente organizadas formando parte de tejidos, órganos y sistemas. Tal organización es mantenida por el equilibrio existente entre las células que pierde el organismo y las que genera para reestablecer la pérdida de éstas.

Este equilibrio está dado por la tasa de divisiones celulares que se presentan dentro de una célula en particular, de manera que en un mismo organismo podemos encontrar células que se dividen a una velocidad muy alta (como sucede con las células epiteliales del tracto digestivo), muy lenta (como es el caso de las células hepáticas), o incluso células que nunca se dividen (neuronas).

Actualmente se sabe que en la regulación de la división celular se encuentran implicadas una serie de moléculas que pueden hacer que la célula prolifere (efecto positivo o mitogénico), o que permanezca en un estado de quiescencia (negativo o inhibidor). Estas moléculas conocidas como reguladores del crecimiento circulan en los fluidos corporales, son producidas por tipos celulares específicos y pueden causar su efecto ya sea en la célula que lo produce (mecanismo autócrino), o en un tipo celular diferente al que produjo el regulador del crecimiento (mecanismo parácrino).



Mecanismo parácrino



Mecanismo autócrino

Un ejemplo de regulación del crecimiento entre diferentes tipos celulares ha sido observado entre las células epiteliales y fibroblásticas de diferentes órganos. Las células epiteliales son células con un contacto estrecho entre sí, que recubren todas las superficies del organismo, las grandes cavidades y la superficie interna de los vasos sanguíneos y linfáticos. Los epitelios protegen el tejido contra el daño mecánico, la entrada de microorganismos y la pérdida de agua por evaporación, además de ser importantes en cuanto al sentido del tacto, ya que tienen terminaciones nerviosas sensitivas. Sobre las superficies internas, la función del epitelio es más comúnmente de absorción o secreción (1).

Los epitelios forman dentro del organismo un microambiente que comparten con los fibroblastos, quienes junto con los macrófagos son los más importantes constituyentes del sistema conectivo. Los fibroblastos son células grandes, planas, ramificadas y de aspecto fusiforme, poseen prolongaciones ramificantes delgadas, presentan un núcleo oval y alargado, y uno o dos nucleólos. Cuando los fibroblastos participan activamente en la síntesis de proteínas, presentan abundante retículo endoplásmico rugoso y de ellos depende la formación de fibras que constituyen el componente amorfo de la matriz extracelular, que sirve de sostén a otros grupos celulares, como los epitelios. (2)

Para conocer cómo estos dos tipos celulares regulan su proliferación, se han empleado técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, que permiten aislar, propagar y conservar diversos tipos celulares dentro de medios nutritivos en condiciones de laboratorio, proporcionando así una buena herramienta para comprender la estructura, función y regulación de un número de eventos que suceden dentro de una célula.

Los estudios realizados sobre la división celular han aportado información que permite establecer que las células son capaces de responder a factores físicos (temperatura), químicos (pH) y biológicos (hormonas), induciendo a la célula a que se divida o a que pare la división. Dentro de los factores biológicos existen factores denominados de crecimiento o moduladores biológicos de la división celular, cuya acción es regular la división, ya sea estimulándola o inhibiéndola.

A continuación se describen los factores de crecimiento o moduladores biológicos más estudiados, con el fin de establecer el conocimiento actual sobre éstos y la importancia que tienen en el mecanismo que regula la división celular.

INHIBIDORES DE LA PROLIFERACION

Las investigaciones realizadas sobre el mecanismo de división celular establecen que la homeostasis celular y el delicado balance entre la pérdida y renovación de los tejidos, depende de dos modos alternativos de existencia, la proliferación y la quiescencia celular, ambos eventos gobernados por moléculas endógenas, estimuladoras e inhibidoras, que por su naturaleza bioquímica y sitios de acción pueden cambiar a una célula de un estado a otro (3).

Hasta la década pasada, mucho se estudiaba sobre la estructura y actividades de factores de crecimiento y sus receptores de superficie, en los que se incluyen: hormonas, factores de crecimiento, factores de adhesión, matriz extracelular, etc, pero poco se conoce sobre los inhibidores de la proliferación endógenos que funcionan en la regulación negativa de la división celular (4)

La existencia de estos inhibidores fue primeramente sugerida en investigaciones sobre cicatrización de heridas y carcinogénesis, siendo muy lento el avance de esta área de investigación, debido a los problemas que presenta la purificación y caracterización molecular de los inhibidores (5)

Los factores con actividad inhibidora de la proliferación reportados en la literatura provienen de tipos celulares específicos, presentan diferentes pesos moleculares, y la mayoría de ellos tienen una naturaleza glicoproteica. Además, la mayor parte de estos inhibidores tienen dominios hidrofóbicos o están asociados con elementos hidrofóbicos de membrana, hecho que aumenta la dificultad en su identificación y purificación. (6).

Actualmente se sabe que las células son capaces de regular su proliferación a través de moléculas de naturaleza glicoproteica de bajo peso molecular, que ellas mismas secretan

(moléculas endógenas). Estas moléculas con actividad inhibitora de la proliferación celular ejercen su acción de una manera autócrina o parácrina. Se han reportado una cantidad significativa de dichas moléculas, sin embargo sólo algunas han sido purificadas y estudiadas a nivel molecular. Las moléculas o factores reportados con esta actividad y que han sido estudiadas a nivel molecular son: la Interleucina-1 beta (IL-1 β : del inglés Interleukin 1 β), el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF β : del inglés Transforming Growth Factor), el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α : del inglés Tumor Necrosis Factor), el Interferón gama (IFN γ : del inglés Interferon) y recientemente la Interleucina 2 (IL-2: del inglés Interleukin 2) No obstante los factores inhibidores de la proliferación ya reportados, aún se siguen encontrando nuevas moléculas con estas características. Este hecho es de esperarse, ya que el campo de estudio es relativamente reciente, y se espera que se llegará a establecer en lo futuro con los estudios moleculares respectivos, la existencia de familias que alberguen a la mayoría de estas moléculas. La descripción que se da a continuación de factores o moléculas con actividad inhibitora de la proliferación, está enfocada primordialmente a las asociadas con las células fibroblásticas y epiteliales ya que este trabajo presenta como modelo experimental ambos linajes celulares.

Factor de Crecimiento Transformante tipo β (TGF β)

La actividad del TGF β fue originalmente descubierta en el medio condicionado de células de ratón transformadas con el virus de Sarcoma Murino de Moloney (7), en donde se encontró que el medio condicionado podía inducir adhesión al sustrato independientemente del crecimiento de las células blanco (8).

La molécula consiste de dos cadenas idénticas entrelazadas por puentes disulfuro. La masa molecular del homodímero es de 25 kilodaltones (kDa) y cada cadena está compuesta de 112 aminoácidos (9). El gene para el TGF β se encuentra localizado en el cromosoma 19 en humanos y en el cromosoma 7 de ratón, es una molécula altamente conservada, en la que sólo un aminoácido distingue la forma humana de la del ratón (10), además de saberse que la secuencia bovina es igual a la del humano. En 1987, se reportó la

existencia de tres formas del TGF β en el cerdo, las tres moléculas son similares en peso, pero hay tipos básicos que difieren en su secuencia amino terminal (5).

La molécula del TGF β inicia su camino de transducción de señales por medio de un receptor transmembranal con actividad serina-treonina-cinasa que está compuesto de tres subunidades con pesos moleculares de 53, 70 a 85, y 200 a 400 kDa. La subunidad de 70 a 85 kDa, fosforila al ligando de 53 kDa, para posteriormente unirse al TGF β . El receptor de 200 a 400 kDa tiene la función de mediar el acceso ligando-receptor (11).

El TGF β tiene acciones diversas y efectos opuestos dependiendo del tipo celular y condiciones microambientales, es capaz de regular la proliferación y diferenciación celular, producción y degradación de matriz extracelular, además de estar involucrado en la respuesta inmune e inflamatoria (12). La molécula se ha mostrado como un fuerte inhibidor para la mayoría de los tipos celulares no transformados en mamíferos y el efecto es más fuerte en células epiteliales, endoteliales, linfohematopoyéticas y algunas células neuroectodermales (13). En el desarrollo y desórdenes fibróticos el TGF β puede promover la proliferación celular por un incremento en proteínas de matriz extracelular o factores de crecimiento y sus receptores.

El TGF β ejerce su efecto inhibitor en la fase G1 del ciclo celular, dicho efecto puede ser reversible, aunque en células como mioblastos induce diferenciación terminal y en algunas células puede inducir apoptosis (11). TGF β es el prototipo de antimitógeno, y el mecanismo por el cual inhibe la proliferación celular incluye modificaciones en moléculas como: complejos ciclina-cdk, el inhibidor de ciclinas-CDK's p27 KIP, la proteína nuclear Rb, el AMPc, entre otros (14).

Interferón gama (IFN γ)

Los interferones (IFN's), son elaborados por las células en respuesta a virus, antígenos o mitógenos. Inducen el llamado estado antiviral, pero a partir de su descubrimiento por Issac y Lindenmann en 1957, se les han atribuido otras funciones como factores inmunomoduladores, supresores de la proliferación y diferenciadores (15).

Debido a sus características, se les ha dividido en dos grandes grupos: IFN's tipo I que comprenden las formas α y β y el IFN tipo II o interferón inmune, que comprende la forma γ . El IFN γ es una molécula codificada por un sólo gene que para el humano se encuentra en el cromosoma 12, mientras que en el ratón se presenta en el cromosoma 16 (16).

El IFN γ es sintetizado en respuesta a mitógenos, antígenos e IL-2. Es secretado por linfocitos y probablemente por macrófagos alveolares (15) Existen alrededor de 1000 receptores para IFN γ en células normales y un número mayor en células tumorales. El receptor pesa alrededor de 90 kDa y une al IFN γ como dímero, siendo un factor especie específico (17).

Se ha observado que para ejercer su efecto, el IFN γ necesita de la síntesis de proteínas, mientras que los IFN's α y β no. Su ruta de señalización parece incluir proteínas G, Adenilato-ciclase, AMPc, iones Ca^{++} , proteínas cinasas C e intercambios de Na^+ e H^+ (18). Las acciones del IFN γ son controladas por IFN α que lo inhibe, mientras que el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), reduce los niveles de receptores para IFN γ pero no afecta sus niveles de ARNm (19)

Entre sus efectos se encuentran: el incremento en la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) Clase I y II, incrementa la expresión de receptores para inmunoglobulinas G tipos I y III (FCR) en monocitos, macrófagos y polimorfonucleares, efectos que comparte con los otros dos interferones, pero es mucho más efectivo que ellos (18, 19) El IFN γ media algunas respuestas a través de la inducción de los FCR, entre las que se encuentran incluidas la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, fagocitosis, secreción de enzimas lisosomales, producción del anión superóxido (20). El IFN γ estimula a las células NK en sus funciones, estimula a linfocitos T hacia la toxicidad, incrementa la producción de anticuerpos por linfocitos B, es activador de los macrófagos y controla su capacidad tumoricida *in vivo*, así como su capacidad defensiva contra patógenos como helmintos, protozoarios, bacterias, clamidias, etc. (15, 16, 17, 18).

El efecto antiproliferativo del IFN γ en células tumorales parece estar mediado por linfotoxinas, aunque se piensa que sus mecanismos de inhibición pueden ser desencadenados a través de inducción de enzimas antivirales, inducción de genes supresores, pero de función y estructura desconocida, modula los productos de oncogenes, regula la expresión de genes de factores de crecimiento, ejerce una acción directa sobre oncogenes tumorales y aumenta las defensas del huésped (15, 16).

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α).

El TNF α , además de las propiedades típicas de una citocina, es una proteína con actividad reguladora de la proliferación celular, cuya actividad está determinada por el tipo celular al que se liga y a la presencia de otras proteínas reguladoras. Puede ser un importante mediador inflamatorio, regulando la actividad de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T y B y modulando las propiedades del endotelio vascular (21)

Tanto el gene del TNF α como el de la linfotoxina (LT), se encuentran dentro de la región del MHC en el brazo corto del cromosoma 6 (22)

El TNF α presenta actividad biológica cuando se presenta como un trimero con subunidades de 17 kDa, pero éste es primeramente es producido en la célula como un propéptido de 26 kDa que se encuentra en la membrana celular donde es biológicamente activo. La estructura de esta proteína es parecida a la de algunas otras que son cortadas para dar la forma de 17 kDa extracelular (23).

La LT y el TNF son antigénicamente distintos, pero muestran un 30% de homología en su secuencia aminoacídica en la misma porción del receptor. El TNF y la LT no son únicamente inducidos por endotoxinas, sino por una variedad de otros estímulos incluyendo promotores tumorales, virus, y mitógenos, pero su producción puede ser estimulada por otras citocinas como el IFN γ , la IL-1 y los factores estimuladores de colonias (CSF) (24).

El TNF α ejerce su actividad citotóxica mediante la unión a un receptor específico de superficie celular que comparte con LT; este receptor existe con características de baja y alta afinidad en relación de 10 a 1 (24, 25). Poco se sabe de las vías de transducción de la

señales para este factor, sin embargo, algunos estudios involucran a una proteína cinasa C, posiblemente por una fosforilación directa del receptor (26).

El TNF α puede estimular la proliferación de varias líneas fibroblásticas diploides humanas y algunas líneas celulares tumorales (24). Esta acción es sinérgica con el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Insulina (27).

Paradójicamente el TNF α , es una potente citotoxina para algunas células cuando éstas han sido metabólicamente comprometidas por inhibidores de ARN o de síntesis de proteínas o virus. Es también tóxico para algunas células transformadas y podría suprimir la formación de colonias de algunas células hematopoyéticas normales, tanto de humano como de ratón *in vitro* (28).

Algunas líneas celulares epiteliales humanas son resistentes a la acción citotóxica del TNF. La capacidad del TNF α para ser mitogénico, citostático o citotóxico o inhibidor es además dependiente de una serie compleja de eventos extracelulares e intracelulares (29).

Interleucina 1 beta (IL-1 β)

La IL-1, es una glicoproteína de 17.5 kDa, de la cual existen dos formas, la interleucina 1 alfa (IL-1 α) que tiene un punto isoeléctrico (pI) de 5, e interleucina 1 beta (IL-1 β) con pI de 7. Las dos formas de IL-1 son productos de genes diferentes, que para el humano se encuentran en el cromosoma 2 (30). Algunos de los nombres con los que fue conocida la IL-1 son: Mediador Endógeno de Leucocitos, Factor de Células Mononucleares, Catabolina, Factor Activador de Osteoclastos, Hemopoyetina, etc (31).

Se conocen dos receptores para la IL-1, denominados como IL-1RI e IL-1RII. El receptor tipo I es miembro de la superfamilia de las IgG, con una vida media de 12 horas. Se encuentra en fibroblastos, queratinocitos, endotelio, células sinoviales, condrocitos, hepatocitos, células T CD4⁺, pero no CD8⁺ y monocitos (32). La IL-1 unida a este receptor se internaliza en los primeros cinco minutos en un 60 a 70 % y se encuentra en el núcleo dos horas después. El receptor tipo II se localiza en células y líneas de células B

transformadas así como en neutrófilos y células de médula ósea. Con un peso de 68 kDa, su región extracelular presenta sólo un 28% de homología con el receptor I (33). Este receptor es pobremente internalizado y al cabo de 2 o 3 horas su ligando es localizado en el núcleo. Aunque se dice que ambos receptores pueden unir las dos formas de IL-1 de igual manera, hay evidencia que indica que dependiendo del tipo celular y especie animal, se presentan diferentes sitios de unión y preferencias (30).

Respecto a la transducción de señales, existen reportes contradictorios. Mizel y colaboradores (1990) indican una proteína enlazadora de GTP, además del AMPc y la proteína cinasa A; O Neil y colaboradores (1990) establecen que no han detectado cambios en los elementos antes mencionados, aunque si han registrado cambios en las concentraciones de Na⁺ e H⁺, y la participación de una proteína G, pero poco sensible a la toxina de Pertussis (34, 35).

La IL-1 estimula la proliferación de fibroblastos, células musculares, queratinocitos, células mesangiales, células gliales, linfocitos T y B, así como precursores hematopoyéticos; actúa como un factor quimiotáctico de células T y B, incrementa la citotoxicidad de macrófagos y activa a linfocitos T y B, induce la síntesis de collagenasa, la resorción de hueso, la producción de prostaglandina E2 (PGE2) en fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, induce actividad procoagulante y la adhesividad de células endoteliales, e induce la producción de IL-1, IL-2, IL-3, TNF e IFN γ (33, 35). En cuanto al efecto inhibitorio, la IL-1 β ha mostrado detener la proliferación de miocitos y fibroblastos cardíacos, además de su ya reportado efecto inhibitorio en células transformadas de músculo liso y astrocitos (36). También se le ha reportado que inhibe la proliferación de células tumorales provenientes de cáncer ovárico (37).

Sialoglicopéptido inhibidor (CeReS-18)

La molécula CeReS-18, está compuesta por una cadena polipeptídica de 18 kDa, con un pI de 3.0 (38). Más del 10% de la masa de esta molécula está compuesta por carbohidratos. La desglucosilación de la molécula con bromuro de hidrógeno, no altera su actividad inhibidora.

El CeReS-18, se ha mostrado como un potente inhibidor de la síntesis de proteínas y la división celular (39). Para ejercer su actividad biológica se une a un receptor de superficie celular, con un peso molecular de 150 kDa, que se presenta como un componente integral de membrana. Para el caso de los fibroblastos Swiss 3T3 ha mostrado tener entre 2×10^4 receptores y el número de receptores ocupados, se correlaciona perfectamente bien con la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (40).

Este inhibidor ha mostrado también detener el ciclo celular de dichos fibroblastos en la fase G1, en un punto cercano al punto de restricción (41). CeReS-18 ha mostrado ser un potente antagonista de la acción mitogénica, ya que puede inhibir la síntesis de ADN de manera independiente de la estimulación con el promotor de tumor 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), el EGF y la bombesina (42).

En cuanto a la transducción de señales el CeReS-18 aumenta considerablemente en el nivel de calcio, pero no inhibe la expresión de genes como c-fos, c-myc y c-ras (43). Una propiedad inusual de CeReS-18, que lo distingue de otros inhibidores, es su amplio rango de acción, ejerciendo su efecto tanto en células de vertebrados como invertebrados, pero especialmente tiene efecto en cultivos de fibroblastos y células epiteliales, así como muchas células transformadas y no transformadas, entre las que se encuentran queratinocitos, endotelio, células embrionarias, neuroblastomas, fibrosarcomas, glioblastomas, leucemias mieloides, con excepción de la línea celular HL60 (44). Existe interesantemente una relación de la inhibición del ciclo celular con la presencia de la proteína Rb en un estado hipofosforilado, observando que las líneas celulares que presentan Rb hipofosforilada son detenidas por CeReS-18, mientras que las células donde Rb se encuentra en un estado hipofosforilada, mutada o ausente, se mantienen proliferando. (45).

Inhibidor del Crecimiento de Células Mamarías (MDGI)

El inhibidor de la proliferación MDGI fue inicialmente aislado de células de carcinoma mamario de Ehrlich. Presenta una naturaleza proteica con un peso molecular de 13 kDa y se ha mostrado sensible a la temperatura (14).

El MDGI aparece asociado pero no limitado a las membranas de superficie celular, obteniéndose actualmente de homogenados de membranas. Presenta similitud estructural con el inhibidor de crecimiento de fibroblastos, pero se ha demostrado que se trata de moléculas diferentes, pero relacionadas (46)

El mecanismo por el cual el MDGI detiene el ciclo celular no ha sido establecido, pero su acción inhibitoria disminuye en presencia de EGF o insulina. También se ha sugerido que el inhibidor es una proteína acarreadora de lípidos, lo que lo propone como un candidato en la comunicación de la superficie celular y el núcleo (6)

Glicopéptido de Superficie Celular de Cerebro de Ratón (BCSG-Ratón).

El BCSG es una molécula que inicialmente se purificó de la corteza cerebral de ratón, por hidrólisis proteolítica suave, el cual inhibió la síntesis de proteínas y la división celular cuando fue adicionado a cultivos exponenciales de células procedentes de riñón de ratón BHK-21. (47) Cuando la actividad inhibitoria se separó por filtración en gel, se demostró que el inhibidor eluye en dos fracciones, que corresponden a pesos moleculares de 25-30 y 6-10 kDa, la composición de carbohidratos muestra que tanto la fracción de alto y bajo peso molecular están compuestas de aproximadamente el 6% de carbohidratos (48)

Aunque la síntesis de proteínas fue totalmente inhibida por el BCSG, la síntesis de ARNm no parece estar influenciada, lo que sugiere que el punto de acción del BCSG está asociado primeramente con la traducción y no con la transcripción (49)

El BCSG ha mostrado inhibir cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón y suspensiones celulares de cerebro neonatal, mientras que las líneas de ratón transformadas fueron resistentes, o completamente refractarias al efecto inhibitor. Esta resistencia puede

ser debida a las enzimas hidroliticas secretadas por las células transformadas, como un mecanismo para inactivar la acción inhibidora del BCSG (6).

Interleucina 2 (IL-2)

La Interleucina 2 es una citocina caracterizada inicialmente de células Jurkat y una linea leucémica de células T. Es una glicoproteína con un peso molecular entre 15 y 18 kDa, que muestra una composición homogénea de 133 aminoácidos, aunque existen variantes en su glicosilación, lo que le confiere la variación en el peso molecular y punto isoelectrico, que va de 6.6 a 8.2 (50).

La IL-2 es producida principalmente por linfocitos T citotóxicos; es un potente regulador de la proliferación de las células T, y su actividad afecta la proliferación y diferenciación de células B, células naturales asesinas (NK), así como de algunas células no linfoides (51).

Estudios recientes han demostrado que los fibroblastos humanos expresan receptores para IL-2 en su membrana y esta expresión disminuye durante el envejecimiento de las células. También, se ha demostrado que la IL-2 es capaz de disminuir de una manera dosis dependiente la proliferación de fibroblastos embrionarios 3T3 y de una linea celular de linfoma B (52).

Contactinhibina

La contactinhibina ha sido caracterizada como una glicoproteína de membrana plasmática de 60 a 70 kDa, que puede jugar un papel importante en la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad.

Esta molécula ha mostrado inhibir la síntesis de ADN hasta en un 75% de una manera dependiente de la dosis y ha mostrado reducir el número celular hasta en un 60%, cuando las células son incubadas con el inhibidor por tres días (53).

La molécula tiene un pI de 5.5 a 6.2, que es el intervalo en que ha mostrado una fuerte actividad inhibitora. Los análisis electroforéticos sugieren que se trata de una cadena polipeptídica simple, y además se han registrado cinco especies diferentes de contactinhibina las cuales difieren principalmente en su grado de glicosilación (54).

La actividad biológica no ha sido restringida a fibroblastos humanos, ya que también los fibroblastos de ratón responden a dicho efecto inhibitorio; sin embargo, existen varias líneas celulares transformadas, que son insensibles a la inhibición de la proliferación por contactinhibina (53).

Glicopéptido de Superficie Celular de Cerebro de Bovino (BCSG-Bovino)

Este inhibidor presenta importantes propiedades biológicas similares a las del BCSG y se ha encontrado bajo condiciones reductoras, con un peso molecular entre 16 y 18 kDa. La molécula posee un pI de 8.1 y probablemente existe una variante estructural con pI de 8.3 (38). Esta molécula ha mostrado inhibir la síntesis de proteínas y la proliferación celular de una manera reversible y no tóxica, actuando sobre la fase G2 del ciclo celular de la línea celular BHK-21 y células ováricas de hamster, por lo que no se considera un inhibidor candidato a la regulación del crecimiento dependiente de la densidad (55).

Factores de Crecimiento parecidos a Insulina (IGF's)

Las moléculas conocidas como IGF's, constituyen un grupo de moléculas multifuncionales que regulan no sólo el transporte a través de la sangre y su entrada a los espacios extravasculares, sino también la presentación de receptores de superficie. Hay seis isoformas de los IGF's denominadas IGF-BP-1 al 6, y de ellas, las formas 3, 4, y 5 son secretadas por fibroblastos (56). En general estas moléculas tienen un efecto reversible y resistente a la temperatura, lo que sugiere que estos factores inhibidores del crecimiento pueden ser péptidos, glicopéptidos o glicolípidos, aunque la naturaleza química exacta de estos inhibidores no se ha determinado.

En el caso particular de la IGFBP-3, que presenta un peso molecular de 45 kDa, se sabe que es producida por células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, así como líneas tumorales derivadas de mama y próstata. Esta molécula ha mostrado inhibir la proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón (57) y de pollo, así como el crecimiento de fibroblastos de ratón Balb-c independientemente de la inducción con factores de crecimiento como FGF y PDGF (56).

La molécula IGFBP-4 ha sido purificada de medio condicionado de la línea celular de carcinoma de colon HT29, en donde tiene un efecto inhibitorio (58). En cuanto a la IGFBP-5 ha mostrado inhibir el crecimiento de fibroblastos humanos transformados con el virus de simio SV 40 (59). Las tres moléculas antes mencionadas, tienen una expresión diferencial, y un efecto variable en fibroblastos de músculo de ratón, pero todas conservan su naturaleza inhibitoria (56).

Regulador del Crecimiento de Fibroblastos (FGR)

El FGR es un factor inhibitorio de la proliferación, aislado de medio condicionado proveniente de cultivos de alta densidad celular de fibroblastos 3T3. El factor consiste en un polipéptido estable al ácido, con un peso molecular de 13 kDa (3). Es capaz de inhibir de manera reversible y dosis dependiente la proliferación de los fibroblastos 3T3, por lo que se ha propuesto como una molécula autócrina, que juega un papel fundamental en la regulación del crecimiento de dicha línea celular (5).

Inhibidor de la Proliferación Hepática

El Inhibidor de la Proliferación Hepática es una molécula purificada de hígado de rata que migra como un polipéptido de 26 kDa bajo condiciones reductoras. Presenta un pI de 4.65 y ha mostrado inhibir reversiblemente la proliferación celular y la síntesis de ADN en células epiteliales normales de hígado de rata, aunque no presenta efecto sobre células transformadas de hígado o células de hepatomas en cultivo (3).

Inhibidor del Crecimiento Epidermal (EGI)

El EGI es una molécula obtenida de plaquetas humanas, capaz de inhibir el crecimiento de células no malignas de epitelio derivado de hígado de rata búfalo. Presenta un peso molecular de 27 kDa, y está compuesto de dos unidades de peso idéntico, es una molécula estable al calor, pero sensible a ditioneitol (DTT). Ha mostrado la capacidad de inhibir diferentes líneas celulares de origen epitelial (60).

Además de las moléculas inhibitoras antes mencionadas, existen algunas otras reportadas en la literatura que son capaces de detener la proliferación de células fibroblásticas humanas, pero cuya caracterización bioquímica ha sido muy lenta, entre ellas se encuentra una molécula inhibitora la cual es producida por fibroblastos embrionarios de pulmón normal humano, que es capaz de reducir la síntesis de ADN (61). Esta molécula es un glicopéptido con un peso molecular de 18 kDa cuya actividad inhibitora de la proliferación ha sido asociada con su composición de azúcar (62).

Otra molécula inhibitora ha sido aislada de hígado de rata adulta, esta molécula es sensible al ácido y la temperatura, presenta un peso molecular de 37 kDa, y es capaz de detener en la fase G1 del ciclo celular de fibroblastos de hígado de hamster de una manera dosis dependiente (63).

FACTOR INHIBIDOR	PESO MOLECULAR (kDa)	PUNTO ISOELECTRICO (pI)	CELULAS EN QUE ACTUA	ACTIVIDAD EN EL CICLO
TGFβ ¹¹	25		Células humanas no transformadas, fibroblastos, epitelio, endotelio, células linfomatosas y neuroectodermiales	G1 (cercano a R)
IFNγ ^{13, 14}	20 y 25	8.3 y 8.5	Células de mamífero	
TNFα ^{13, 28}	17		Células transformadas	
IL-1β ^{16, 17}	17.5	7	Miociitos y fibroblastos cardiacos, así como células de cáncer ovárico	
CeReS-18 ^{18, 19}	18	3	Fibroblastos de diferentes órganos con Rb funcional, queratinocitos, endotelios, epitelios y leucemias	G1 (cercano a R)
MDGI ²	13		Fibroblastos y células de cáncer mamario	
BCSG-Ratón ^{6, 20}	25-30 y 6-10		Fibroblastos de ratón embrionario, células neonatales	
FGR ¹	13		Fibroblastos 3T3	
IL-2 ^{21, 22}	15-18	6.6-8.2	Fibroblastos embrionarios 3T3	
III ¹	26	4-6.5	Epitelio normal de hígado de rata	
Contactinhibina ^{11, 24}	70	5.5-6.2	Fibroblastos humanos y de ratón	
BCSG-Bovino ^{18, 19}	18	8.1-8.3	Células de ovario de hamster, línea BHK-21	G2
IGF's ^{25, 26, 27}	45		Fibroblastos, osteoblastos, tumores de mama y prostata, fibroblastos embrionarios de ratón y pollo, células de cáncer de colon	
EGF ²⁷	27		Células no malignas, epitelio de hígado de rata búfalo, líneas celulares epiteliales	
?	150		Fibroblastos humanos y de ratón	
?	18		Fibroblastos embrionarios de pulmón	
?	3.7		Fibroblastos de hígado de hamster	G1

Tabla que muestra de manera general las principales características bioquímicas y sitios de acción de los inhibidores de la proliferación reportados en la literatura. TGFβ. Factor de Crecimiento Transformante tipo beta. IFNγ: Interferon gamma. TNFα: Factor de Necrosis Tumoral tipo alfa. IL-1β: Interleucina 1 tipo beta. CeReS-18: Sialoglicopéptido inhibidor. MDGI. Inhibidor del Crecimiento de Células Mamarías. BCSG-Ratón: Glicopéptido de Superficie Celular de Cerebro de Ratón. FGR Regulador del Crecimiento de Fibroblastos. IL-2: Interleucina 2. III. Inhibidor de la Proliferación Hepática. BCSG-Bovino. Glicopéptido de Superficie Celular de Cerebro de Bovino. IGF's. Factores de Crecimiento parecidos a Insulina. EGF: Inhibidor del Crecimiento Epidermal. ? Inhibidores con nombre aun indeterminado.

CICLO CELULAR

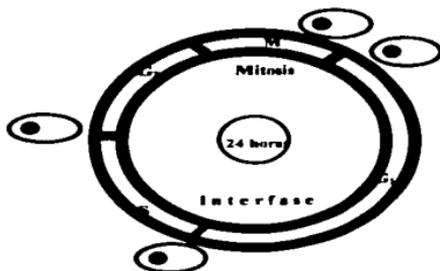
La división celular es el mecanismo fundamental por el cual todos los organismos vivos se duplican. En organismos unicelulares como bacterias, cada división celular produce un individuo u organismo adicional y en especies multicelulares, un gran número de divisiones son requeridas para crear un nuevo individuo, de tal manera que en un organismo adulto, la división celular es necesaria para reemplazar las células que son perdidas por accidentes, destrucción y muerte celular programada, generándose millones de nuevas células cada segundo, solamente para mantener el *status quo*.

Este fenómeno, implica que un organismo para poderse replicar requiere de una serie de eventos celulares que le permitan generar a un nuevo individuo, en estos eventos se incluye la duplicación del material genético y de todos los organelos celulares, hecho que permite a un organismo replicarse muchas veces desarrollando una actividad de división cíclica. Este ciclo celular que comprende todas las reacciones que se deben llevar a cabo para la generación de un nuevo organismo o individuo se realizan en diferentes fases.

Los detalles del ciclo celular pueden variar de un tipo celular a otro, pero ciertos requerimientos son universales. Primero, la célula debe prepararse para generar dos células hijas con características genéticamente idénticas y segundo, el proceso de división celular debe ir acompañado de la duplicación de todos sus organelos citoplasmáticos (64)

La mayor parte del trabajo necesario para la preparación de la división celular, se produce de una manera imperceptible al microscopio durante la fase del ciclo celular denominada "Interfase", por lo que resulta difícil establecer fases estrictas en la progresión de la célula en crecimiento durante la interfase. Una excepción importante la constituye la síntesis de ADN, en donde el material genético nuclear se replica constituyendo una etapa muy específica de la interfase llamada fase de "Síntesis de ADN" (fase S). La otra fase concreta del ciclo es la división celular, que incluye la división nuclear (cariocinesis) y la división citoplasmática (citocinesis), que se produce a continuación. La cariocinesis y la citocinesis en conjunto, reciben el nombre de "Mitosis" (fase M). Quedan por lo tanto el período comprendido entre la fase M y el comienzo de la síntesis de ADN, que recibe el nombre de G_1 (del inglés Gap, separación), y el período comprendido entre el final de la

síntesis de ADN y la fase M siguiente, que recibe el nombre de fase G_2 . Por consiguiente, la interfase está compuesta por sucesivas fases G_1 , S y G_2 y normalmente abarca un 90% o más del tiempo total del ciclo celular (65).



Esquema del ciclo celular, en donde se observa la interfase (que comprende las fases G_1 , S y G_2), así como el momento de la división celular.

La duración del ciclo celular, varía grandemente de un tipo celular a otro, por ejemplo, las células nerviosas, las fibras de músculo esquelético y los eritrocitos, generalmente no se dividen después de alcanzar la madurez, aunque siguen sintetizando ARN y proteínas a lo largo de su vida, mientras que otros tipos celulares como las células sanguíneas, epiteliales, endoteliales, células del tejido conjuntivo, etc. se dividen rápida y continuamente a lo largo de la vida de un organismo. La principal diferencia entre las células que se dividen rápidamente y las que se dividen con lentitud, reside en el tiempo que pasan en la fase G_1 del ciclo celular, pudiendo permanecer en este estado días e incluso años (66).

Generalmente cuando las células se encuentran en estado quiescente en el que no proliferan (fase G_0), el contenido de ADN celular permanece sin modificación, el tamaño celular disminuye, y las proteínas y ARN son degradadas rápidamente y no son resintetizadas con prontitud, además que las actividades enzimáticas y de transporte

disminuyen. Estas características hacen una notable distinción entre las fases G_0 y G_1 del ciclo celular.

La fase G_1 , comprendida entre la mitosis y la síntesis de ADN, incluye una importante serie de eventos en los que la mayoría de los factores mitogénicos e inhibidores de crecimiento pueden ejercer sus efectos, en esta fase las células requieren un metabolismo extra, y por ello algunos autores la han subdividido en cuatro subfases que se describen a continuación:

La primera subfase, denominada de **Competencia (C)**, está caracterizada por cambios en la estructura de la cromatina, incremento en el transporte y nutrientes a través de la membrana, así como la producción de nuevo ARNm. La siguiente, es la subfase de **Entrada (G_{1a})**, en ella se lleva a cabo la síntesis de algunas nuevas macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), así como el incremento de enzimas glicolíticas y polisomas. La subfase de **Progresión (G_{1b})**, se caracteriza por una elevada síntesis de proteínas, por lo que muestra una alta sensibilidad a inhibidores o estimuladores de la misma (67), esta subfase de G_1 , también es conocida como **Punto de Restricción (R)**, y sólo puede terminar si se logra acumular una mínima cantidad esencial de una cierta proteína de disparo (denominada también proteína U, del inglés "unstable protein"), esta proteína hipotética, sólo alcanzará una concentración elevada cuando se sintetiza con relativa rapidez, y su concentración disminuirá bruscamente durante la fase de mitosis (65). Cuando la célula ha logrado cruzar el punto R, entra a la última fase de G_1 (G_{1c}), o **Ensamblaje**, en donde se da un movimiento de enzimas dentro del núcleo y su organización dentro de un complejo que cataliza la síntesis que se requerirá dentro de poco tiempo (67).

CRECIMIENTO TUMORAL Y CaCu

El crecimiento celular, está regulado por procesos que responden a las necesidades del cuerpo. En un organismo joven o en desarrollo la multiplicación celular excede la muerte, pero en un organismo adulto los procesos de nacimiento y muerte celular se producen de una manera balanceada, para mantener un equilibrio que permitan mantener el *status quo* del individuo. Para algunos tipos celulares humanos, la tasa de renovación es rápida, como sucede en el caso de las células intestinales y ciertos tipos de células sanguíneas (glóbulos blancos), cuya vida media es de pocos días, antes de ser reemplazadas. En contraste, existe otro grupo de células sanguíneas como los glóbulos rojos que tienen aproximadamente una vida media de 100 días, e incluso existen células que tienen un número mínimo de divisiones (células hepáticas y/o musculares), o que no se dividen durante toda la vida del organismo, como sucede con las células nerviosas (68)

Muy ocasionalmente el estricto mecanismo que regula la multiplicación celular se rompe, y llega a generar un crecimiento nulo o desmedido de las células, aún cuando el organismo no lo requiera

Una manifestación del crecimiento desmedido sucede en el caso del cáncer. Las células cancerosas presentan diversas propiedades que las hacen peligrosas para el huésped, incluyen a menudo la capacidad de invadir otros tejidos y de inducir la vascularización capilar (69). Sin embargo, uno de los rasgos característicos de las células cancerosas estriba en que responden de manera anormal a los mecanismos de control que regulan la división de las células normales y continúan dividiéndose de una forma incontrolada dañando el órgano invadido o inclusive provocando la muerte del huésped

Las células cancerosas continúan dividiéndose en cultivo, más allá del punto en que las células normales se detienen por inhibición por contacto, proliferando y encimándose incluso cuando ya no pueden extenderse sobre la superficie de la placa de cultivo (65). A diferencia de las células normales, las células tumorales requieren de menos concentraciones de factores estimuladores de la proliferación, generalmente proporcionados por el suero (69), e incluso se ha reportado que estas células son capaces de producir sus propios factores mitogénicos y garantizar con ello su sobrevivencia (4).

Las células cancerosas son clasificadas clínicamente, dependiendo del órgano en que tienen su origen o del tejido del cual son derivadas. Al mismo tiempo existen diferentes grados de transformación celular en un mismo cáncer, como sucede con el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu)

El CaCu, es uno de los cánceres de mayor incidencia y es la principal causa de muerte entre las enfermedades neoplásicas de mujeres mexicanas. Los tumores de cervix se desarrollan a partir de precursores preinvasivos que pueden existir por varios años sin generar algún síntoma que permita detectar su presencia (asintomático). Las anomalías tempranas del cervix conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), se diagnostican generalmente en mujeres de entre 30 y 40 años de edad y para que un NIC evolucione a CaCu se requiere de un periodo de entre 5 y 10 años.

Los carcinomas (origen epitelial) tienen una alta capacidad de diseminarse y para que esto suceda se requieren 10 años para que las células transformadas penetren en la membrana basal e invadan otros tejidos, una vez ocurrido esto, es probable que la paciente muera entre los 2 y 5 años siguientes (70).

La etiología del CaCu, es desconocida, pero estudios epidemiológicos muestran que el riesgo de cáncer cervical está fuertemente asociado con el inicio de la actividad sexual a edad temprana de la mujer, con el número de compañeros sexuales y por la alta multiparidad (71).

Otros factores de riesgo incluyen compuestos del tabaco, que han sido encontrados en la mucosa cervical, el uso de anticonceptivos orales y depresores del sistema inmune, así como dietas bajas en carotenos y vitaminas C y A (72). El CaCu está directamente asociado con la infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV: del inglés Human Papilloma Virus), que forma parte de una amplia familia de virus que induce tumores epiteliales y fibroepiteliales. El tipo de lesión causada difiere entre los tipos de virus, por ejemplo el HPV1 es el responsable de papilomas plantares, mientras que el HPV6 causa lesiones benignas de laringe.

En el caso del CaCu los HPV tipos 16 y 18 se han catalogado como agentes causales y sus ADNs han sido detectados en un 90% de las biopsias (73).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mecanismo de regulación de la proliferación celular intervienen un variado número de elementos que llevan a la célula a un estado de división o de quiescencia. Dentro de estos elementos reguladores se encuentran factores físicos (temperatura, humedad), químicos (pH, concentración de iones) y biológicos (moléculas producidas por las propias células y que tienen efecto autócrino y/o parácrino), que integrados bajo ciertas condiciones y en un determinado microambiente dan a las células las condiciones propicias para su regulación.

En el caso particular de las células epiteliales y fibroblásticas, estirpes celulares que se encuentran en casi todos los órganos y que guardan una estrecha interrelación, se pensaba que el proceso de su división celular era únicamente detenido cuando la membrana plasmática de una célula tenía contacto con la membrana de otra por un evento conocido como inhibición del crecimiento dependiente de la densidad.

Investigaciones recientes han mostrado que la inhibición de la proliferación no sólo está relacionada con la densidad celular, sino que también presenta relación con la secreción de moduladores biológicos (mitógenos e inhibidores), de los cuales sólo algunos se encuentran completamente carecterizados. No obstante la información generada, aún no es claro cuáles y cuántos son los factores de crecimiento que intervienen en la regulación de la división de estas dos estirpes celulares y de qué manera ejercen su acción, por lo que es necesario realizar estudios que aporten información al respecto.

En base al hecho de observar que los fibroblastos de cérvix normal humano detienen su proliferación no sólo por inhibición por contacto, sino también por la secreción de un factor con actividad inhibitoria de la proliferación presente en el medio condicionado de estas células, surge la necesidad de estudiar dicha actividad inhibitoria, con el objeto de aportar información que permita determinar algunas de las características bioquímicas del factor, así como su acción en el ciclo celular de estas células. La información generada contribuirá a entender de una forma más adecuada, el mecanismo de regulación de la división celular de estas células.

HIPÓTESIS.

Es conocido que la división celular está regulada por factores de reguladores de la proliferación celular (mitógenos e inhibidores), que son secretados por diferentes tipos de células, y cuya acción puede ser autócrina o parácrina; también se sabe que las células fibroblásticas y epiteliales son capaces de parar su división cuando han llegado a una fase de confluencia que les confiere un estado de quiescencia. Se ha reportado a su vez, que fibroblastos provenientes de diversos órganos son capaces de secretar factores proteicos con actividad inhibidora de la proliferación, actividad que que en la mayoría de los casos es ejercida en la fase G1 del ciclo celular. En base a lo anterior, podría esperarse que las células fibroblásticas provenientes de cérvix humano sean capaces de secretar su propio factor con actividad inhibidora de la división cuya actividad pueda ser autócrina o parácrina, y que al igual que los inhibidores ya descritos en la literatura ejerza su efecto en la fase G1 del ciclo celular.

OBJETIVOS GENERALES

- Purificar parcialmente la actividad inhibidora de la proliferación (FIP) presente en el medio condicionado de cultivos de fibroblastos confluentes, provenientes de cérvix humano.
- Determinar si el FIP ejerce su acción en la fase G1 del ciclo celular de fibroblastos provenientes de cérvix humano

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer cultivos confluentes de fibroblastos provenientes de cérvix humano y obtener el Medio Condicionado (MCF)
- Purificar parcialmente el Factor Inhibidor de la Proliferación (FIP) y determinar algunas de sus características bioquímicas básicas (Peso Molecular, Punto Isoeléctrico, Fuerza Iónica).
- Comparar la actividad inhibidora de la proliferación presente en el medio condicionado de cultivos de fibroblastos confluentes con la actividad o efecto que ejercen el Interferón gama (IFN γ), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), Factor de Crecimiento Transformante tipo beta (TGF β) o Interleucina 1 beta (IL-1 β) sobre fibroblastos en fase de crecimiento exponencial
- Determinar mediante análisis de Elisa e Inmunoelctrotransferencia si en el medio condicionado proveniente de cultivos de fibroblastos confluentes se detectan las citocinas antes mencionadas.
- Determinar el tiempo que dura el ciclo celular de fibroblastos de cérvix, así como la duración de la fase S
- Establecer si el FIP actúa en la fase G1 del ciclo celular de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano.

METODO

Obtención de fibroblastos normales a partir de biopsias de cérvix

Los fibroblastos de cérvix humano fueron obtenidos de biopsias de tejido de cérvix, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a cáncer cérvico-uterino (casi siempre miomatosis uterina). Una vez obtenida la pieza quirúrgica, el fragmento de cérvix fue transportado en medio de cultivo RPMI al 20% de suero fetal de bovino (SFB) a 4°C, y se procesó durante las siguientes 2-3 h.

El procesamiento consistió en fragmentar el tejido en trozos pequeños (5 mm) y depositarlo en un matraz erlenmeyer de 50 ml que contenía 15 ml de tripsina al 0.05% en solución salina de verseno y un agitador magnético. El matraz se colocó en un baño con agua a 37°C y en agitación durante 15 min. Después de este tiempo, el sobrenadante se decantó en un embudo con malla y se colectó en un tubo cónico que contenía 1 ml de SFB.

A continuación al tejido remanente, se le adicionan otros 15 ml de tripsina al 0.05% en verseno y se llevó a baño de agua a 37°C en agitación constante por otros 15 min. Al término de este tiempo, la suspensión celular contenida en el sobrenadante fue filtrada a través de un embudo con malla y recolectada en un tubo cónico.

Los tubos que contenían los filtrados se centrifugaron a 500 g durante 5 min. Una vez centrifugado, se retiró el líquido sobrenadante mediante decantación y al botón celular resultante fue resuspendido en 5 ml de medio nutritivo RPMI suplementado con 10% de SFB. La suspensión celular fue sembrada en cajas de cultivo de 5 ml (COSTAR) y mantenida en una incubadora Scientific al 5% de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío durante 24 h. Al cabo de este tiempo se realizó un cambio de medio por medio nuevo (RPMI al 10% SFB), de manera que sólo permanecieran en el cultivo las células adheridas. Después de 5 a 7 días se obtienen cultivos celulares de fibroblastos (mezclados con pocos epitelios), que son resembrados con la finalidad de obtener una población celular más homogénea.

La resiembra se realizó cuando las cajas de cultivo presentaron un número celular importante (aproximadamente el 70% de saturación). A las cajas de cultivo se les retiró completamente el medio de cultivo y se les adicionaron 2 ml de tripsina al 0.05% en verseno (para el caso de las cajas COSTAR de 5 ml) dejándolas en esta solución por 3 min en la incubadora. Al cabo de este tiempo la caja de cultivo fue observada en un microscopio invertido para asegurarse que las células estuvieran completamente desprendidas. En seguida, con resuspensión vigorosa se completó la remoción de las células y la suspensión celular fue centrifugada a 500 g durante 5 min. El botón celular fue resuspendido en RPMI al 10% de SFB, para posteriormente distribuir las células en concentraciones de 20,000 células/caja. A esta resiembra se le llama R1.

La siguiente resiembra (R2), se utilizó para ensayos de actividad biológica, cinéticas de proliferación o para obtención de medio condicionado. Las células no se emplearon para ningún tipo de ensayo después de la resiembra 3 (74, 75).

Es importante mencionar que para verificar la normalidad de todas las biopsias obtenidas, en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer se realizó un análisis inmunocitoquímico, así como determinación de citoqueratina y desmogleína, a través de anticuerpos. El análisis inmunocitoquímico mostró que las biopsias procesadas son normales al no presentar ninguna alteración en sus capas basales. El análisis de determinación de desmogleína y citoqueratina sugieren que las células utilizadas en los cultivos no son epitelios, lo que nos hace pensar por exclusión, que se trata de fibroblastos.

Obtención de células tumorales de CaCu CALO e INBL y de la línea celular Mv1Lu.

Las líneas celulares tumorales criopreservadas CALO e INBL, provenientes de dos biopsias diferentes de pacientes con cáncer cervico-uterino (76), así como la línea epitelial de pulmón Mv1Lu se descongelaron y se hicieron crecer en RPMI al 10% de SFB. Las células fueron mantenidas en condiciones de cultivo similares al de las células fibroblásticas y se utilizaron para ensayos de actividad biológica cuando se encontraban en una fase de proliferación exponencial.

Evaluación de la Proliferación Celular mediante la técnica de Cristal Violeta

El colorante cristal violeta, posee características alcalinas, que le permite incorporarse a los núcleos celulares. El número de núcleos teñidos aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida (77). El ensayo se evaluó con un cultivo control que no recibe ningún estímulo, y se realizó de la siguiente manera:

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% (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 o bidestilada (de manera que el colorante no incorporado sea retirado), para posteriormente secarse al aire y a temperatura ambiente. A las cajas de cultivo se les añadió ácido acético al 10% (que remueve el colorante de los núcleos celulares), dejando en agitación durante 20 min, para finalmente leer la absorbancia a 590 nm.

Para conocer las concentraciones celulares, los valores obtenidos fueron extrapolados en una curva patrón en donde se sembraron números celulares conocidos, de manera que los resultados pudieran ser evaluados en una regresión lineal. También, los valores de absorbancia se relacionaron con el cultivo control.

Cinética de Proliferación

Esta técnica se empleó para determinar el tiempo de doblaje de los fibroblastos de cérvix normal humano. Para ello, se sembraron por quintuplicado 2500 células/pozo, en placas de 96 pozos en 100 µl de medio de cultivo al 10% de SFB. La densidad celular fue determinada cada 24 h durante 10 días por medio de la técnica colorimétrica de incorporación de cristal violeta.

El tiempo de doblaje se determinó interpolando dos puntos en la fase exponencial de proliferación, (la manera en como se realizó se describe en el apéndice).

Ensayos de actividad biológica

La actividad inhibidora presente en el MCF se determinó mediante ensayos experimentales en los que se evaluó cada uno de los MCF sobre el cultivo de células fibroblásticas o tumorales en fase exponencial. Para cada cultivo inducido se determinó el número y se comparó con un control al que no se aplicó inductor.

Para el caso de los ensayos en que el efecto del Factor Inhibidor de la Proliferación se comparó con el de inhibidores ya reportados, se emplearon fibroblastos en crecimiento exponencial y a los cultivos se les aplicó 10, 1 y 0.1 ng/ml de EGF; 10, 1 y 0.1 ng/ml de TNF α , 1, 0.1 y 0.01 ng/ml de IL-1 β , 50, 5 y 0.5 U/ml de IFN γ y 10, 1 y 0.1 ng/ml de TGF β . Después de cuatro o cinco días en cultivo, se evaluó el porcentaje de proliferación mediante la técnica de cristal violeta, comparándolos con un control libre de inductor.

Evaluación de Proliferación por incorporación de Timidina Tritiada

Esta técnica consiste en la asimilación del nucleótido timidina (marcado con tritio -3H-) al ADN de las células en cultivo, de manera que cuando las células se encuentren en fase de síntesis, incorporen la timidina marcada. Cuando se realiza este tipo de evaluación es recomendable emplear cultivos celulares sincrónicos, con la finalidad de obtener una mayor representatividad de la población celular en la fase de síntesis del ciclo celular.

La técnica consistió en sincronizar la población celular mediante eliminación de SFB del cultivo por 36 h, para posteriormente sembrar el número adecuado de células y adicionar a cada pozo o plato de cultivo 1 μ Ci de 3H-timidina (Amersham, actividad 185mbq) por mililitro de medio de cultivo. El tiempo de adición del isótopo puede variar de acuerdo con las condiciones del experimento. Después de concluido el tiempo de cultivo celular las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), posteriormente se les agregó metanol al 95% en PBS durante 20 min, y nuevamente se lavaron con PBS. Una vez lavadas, se agregó NaOH 0.4M de manera que por lisis celular se liberara el ADN marcado con la timidina incorporada. El lisado celular (que

contenia el ADN marcado con timidina tritiada) se colectó en filtros de fibra de vidrio (Brandel FP-30) a través de una cosechadora, la cual permite eliminar la timidina no incorporada que se encuentra en el sobrenadante. Los filtros que contenían el ADN de las células que incorporaron el isótopo, fueron secados a temperatura ambiente y posteriormente colocados en viales para centelleo, que contenían trisól o líquido de centelleo, que se emplea para amplificar las lecturas del material incorporado. Finalmente los viales fueron leídos en un contador de centelleo de emisión Beta (Beckman LS6500) (78)

Determinación de la primera fase de síntesis de ADN del ciclo celular de fibroblastos de cérvix humano

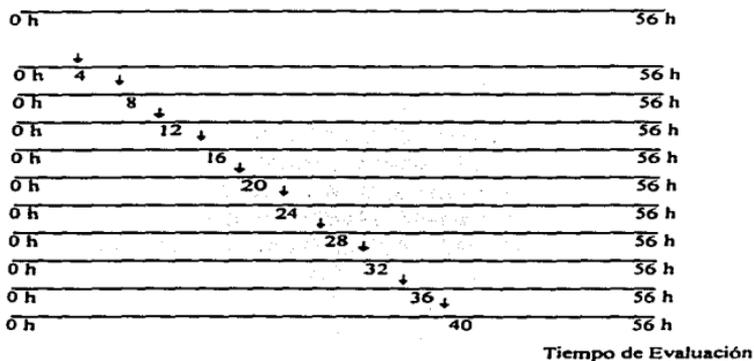
Esta técnica se realizó empleando cultivos de fibroblastos de cérvix en R2, que previamente se sincronizaron por eliminación de SFB del cultivo por 36 h

En cajas de cultivo de 24 pozos, se sembraron 5,000 fibroblastos/pozo en 1 ml de RPMI al 10% de SFB. En el momento de la siembra (tiempo 0) los primeros cuatro pozos fueron sembrados con timidina tritiada a una concentración de 1 $\mu\text{Ci/ml}$ (primer pulso). Después de 4 h de cultivo las células pulsadas fueron fijadas con metanol al 95% y los siguientes cuatro pozos se pulsados como en el caso anterior, los pozos fueron fijados con metanol al 95% en las siguientes 4 h. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar un periodo de 72 h, para finalmente evaluar el ensayo empleando la técnica de Evaluación de Proliferación por incorporación de Timidina Tritiada, descrita anteriormente

Determinación del efecto del FIP en la fase G1 del ciclo celular de fibroblastos de cérvix humano.

En cajas de cultivo de 24 pozos se sembraron 10,000 fibroblastos en RPMI al 10% de SFB. De estas cajas, se tomaron 4 pozos cada 4 h y se les aplicó MCF entre 20 y 30 kDa producto de 30 separaciones cromatográficas en Sephacryl S 100. Los cultivos

a los que se aplicó MCF (a las 4, 8, 12, etc hasta 40 h) fueron nuevamente incubados, hasta completar un periodo de 56 h, de manera que para este tiempo se habían realizado 10 pulsos con MCF en intervalos de 4 h, en los que se tenía representado el crecimiento del cultivo hasta iniciada la primer fase de síntesis (dato aportado en la evaluación antes mencionada). La manera en como se realizó el ensayo se muestra en el siguiente esquema. La flecha indica el tiempo en que se aplicó el MCF.



A todas las cajas de cultivo se les aplicó 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de Timidina Tritiada desde el inicio del experimento y fueron evaluadas por el método de Evaluación de la Proliferación por incorporación de Timidina Tritiada mencionado anteriormente.

Obtención de Medios Condicionados

Los medios condicionados de fibroblastos (MCF) de cérvix normal humano se obtuvieron después de que las células en cultivo llegaron a la fase de confluencia. El

medio se centrifugó a 1000 g para retirar el detrito celular y se almacenó a 4°C en recipientes de vidrio estériles, hasta el momento de iniciar el procedimiento de purificación.

Tratamiento del MCF con tripsina, temperatura y ácido.

El MCF fue tratado con la proteasa tripsina al 0.05% en verseno, durante 30 min a 37°C. Al cabo de este tiempo, la actividad de la tripsina fue neutralizada con SFB para posteriormente evaluar su actividad inhibitoria.

Paralelamente, otra cantidad de MCF fue sometido al contacto con ácido acético al 10 y 40% (10 y 40% AA) por 30 min a temperatura ambiente, y finalmente otra muestra de MCF fue calentado a 60 y 100°C durante 30 min

Todos los MCF fueron concentrados por liofilización y posteriormente se midió actividad inhibitoria de la proliferación sobre fibroblastos en crecimiento exponencial. El ensayo se evaluó mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta.

Purificación del Medio Condicionado:

Precipitación del MCF con Sulfato de Amonio.

A 500 ml de MCF con suero se les agregaron 156 gr de sulfato de amonio, el pH fue ajustado a 7.2 y el MCF se mantuvo en agitación constante durante 30 min. Una vez concluido este tiempo el MCF se centrifugó durante 30 min a 17,700 g's. Al sobrenadante obtenido, se le adicionaron 107 gr de sulfato de amonio, se ajusto el pH a 7.2 y nuevamente se agito durante 30 min. El MCF fue centrifugado a 17,700 g's durante 30 min, y el precipitado (en el que se encuentra la actividad inhibitoria de la proliferación), fue recuperado en un tubo cónico.

Diálisis y Concentración del MCF precipitado al 80%.

El precipitado obtenido del paso anterior de purificación, se colocó en una bolsa de diálisis con poro de 1 kDa, (Spectra/Por MWCO 1000) y se introdujo en un recipiente que contenía agua en una proporción de 1000 veces el volumen contenido en la bolsa de diálisis.

El agua fue cambiada cada 2 h durante las primeras 6 h, después cada 12 h hasta alcanzar un periodo de 48 h. Por último, el agua se cambió por PBS diluido 1:4 en agua en donde el MCF se dejó dializando por otras 8 h.

Una vez concluido este tiempo el contenido de la bolsa de diálisis se recuperó en un tubo de centrifuga, y se concentró 100 veces por medio de liofilización en un SpeedVac (SAVANT AES2000).

Cromatografía de Exclusión Molecular.

Una columna cromatográfica de 35 cm de altura y 1.5 cm de diámetro fue empacada con la resina Sephacryl S-100 (Pharmacia Biotech), la columna se equilibró con solución salina (PBS) isotónica pH 7.0 y se calibró con moléculas de peso molecular conocido. Después de esta calibración se determinaron por medio de regresión lineal, los intervalos de elusión de las proteínas de acuerdo con su peso molecular.

En la columna antes mencionada se aplicaron 15 µl del MCF precipitado con sulfato de amonio concentrado 100 veces y las proteínas eluidas fueron colectadas en intervalos de peso molecular (>40 kDa, entre 40 y 30 kDa, entre 30 y 20 kDa y < 20 kDa), de acuerdo con los datos de la regresión lineal realizada inicialmente.

Se realizaron 30 separaciones cromatográficas consecutivas, y se colectaron todas juntas de acuerdo con sus intervalos de peso molecular (pool). Los pools de peso molecular obtenidos fueron concentrados por liofilización, hasta obtener 500 µl de volumen final.

Cromatografía de Intercambio Iónico (catiónico y aniónico).

Una columna cromatográfica de 35 cm de alto y 1.5 cm de diámetro se empacó con la resina de intercambio aniónico DEAE Sephacel (SIGMA), o bien con resina de

intercambio catiónico Sulfopropil Sephadex (SIGMA), cada columna se equilibró con Tris 5 mM pH 7.4 o citrato de sodio 5 mM pH 5.4 respectivamente.

En cada uno de los intercambiadores se aplicaron 15 µl de MCF precipitado al 80% y concentrado 100 veces. La elusión de 30 separaciones cromatográficas en cada columna se agrupó de la siguientes manera: fracción no retenida, fracción retenida eluida con 0.015 a 0.175M de NaCl y fracción retenida eluida con 0.2 a 0.5M de NaCl. Todas las fracciones se concentraron por medio de liofilización, hasta obtener 500 µl de volumen final.

Después de cada paso de purificación, se evaluó actividad biológica por medio de la técnica colorimétrica de cristal violeta. Así mismo se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida SDS y se cuantificó la concentración de proteínas.

Cuantificación de Proteínas.

La concentración de proteínas fue evaluada con un equipo de detección de los aminoácidos cistina, cisteína, triptófano y tirosina, los cuales forman un color púrpura cuando reaccionan con ácido bicinónico (BCA) en combinación con el método de Biuret (BCA Protein Assay Reagent PIERCE). El color obtenido exhibe una fuerte absorvancia a 562 nm y las lecturas de las muestras fueron comparadas con una curva patrón de albúmina sobre la cual se hizo la determinación (79).

Electroforesis.

La electroforesis en geles de poliacrilamida SDS se realizó de acuerdo al método de Leammli (80), excepto que la concentración del gel concentrador fue de 4.5%. Las concentraciones finales en el gel separador fueron de 0.375 M Tris-HCl (pH 8.9 y 0.1% de SDS, y al 12.5%). Los geles se polimerizaron por la adición de 0.05% de persulfato de amonio y tetramileno-diamina (TEMED). Las muestras se disolvieron en una solución que contenía 100 mM de Tris-HCl pH 6.8, 1% de SDS, 10% de glicerol, 50

mM de DTT y 0.01% de azul de bromofenol. La electroforesis fue realizada con voltaje constante de 100 V por 2 h empleando marcadores de peso molecular conocido: fosforilasa b (94kDa), albúmina sérica bovina (67kDa), ovalbúmina (43kDa), anhidrasa carbónica (30kDa), inhibidor de soya (20.1kDa) y α -lactalbúmina (14.4kDa).

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y con la técnica de tinción con plata (Color Silver Stain PIERCE), la cual permitió teñir proteínas que se encontraban en concentraciones de nanogramos (81).

Inmunoelectrotransferencia

Las proteínas (en este caso las citocinas evaluadas), fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa según el método de Kyhse-Andersen (82), en un aparato de transferencia en húmedo a corriente constante de 100 mA durante 2 h. La eficiencia de la transferencia se determinó mediante tinción de la membrana de nitrocelulosa con Ponceau S y destañada con agua destilada. La nitrocelulosa que contenía las proteínas inmovilizadas fue bloqueada con 5% de leche semi-descremada en solución amortiguadora TBS durante toda la noche a 4°C. Las membranas se incubaron con los anticuerpos correspondientes a cada citocina en TBS al 5% durante 2 h a temperatura ambiente para luego ser lavada cinco veces con TBS durante 10 min cada lavado. Posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina diluido en TBS-5% de leche, incubándolo durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana ésta fue revelada en 5 ml de solución amortiguadora de fosfatasa alcalina que contenía 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato y azul de tetrazolio. La reacción se detuvo después de 15 min lavando con agua destilada.

Ensayo de Elisa.

Cien μ l de MCF fueron colocados en una placa de cultivo de 96 pozos durante 24 h, al cabo de este tiempo se agregó el anticuerpo primario (anti IL-1 β , anti TGF β , anti TNF α) empleando diferentes diluciones. Este anticuerpo se dejó incubar 1 h a 37°C,

para posteriormente lavar con PBS-Tween 20. Seguido de este lavado se incubó con 100 μ l de anticuerpo secundario por 1 h a 37°C, nuevamente se lavó con PBS-tween 20 y finalmente se adicionaron 100 μ l de dihidrocloruro de α -fenilendiamina (OPD) manteniéndolo en oscuridad por 10 min, después la reacción es detenida con 25 μ l de H₂SO₄ y el ensayo se evalúa en un lector de microplacas ELISA a una longitud de onda de 490 nm

En el ensayo se empleó un control positivo, en donde al MCF le fue adicionada la citocina a evaluar. Así mismo se empleó un control negativo, en donde sólo se dirigió el anticuerpo secundario, con la finalidad de eliminar los posibles errores provocados por alguna unión inespecífica del anticuerpo secundario (83)

Todos los experimentos referidos en este trabajo fueron realizados al menos por triplicado y con un número mínimo de tres repeticiones.

Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales fueron sometidos a dos pruebas estadísticas, una denominada ANDEVA o análisis de varianza, que establece un valor medio 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 o no; la segunda prueba denominada Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher, se realiza cuando el análisis de varianza indica que existe diferencia entre las medias de dos o más poblaciones, indicándonos entre que pares de medias existe esta diferencia.

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

RESULTADOS

En nuestro modelo de estudio, los fibroblastos de cérvix normal humano, muestran una inhibición de la proliferación cuando los cultivos han llegado a la fase de confluencia, no obstante, existen áreas donde las células tienen espacio para seguir proliferando y sin embargo no lo hacen. Este hecho sugiere que el paro de la división de estas células, no sólo se da por el contacto entre ellas, sino además por la participación de factores solubles con actividad inhibidora.

Para confirmar esta sugerencia, se determinó el efecto del medio condicionado (MC) de fibroblastos confluentes sobre cultivos de fibroblastos en crecimiento exponencial, encontrando que dicho medio presenta actividad inhibidora.

El haber encontrado que los fibroblastos producen un factor con actividad inhibidora de la proliferación (FIP), genera una serie de preguntas tales como la producción del FIP es secretada cuando las células se encuentran en un estado de confluencia, es decir en un contacto estrecho entre célula y célula, o qué características fisicoquímicas presenta este factor; entre otras. Para dar respuesta a algunas de estas cuestiones, en este trabajo se evaluó si el efecto inhibitorio está relacionado con la densidad celular, para lo cual se sembraron la misma cantidad de fibroblastos en cajas de diferente área de cultivo, generando cultivos con diferentes grados de contacto entre las células (mayor cuando el área era menor). Se colectó el MCF a las 24 y 72 hrs, para evaluar la presencia del FIP (Figura 1).

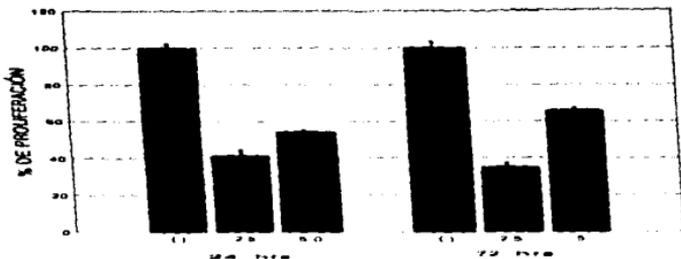


Figura 1. Determinación de la actividad inhibidora de la proliferación con respecto al contacto celular. 1×10^6 fibroblastos fueron sembrados en cajas de cultivo de 2.5 y 5 cm de diámetro durante 24 y 72 hrs. El medio condicionado obtenido de estos cultivos fue concentrado y la actividad inhibidora fue evaluada sobre cultivos de fibroblastos en crecimiento exponencial. (-) Fibroblastos en crecimiento exponencial, (2.5 y 5): fibroblastos en crecimiento exponencial más el MCF obtenido de cultivos de cajas de 2.5 y 5 cm de diámetro respectivamente.

El ensayo demostró que la actividad inhibidora presente en el MCF es claramente mayor cuando las células se encuentran en el cultivo de menor área, o sea en un estrecho contacto, por lo que se podría pensar que la actividad inhibidora está directamente relacionada con la densidad celular.

Conociendo que la mayoría de los factores con actividad inhibidora de la proliferación hasta ahora conocidos son glicoproteínas, el MCF fue sometido a un tratamiento: con tripsina (0.05% durante media h), con 10 y 40% de ácido acético (10 y 40% A:A) y a 60° y 100 °C durante 30 min, y así determinar si estas condiciones que se sabe desactivan proteínas, suprimen o disminuyen la actividad inhibidora presente en este medio. (Figura 2). Basados en que se sabe que estas glicoproteínas tienen bajo peso molecular, se utilizó una fracción del MCF entre 20 y 30 kDa, obtenida por cromatografía de exclusión molecular.

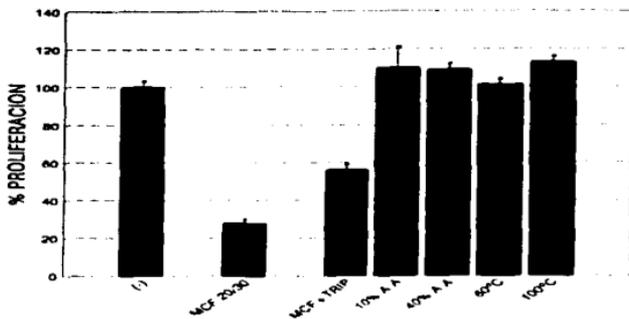


Fig. 2 Efecto de la tripsina, el ácido acético y la temperatura sobre la actividad inhibidora presente en el MCF. (-) Control; (MCF 20/30) Fracciones cromatográficas de MCF entre 20 y 30 kDa eluidas por exclusión molecular; (MCF+TRIP) MCF incubado con tripsina al 0.05% por 30 minutos. (10% A.A y 40% A.A) MCF incubado por 30 minutos con el 10% y 40% de ácido acético respectivamente. (60°C y 100°C) MCF calentado durante 30 minutos a 60° y 100°C respectivamente. La evaluación se realizó sobre la proliferación de fibroblastos de cérvix humano en crecimiento exponencial, con 15µl de MCF (a los que se aplicó algún tratamiento) en un volumen final de 100 µl. El ensayo se evaluó con la técnica de cristal violeta.

Los resultados muestran que el MCF sin tratamiento tiene una actividad inhibidora del 72% (control positivo), mientras que en el caso del MCF tratado con tripsina, la actividad se reduce a un 44%. En el caso del MCF tratado con 10 y 40% de ácido acético, así como a 60 y 100°C, la actividad inhibidora es bloqueada totalmente. Estos datos sugieren que la actividad inhibidora de la proliferación presente en el MCF confluentes es llevada a cabo por una molécula de naturaleza proteica

Para caracterizar la molécula que presenta la actividad inhibidora de la proliferación en el MCF, es necesario establecer una metodología de purificación, que nos permita obtener a dicha molécula lo más pura posible. Como las condiciones en que se encuentra dicha actividad es un medio complementado con suero, (el cual contiene una gran cantidad

de proteínas séricas) y basados en que las proteínas tienen la capacidad de solubilizarse o precipitar bajo determinadas concentraciones de sal, se procedió a determinar en que porcentaje de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) precipita la actividad inhibidora de la proliferación (Figura 3)

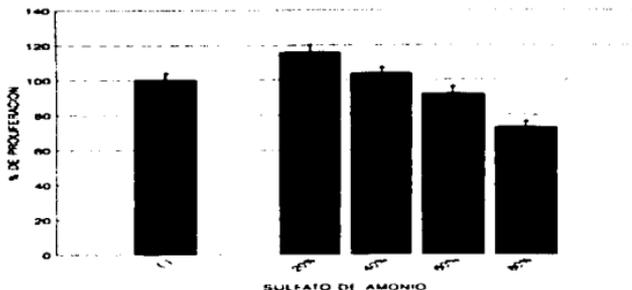


Figura 3 Determinación del porcentaje de sulfato de amonio, requerido para precipitar la actividad inhibidora de la proliferación presente en el MCF (-) Control, (20, 40, 60, y 80%) MCF precipitado con sulfato de amonio al 20, 40, 60 y 80% respectivamente. Los precipitados fueron evaluados en cultivos de fibroblastos en crecimiento exponencial, con 15 μl del precipitado en un volumen final de 100 μl .

Los resultados mostrados en la Figura 3, establecen que la actividad precipita con una concentración mayor al 40% de sulfato de amonio, por lo que se decidió realizar una precipitación inicial al 50% que nos permite retirar parte de las proteínas contenidas en el MCF, para luego proceder al precipitado al 80%

Una vez obtenida la fracción del MCF precipitada al 80% con sulfato de amonio, concentrada 100 veces por liofilización y dializada contra PBS, el MCF se pasó a través de una columna de exclusión molecular Sephacryl S-100, en un cromatógrafo de alta presión, con el fin de obtener el rango de peso molecular en que la proteína inhibidora de la proliferación eluye. Se realizaron 30 separaciones cromatográficas y las fracciones obtenidas fueron agrupadas en los siguientes intervalos de peso molecular: mayores a

40kDa, entre 40 y 30 kDa, entre 30 y 20kDa y menores a 20kDa. Estos intervalos fueron elegidos, basándose en resultados previos, en los que el MCF había sido fraccionado en membranas de corte de amicon de 30 kDa, y la actividad se registró en la fracción menor a 30 kDa. Una vez obtenidos los grupos de fracciones de peso molecular, se procedió a determinar en que fracción se encontraba la actividad inhibidora (Figura 4)

Los resultados muestran que todas las fracciones presentan actividad inhibidora, comportamiento que no es de sorprenderse ya que se trata de una cromatografía preparativa donde las curvas que representan la elusión de las proteínas presentes se traslapan, mostrando una mayor actividad en donde la proteína se encuentra en mayor concentración. La actividad mostrada en las fracciones mayores a 40kDa, fue de 20%, las fracciones entre 30 y 40 kDa de 40%, mientras que la fracción con peso molecular entre 20 y 30 kDa presenta una actividad inhibidora del 60%, sugiriendo que la proteína con actividad inhibidora de la proliferación se encuentra en este rango de peso molecular. Estas mismas fracciones se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5% y aunque se encontró un patrón de bandeo similar, la proporción de las bandas es diferente de acuerdo con cada una de las fracciones, esta observación concuerda con la suposición de que las curvas de elusión se encuentran traslapadas (Figura 5). Lo importante de esta metodología es que nos permite enriquecer a la proteína con actividad inhibidora. El hecho de observar las bandas de proteínas entre 20 y 30 kDa sólo con tinción de plata, indica que éstas son secretadas en cantidades de nanogramos.

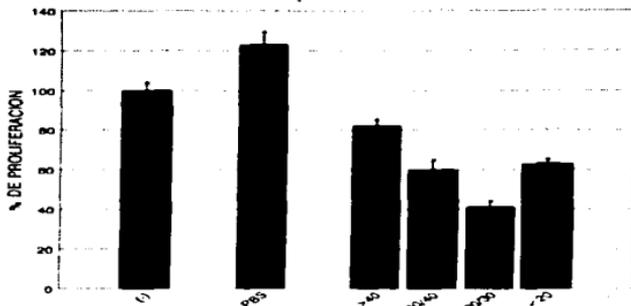


Figura 4 Determinación del rango de peso molecular en que cluye la actividad inhibidora presente en el MCF después de ser separado en cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-100) (-) Control; (PBS). Solución amortiguadora de fosfatos diluido 1:4 en agua, (>40, 30/40, 20/30 y <20): fracciones del MCF con peso molecular mayor a 40 kDa, entre 30 y 40 kDa, entre 20 y 30 kDa y menor a 20 kDa respectivamente. Evaluación realizada sobre la proliferación de fibroblastos de cérvix humano en crecimiento exponencial con 15µl de cada una de las fracciones en un volumen final de 100µl. Evaluación con cristal violeta.



Figura 5 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5%, en condiciones reductoras. Carril 1, MCF entre 20 y 40 kDa (tinción con azul de Coomassie); Carril 2, Proteínas calibratoras (tinción con azul de Coomassie); Carril 3, MCF entre 20 y 40 kDa (tinción con plata); Carril 4, Proteínas calibratoras (tinción con plata). En los carriles 1 y 3 se aplicaron 25 µg de proteína total.

Para continuar con el proceso de purificación de la proteína inhibidora y conociendo que todas las proteínas tienen un punto en el que presentan la misma cantidad de cargas positivas que negativas, se procedió a eluir el MCF precipitado al 80% concentrado 100 veces a través de columnas de intercambio iónico (aniónico y catiónico) encontrando los siguientes resultados (Figura 6)

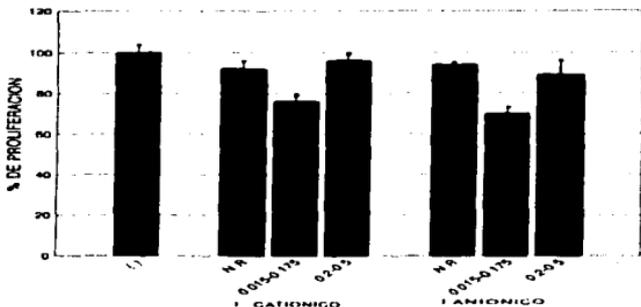


Figura 6. Evaluación de la actividad inhibidora presente en las fracciones del MCF eluidas con diferentes gradientes de cloruro de sodio en Intercambiadores iónicos. (C) Control, (NR) fracción no retenida en cada uno de los intercambiadores. (0.015-0.175 y 0.2-0.5): fracciones que eluyeron con un gradiente de cloruro de sodio de 0.015 a 0.175M y de 0.2 a 0.5 M respectivamente en cada uno de los intercambiadores. La determinación se realizó en fibroblastos de cérvix en crecimiento exponencial donde se aplicaron 15 μ l de cada una de las fracciones obtenidas de los intercambiadores, en un volumen final de 100 μ l. Evaluación con cristal violeta.

Como se observa en la Figura 6, el MCF separado en el intercambiador catiónico a pH de 5.4, mantuvo la actividad inhibidora en la parte retenida de la columna, actividad que fue eluida en una concentración de cloruro de sodio de 0.015 a 0.175 M. El mismo comportamiento fue observado en la muestra eluida en el intercambiador aniónico a pH de 7.4. Estos resultados indican que la proteína inhibidora de la proliferación presenta carga

positiva a pH de 5.4 y una carga negativa a pH de 7.4, sugiriendo con esto que el punto isoeléctrico de la proteína puede encontrarse en este rango de pH.

Con respecto al proceso de purificación antes mencionado, es de esperarse que la actividad se incremente conforme se incrementa el grado de pureza del FIP. Esto se observa en la Tabla 1, en la que a mayor coeficiente de purificación, mayor rango de actividad inhibitoria de la proliferación, tanto en la cromatografía de exclusión molecular como en los intercambiadores iónicos

Tipo de Medio	Proteínas (mg/ml)	Actividad Inhibidora (%)	Coefficiente de purificación.
MCF total	2.5	5-15	0
MCF pp 80% (100)	4.2	53-69	60.7
MCF 20/40	3.8	52-74	301.3
Int. Aniónico (50%)	2.8	52-54	490
Int. Cationico (50%)	3.3	18	260

Tabla 1. Relación entre la concentración de proteínas, el coeficiente de purificación y la actividad inhibitoria de la proliferación. Concentración inicial total de proteínas: 687.5 mg en 275 ml de MCF.

Simultáneamente al proceso de purificación y conociendo que existen en la literatura moléculas con capacidad de inhibir la proliferación de células fibroblásticas y epiteliales, la actividad del MCF fue comparada con las moléculas inhibitorias mejor caracterizadas hasta el momento, que son: el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF β), el Interferón gamma (IFN γ), y la Interleucina 1 beta (IL-1 β), usando en todos los casos Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) como control positivo, ya que se ha reportado que tiene efecto mitogénico en ambas estirpes celulares (Figura 7).

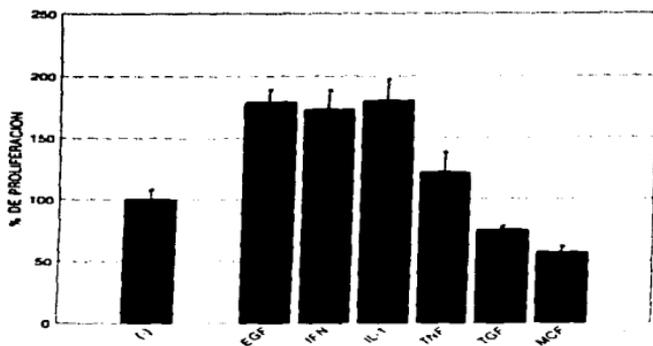


Figura 7. Efecto del IFN γ , IL-1 β , TNF α , TGF β y MCF, sobre la proliferación de fibroblastos de cérvix crecimiento exponencial (-)Control, (EGF) Control positivo 10ng/ml, (IFN γ) Interferon gama 50U/ml, (IL-1 β) Interleucina 1beta 1ng/ml, (TNF α) Factor de Necrosis Tumoral alfa 10 ng/ml, (TGF β) Factor de Crecimiento Transformante beta 10ng/ml, (MCF): Medio Condicionado de Fibroblastos entre 20 y 30 kDa (15 μ l). Evaluación con cristal violeta.

Los resultados indican que el TNF α , el IFN γ , y la IL-1 β presentan un efecto proliferador sobre los fibroblastos, mientras que el TGF β y el MCF presenta una actividad inhibitora de la proliferación que corresponde a un 25% y 43%, respectivamente. No obstante el efecto proliferativo del TNF α , IFN γ e IL-1 β , no podemos descartar que el efecto inhibitor reportado para estas citocinas sea dependiente de la dosis, por lo que fue necesario realizar un ensayo dosis-respuesta para evaluar esta posibilidad.

Los resultados obtenidos en el ensayo de dosis dependiencia (Figura 8), muestran que el TNF α , el IFN γ , y la IL-1 β tienen un efecto proliferador o nulo dependiendo de la concentración de citocina empleada, mientras que el TGF β mantiene su efecto inhibitor de la proliferación de fibroblastos normales, efecto que disminuye conforme se reduce la cantidad de citocina.

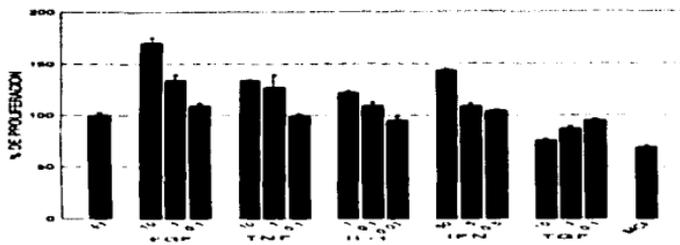


Figura 8. Efecto dosis-respuesta de TNF α , IFN γ , IL-1 β y TGF β sobre la proliferación de fibroblastos de cérvix normal humano en crecimiento exponencial. (-) Control. (EGF) Factor de Crecimiento Epidermal 10, 1 y 0.1 ng/ml, (TNF α) Factor de Necrosis Tumoral alfa 10, 1 y 0.1 ng/ml; (IL-1 β) Interleucina 1 beta 1, 0.1 y 0.01 ng/ml, (IFN γ) Interferón gamma 50, 5 y 0.5 U/ml, (TGF β) Factor de Crecimiento Transformante beta 10, 1 y 0.1 ng/ml, (MCF), Medio Condicionado de Fibroblastos entre 20 y 30 kDa (15 μ l). Evaluación por cristal violeta

En cuanto al efecto dosis dependiente del MCF (Figura 9) , se observa que la actividad inhibitora de la proliferación aumenta gradualmente conforme aumenta la concentración de MCF, llegando a ser de un 55% cuando se utiliza el 100% de MCF.

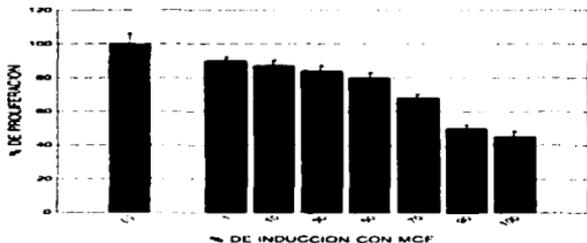


Figura 9: Evaluación dosis-respuesta del MCF, sobre la proliferación de fibroblastos de cervix normal humano en crecimiento exponencial. (-) Control; (1, 10, 30, 50, 70, 90 y 100): Porcentaje de MCF aplicado a un volumen total de 100 μ l. Evaluación por cristal violeta

Con la finalidad de determinar si en el MCF se encuentra alguna de las citocinas anteriormente citadas con actividad inhibidora de la proliferación, se realizaron evaluaciones de Inmunolectrotransferencia y Elisa. Estos ensayos demuestran que en el MCF concentrado 100 veces, no se encuentra TGF β , TNF α e IL-1 β al menos en concentraciones mayores a 6 ng/ml. (Figuras 10 y 11).

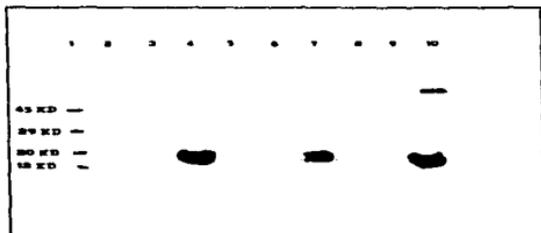


Figura 10. Detección de IL-1 β , TGF β y TNF α a través de la técnica de Inmunolectrotransferencia, en el MCF 100 veces concentrado. (1). Proteínas Calibradoras (45, 29, 20 y 12.4 kDa); (2) 100 ng de TNF α ; (3): 30 ml de MCF; (4): 100 ng de TNF α ; (5): 65 ng de TGF β ; (6): 30 ml de MCF; (7): 65 ng de TGF β ; (8): 100 ng de IL-1 β ; (9): 30 ml de MCF; (10): 100 ng de IL-1 β . En los carriles 3,4,6,7,9 y 10 fué dirigido anticuerpo primario y secundario, y en los carriles 2, 5 y 8 sólo anticuerpo secundario.

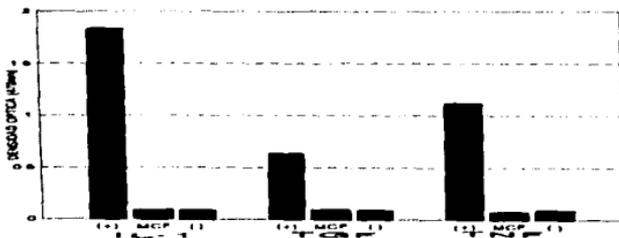


Figura 11. Detección de IL-1 β , TGF β y TNF α mediante la técnica de Elisa en el MCF 100 veces concentrado. (+) Control positivo de IL-1 β , TGF β y TNF α respectivamente; (MCF): evaluación en el Medio Condicionado de fibroblastos 100 veces concentrado; (-): Control negativo de IL-1 β , TGF β y TNF α respectivamente.

El hecho de no detectar TGF β en el MCF con las técnicas de Elisa e Inmunolectrotransferencia, no descarta la posibilidad de que esta citocina se encuentre en cantidades menores a 6 ng. Teniendo como antecedente que el TGF β molécula fue la única citocina capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos al igual que el FIP, se procedió a evaluar el efecto de ambas moléculas sobre la proliferación la línea celular Mv1Lu, cuya característica es que su división celular es dependiente de TGF β , por lo que si en el MCF se encuentra TGF β , la línea Mv1Lu detendrá su proliferación (Figura 12)

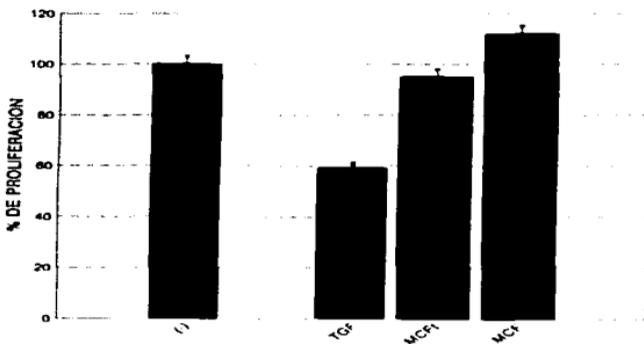


Figura 12. Efecto del TGF β y el MCF sobre la proliferación de la línea celular Mv1Lu en crecimiento exponencial (-) Control; (TGF β) Factor de Crecimiento Transformante beta 10ng/ml. (MCF1): 15 μ l de MCF sin ningún tratamiento de purificación, (MCF) 15 μ l de MCF precipitado al 80% con sulfato de amonio, concentrado 100 veces por liofilización y dializado contra PBS diluido 1:4. Evaluación con cristal violeta.

Los resultados muestran que las células Mv1Lu, que fueron cultivadas en presencia de MCF no inhibieron su proliferación aún cuando éste se utiliza 100 veces concentrado, mientras que las células que fueron cultivadas con TGF β inhibieron su proliferación en un

39%. Estos resultados sugieren que la actividad inhibidora de la proliferación presente en el MCF es debida a una citocina diferente al TGF β .

La actividad inhibidora registrada en los ensayos biológicos del MCF se encuentra en un rango del 40 al 60% de inhibición, lo que establece que de cada 100 células, 40 o 60 de ellas detienen su división, sugiriendo que dicha actividad actúa en una fase específica del ciclo celular. En la literatura se ha publicado que la gran mayoría de los factores inhibidores ejercen su acción en la fase G1 del ciclo celular. Para determinar si el FIP actúa en ésta fase es necesario tener un punto de referencia, que nos indique el momento en que las células comienzan a sintetizar ADN, y con ello saber si el FIP actúa antes o después de este punto.

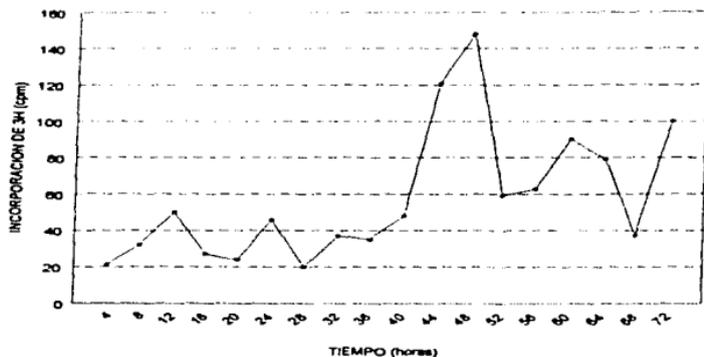


Figura 13. Evaluación de la primera fase de síntesis de ADN en cultivos sincrónicos de fibroblastos de cérvix humano. El ensayo se realizó sembrando 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos. Cada punto en la gráfica representa el promedio de cuatro pozos. Las desviaciones standard son menores al diez por ciento del valor promedio. Este ensayo es el representativo de cuatro.

Como se observa en la Figura 13, los fibroblastos sincrónicos requieren de aproximadamente 36 h de cultivo para iniciar la primera fase de síntesis, y dentro de este

lapso de tiempo estarían comprendidas la fase de G0 (provocada por la sincronización) y la fase G1. En estos experimentos, se encontró que la duración de la fase de síntesis de ADN es de aproximadamente 16 h. La determinación del tiempo de doblaje de estas células reveló que el tiempo que dura el ciclo celular de los fibroblastos es de 56.2 h.

Con el ensayo anterior, se establece el tiempo de 36 h, como el punto referencia para evaluar si la proteína inhibidora de la proliferación actúa antes o después de la fase de síntesis. Por lo que 10 cultivos de fibroblastos sincrónicos fueron estimulados cada 4 h forma separada, de tal manera que el primer cultivo representó el estímulo a las 4 h y evaluado a las 56 h (tiempo suficiente para llevarse a cabo la síntesis de ADN), mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada. El proceso fue similar para los restantes puntos de estimulación (Figura 14).

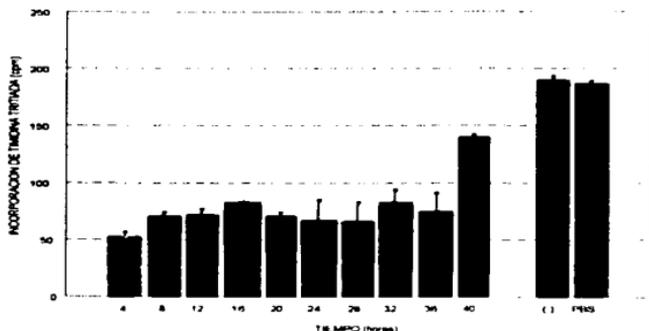


Figura 14. Efecto del MCF en la síntesis de ADN al ser aplicado en las primeras 40 h del ciclo celular de fibroblastos sincrónicos provenientes de cérvix humano (-) Control, (PBS) Buffer de fosfatos diluido 1:4 en agua; (MCF): Medio Condicionado de Fibroblastos entre 20 y 30 kDa, producto de 30 corrimientos cromatográficos. Se realizaron pulsos con MCF y PBS cada 4 h, y el ensayo fue evaluado mediante incorporación de timidina tritiada.

Como se observa en la Figura 14, las células tratadas con PBS sintetizaron el ADN de manera semejante al control, mientras que para las células tratadas con el MCF desde las 4 hasta las 36 h, la síntesis de ADN se redujo entre el 40 y 60 %, con respecto al control.

Si correlacionamos los datos obtenidos en las Figuras 13 y 14, se observa que la inhibición de la síntesis de ADN corresponde al tiempo en que las células sólo pueden encontrarse en las fases G0 o G1 del ciclo celular, lo que sugiere que el FIP actúa desde las primeras horas de la fase G1 (fase G1 temprana)

Por otro lado, la existencia de este factor inhibidor secretado por los fibroblastos de cérvix, establece que el mecanismo que regula su división celular, esta constituido por al menos una molécula que regula negativamente su crecimiento. Aunado a ello, se conoce que los fibroblastos son células que presentan una estrecha comunicación con su microambiente, en el que se incluyen las células de tipo epitelial. También sabemos que el epitelio cervical (relacionado estrechamente con los fibroblastos empleados en este modelo experimental), es un tejido altamente propenso a la generación de células tumorales. En base a esta información, creimos interesante determinar el efecto de este factor en las células tumorales provenientes de pacientes con cáncer cérvico-uterino, por lo se evaluó la proliferación de las líneas tumorales de epitelio cervical CALO e INBL, en presencia del MCF encontrando que su proliferación disminuye en un 60%. (Fig 15)

Los resultados muestran que la actividad inhibidora del MCF además de tener un efecto autócrino tiene un efecto paracrino con líneas epiteliales de CaCu. El resultado obtenido, genera una siguiente incógnita, son las células tumorales CALO e INBL capaces de secretar un factor con actividad inhibidora de la proliferación que accione sobre ellas mismas. Para responder a esta pregunta, las líneas celulares tumorales CALO e INBL se dejaron crecer a un estado de confluencia y sus medios condicionados fueron colectados, para posteriormente probar su efecto sobre la proliferación de cada una de las mismas líneas tumorales, encontrando que ninguno de los medios condicionados de dichas células presentan un efecto inhibidor sobre la proliferación de ellas mismas (Datos no mostrados).

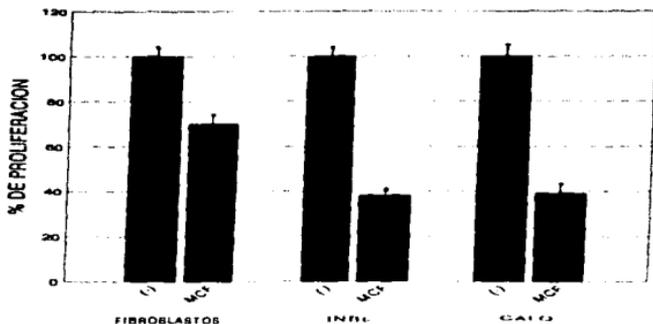


Figura 15. Efecto del MCF en la proliferación de fibroblastos de cervix normal humano y en las líneas tumorales de CaCu: CALO e INBL. (-) Control para cada uno de los tipos celulares. (MCF): Medio Condicionado de Fibroblastos entre 20 y 30 kDa. La evaluación se realizó sobre células en crecimiento exponencial, aplicando $15 \mu\text{l}$ de MCF en un volumen final de $100 \mu\text{l}$. Evaluación con cristal violeta.

Ya que el MCF ha mostrado tener un efecto inhibitor sobre la proliferación de células tumorales, y retomando el antecedente que el TGF tiene un efecto inhibitor sobre los fibroblastos, se creyó conveniente determinar su efecto sobre las dos líneas celulares de carcinoma de cervix empleadas anteriormente (Figura 16)

Los resultados muestran que para ambas líneas celulares el TGF β tiene un efecto proliferador, mientras que el MCF inhibe la proliferación en un 65 y 35% para las líneas CALO e INBL respectivamente

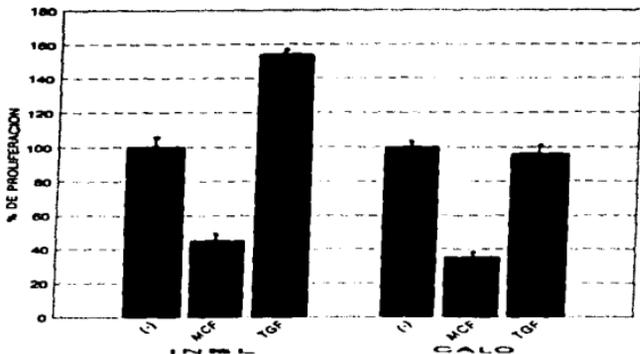


Figura 16. Comparación del efecto del MCF y el TGFβ en la proliferación de las líneas celulares de cáncer cervicouterino CALO e INBL en crecimiento exponencial (C) Control, (MCF): 15 μl de Medio Condicionado de Fibroblastos entre 20 y 30 kDa, (TGFβ) Factor de Crecimiento Transformante beta 10ng/ml. Evaluación con cristal violeta

Hasta este momento, los resultados obtenidos indican que, los fibroblastos de cérvix normal humano son capaces de regular su propia proliferación celular mediante la secreción al medio, de una molécula con características inhibitoras de la proliferación que es diferente a las anteriormente mencionadas, dicha molécula es de naturaleza proteica, se encuentra en un rango de peso molecular entre 20 y 30 kDa, y ejerce su efecto inhibitor en la fase G1 del ciclo celular de fibroblastos de cérvix.

DISCUSION DE RESULTADOS

Una de las áreas de investigación de gran interés en los últimos años ha sido la caracterización de una diversa gama de moléculas involucradas en el control de la multiplicación y diferenciación celular

Hasta hace algunos años, los progresos en esta área, estaban enfocados a entender la estructura y función de moléculas mitogénicas, y poco se sabía acerca de las moléculas responsables de señales de regulación negativa de la división celular. (84)

Con el avance de métodos bioquímicos, moleculares y citogenéticos se ha logrado encontrar una amplia gama de reguladores negativos de la proliferación celular que han mostrado tener un papel fundamental en los procesos biológicos (6) Es más, se han encontrado moléculas capaces de regular la proliferación de tipos celulares específicos. La mayor parte de estos inhibidores son obtenidos de fuentes naturales específicas, en donde se encuentran en concentraciones de nanogramos y por lo general formando parte de mezclas proteínicas complejas (66) Aunque los avances en la identificación y purificación de estas moléculas son lentos, su importancia hace que se sigan estudiando

Nuestros resultados dan evidencia que los fibroblastos provenientes de cervix normal humano son capaces de secretar un factor con actividad inhibitoria de la proliferación celular (FIP) y que dicha secreción aumenta a medida que las células detienen su proliferación, ya sea por confluencia o por alta densidad (Figura 1) Al igual que otros autores (57) encontramos que el efecto del FIP se ejercía sobre células fibroblásticas normales, lo cual nos indica que este tipo de células son capaces de regular su propia división. Además es interesante mencionar que el FIP también fue capaz de inhibir la proliferación de células tumorales provenientes de pacientes con Cáncer Cervico-uterino (CaCu)

En cuanto a la naturaleza bioquímica del factor, nuestros resultados indican que se trata de una molécula proteica (Figura 2), tal como se ha encontrado con los otros factores inhibidores publicados, los cuales se caracterizan por ser glicoproteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, la purificación parcial del FIP, no nos ha permitido establecer si se

trata de una glicoproteína, una lipoproteína, o una proteína asociada a algún ribonucleótido, por lo que sería interesante determinar el tipo de molécula asociada a la componente proteica del FIP para evaluar su posible influencia en la actividad inhibitoria de la molécula.

El proceso de purificación del FIP a través de una separación cromatográfica con exclusión molecular, mostró que la mayor actividad inhibitoria de la proliferación se encuentra entre los pesos moleculares de 20 y 30 kDa, aunque también detectamos actividad en las fracciones de mayor y menor peso molecular, seguramente asociado a la amplitud de la curva de elusión (Figura 4) Cabe hacer notar que en el análisis electroforético las diferentes fracciones muestran un patrón de bandeo muy similar, que concuerda con el traslape de curvas de elusión en la separación cromatográfica (Figura 5) Sin embargo, en la fracción de peso molecular entre 20 y 30 kDa (fracción de mayor actividad) en el gel teñido con plata, se observan un grupo de bandas con mayor nitidez, lo que nos muestra que en dicha fracción se ha llevado a cabo un enriquecimiento de las proteínas También el hecho de que las bandas sólo se observen con la tinción de plata y no con el gel teñido con azul de Coomassie, revela que la actividad inhibitoria de la proliferación es secretada en el rango de nanogramos El observar este patrón de bandeo en el rango entre 20 y 30 kDa, nos hace pensar que probablemente alguna de estas bandas sea la responsable de la actividad inhibitoria de la proliferación, por lo que sería pertinente aislar cada una de estas para generar anticuerpos monoclonales y evaluar si alguna de ellas bloquea la actividad inhibitoria del FIP Con dichos anticuerpos se podría construir una columna de afinidad que nos permitiera aislar este factor y así obtenerlo altamente purificado

El encontrar que el factor inhibitorio de la proliferación precipita al 80% con sulfato de amonio (Figura 3) y que se requieran bajas concentraciones de NaCl para eluirlo en un intercambiador iónico, nos indica que el FIP es altamente soluble y de una fuerza iónica baja, lo cual no es de sorprendernos ya que se trata de una proteína de secreción, que es vertida al medio acuoso. El detectar que el FIP es una molécula con carga positiva a un pH de 5.4, mientras que a un pH de 7.4 presenta carga negativa, sugiere que el Punto Isoeléctrico (pI) de esta proteína se encuentra entre estos rangos (Figura 6) Es necesario precisar el pI de el FIP, ya que su determinación contribuiría en el avance del método de purificación. Por otro

lado, es interesante mencionar que el FIP no perdió su actividad biológica a lo largo de las técnicas de purificación empleadas en este trabajo (Tabla 1), lo que indica que se trata de una proteína muy estable.

Con respecto al coeficiente de purificación, se puede observar que existen procedimientos de separación (intercambio aniónico) en que éste es elevado, pero que la actividad inhibitora resulta ser reducida, y en cambio existen otros (exclusión molecular) en donde el coeficiente no es tan alto, pero donde la actividad inhibitora se mantiene o aumenta, lo cual nos hace proponer un proceso de purificación consistente en: iniciar con una precipitación con sulfato de amonio, seguido de una separación por exclusión molecular en Sephacryl S-100 y posteriormente con elusión en intercambiadores iónicos (aniónico y catiónico). Se ha contemplado que una vez que se tenga una cantidad suficiente de MCF para proceder a purificar el FIP por los métodos antes mencionados, se aplique un método de exclusión molecular en una columna con características resolutivas, que nos permita obtener este factor como una proteína altamente purificada, que pueda ser detectada en una electroforesis como una sola banda.

Nuestros resultados indican que la actividad inhibitora del FIP posee un efecto autócrino y dosis dependiente sobre la proliferación de los fibroblastos (Figura 9), hecho confirmado por otros autores (86), quienes mencionan que las células normales tienen una naturaleza autónoma que les confiere la capacidad de regular su propio crecimiento. Es importante mencionar que el efecto observado es inhibitorio y no tóxico, ya que el análisis de cromátides hermanas, mostró que el FIP detiene a las células en la primera división, en comparación con el control, donde la mayoría de las células se encuentran en la segunda división y algunas en la tercera, además las células tratadas con FIP se encuentran normalmente adheridas al sustrato de cultivo y presentan una apariencia similar a aquellas sin tratamiento.

El hecho de haber encontrado que en nuestras condiciones de cultivo el FIP mostró diferentes propiedades a $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ (Figuras 7 y 8) que mostrarán actividad mitogénica, concuerda con lo citado en la literatura, en donde se menciona que estas

moléculas pueden tener efecto diferente e incluso opuesto dependiendo de la concentración y el tipo celular empleado, lo que nos hace suponer que la molécula secretada por los fibroblastos es un inhibidor de la proliferación no caracterizado, hipótesis que se ve apoyada por nuestros resultados en donde encontramos por análisis de Elisa e Inmunolectrotransferencia, que en el MCF no están presentes estos factores. Esta información abre la expectativa de saber si los factores con actividad inhibidora citados son célula u órgano específico, así como el determinar si existen moléculas inhibidoras únicamente asociadas a un estado inflamatorio, (que se producen en consecuencia de esta condición estableciendo que actúan como un factor de emergencia) y que por lo tanto deben existir otros factores con actividad inhibidora que no estén relacionados con el estado inflamatorio y que sean generados de manera natural formando parte del mecanismo que regula la división celular. En este caso, el FIP sería un candidato a integrar la lista de estos nuevos factores inhibidores.

La importancia de encontrar un factor con actividad inhibidora de la proliferación secretado por fibroblastos normales, capaz de inhibir la proliferación de ellos mismos así como de células tumorales, genera la hipótesis de establecer si la ausencia o deficiencia en la producción o acción de este tipo de factores, son causa directa o indirecta de la transformación de una célula normal a un estado tumoral o que esto mismo como se reporta en la literatura, de como consecuencia que las células tumorales secreten sus propios factores con actividad mitogénica y que con ello garanticen su proliferación (4,13).

Sería interesante estudiar si la actividad antimitogénica del FIP podría ser empleada como un modelo terapéutico que evite la excesiva proliferación celular tumoral, aunque estamos conscientes que en este momento el estudio del FIP está más enfocado a entender el mecanismo por el cual el linaje celular del cérvix regula su proliferación.

Otro aspecto importante abordado en el estudio de los factores de crecimiento, es encontrar en que punto del ciclo celular operan dichas moléculas (4). Estas moléculas reguladoras del crecimiento tienen la capacidad de inducir a las células a iniciar o no su entrada al ciclo celular. (41)

Con respecto a este punto, encontramos que el FIP actúa en la fase G1 del ciclo celular, efecto que se correlaciona con el efecto de factores inhibidores como: el TGF (11), el CeReS-18 (91), la bafilomicina A (92) y el PMA (93), quienes detienen la proliferación celular en la fase G1 del ciclo, y específicamente para el caso del TGF y CeReS-18, en una etapa cercana al punto de restricción entre otros

Consideramos necesario realizar el mismo estudio con citometría de flujo, y determinar de manera precisa en cuál de las subfases de G1 es donde el FIP ejerce su efecto. Así mismo creemos conveniente tratar de dilucidar cual es el mecanismo por el cual el FIP regula negativamente la proliferación celular, y cuáles son las moléculas implicadas en dicha regulación.

CONCLUSIONES.

- ◆ Los fibroblastos de cérvix humano son capaces de regular su proliferación a través de la secreción de un factor con actividad inhibidora de la proliferación, el cual es dependiente de la densidad celular y secretado en el rango de nanogramos .
- ◆ El FIP presenta un peso molecular entre 20 y 30 kDa, un punto isoelectrico entre 5.4 y 7.4 unidades de pI, y una fuerza iónica entre 0.015 y 0.175M de cloruro de sodio.
- ◆ La actividad inhibidora de la proliferación no esta relacionada con el efecto de: TGF β , TNF α , IFN γ e IL-1 β
- ◆ El ciclo celular de fibroblastos de cérvix normal humano tiene un periodo de duración de 56.2 horas, de las cuales 16 horas corresponden la la fase S.
- ◆ El FIP ejerce su efecto inhibidor en la fase G1 del ciclo celular de fibroblastos de cérvix humano.
- ◆ El FIP es capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos de cérvix humano, así como de las líneas tumorales CALO e INBL

LITERATURA CITADA

1. Geneser Finn. (1996). *Histología*. 2a edición. Editorial Medico Panamericana. México. pp 183.
2. Lesson S, Thomas; Roland C, Lesson. (1985). *Histología* 4a edición. Editorial Interamericana. México. pp 321.
3. Waterfield, M.D (1989). Growth Factors British Medical Bulletin 45:2. British Council.
4. Goustin, A. S. Leaf, E.B; Shipley, G D, y H.L. Moses. (1986). Growth Factors and Cancer. *Cancer Research* 46:1015.
5. Weinberg, R.A. (1989). Positive and negative controls on cell growth *Biochem.* 28:8263.
6. Johnson, T.C. (1994). Negative Regulators of Cell Proliferation *Pharmac Ther* 62. 247.
7. De Larco, J.E; y G.J. Todaro. (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cell *Proc Natl Acad Sci USA* 79 5312
8. Lawrence, D A. (1985). Transforming growth factors-an overview *Biol Cell* 53. 93
9. Assoian, R.K; Komorika, A, Meyers, C.A, Miller, D.M, y M.B Sporn (1983). Transforming growth factor- β in human platelets *J Biol Chem* 258 7155.
10. Fujii, D.J, Brissenden, E, Derynck, R, y U, Francke. (1986) Transforming growth factor beta maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7 *Somatic Cell Mol Genet* 12 281
11. Polyak, K. (1996). Negative regulation of cell growth by TGF β *Biochim et Biophys Acta* 1242.185
12. Moses, H, Yang, E; y J, Pietsenpol (1990) TGF-b stimulation and inhibition of Cell proliferation New mechanistic insights *Cell* 63 245.
13. Tucker, R.F, Shipley, G D, Moses, H L, y R W, Holley (1984) Growth Inhibitor from BSC-1 Cells Closely Related to Platelet Type β Transforming Growth Factor *Science*. 226: 705.
14. Murphy, C; Pietsenpol, J, Munger, K, Howley, P y H Moses. (1991) C-myc and pRB. Role in TGBb inhibition of keratinocyte proliferation *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 56. 129
15. Kuzroek, K, Talpaz, M, y U, Guttermaaj (1991) Interferons In De Vita, B; Hollman, S; S, Rosenberg (eds) *Biologic Therapy of Cancer* Lippincot Co USA p 247.
16. Foxwell, B M J, Barrett, K, y M, Feldman. (1992) Cytokine receptors: Structure and signal transduction *Clin Exp Immunol* 90 161.
17. Hogg, N. (1986) Factor-induced differentiation and activation of macrophages *Immunol Today* 7. 65
18. Prolitis, A.D. y S.N, Vogel (1990). Pharmacologic evidence for the requirement of protein kinase C in IFN-induced macrophage FcgR and Ia antigen expression. *J. Immunol* 145: 3788.
19. Perussia, B; Dayton, E.T; Lazarus, R, Fanning, V; y G, Trinchieri. (1983). Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG on human monocytic and mieloid cells *J. Exp. Med* 158:1092.

20. Perussia, B, Kibayasi, M, Rossi, M E, Anegeon, I, y G, Tinchieri, (1987). Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes. Role of Fc receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J. Immunol.* 138 756
21. Aggarwal, B B (1992) Tumor Necrosis Factor. In Aggarwal B B, J.U, Guterman. (eds) *Human Cytokines*. Blackwell Scientific Publications. USA p 270.
22. Spies, T, Morton, C C, Nedospasov, S A, Fiers, W, Pious, D, y J L. Strominger. (1986). Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex *Proc Natl Acad Sci USA.* 83 8699
23. Krieglger, M, Perez, C, Defay, D, Albert, Y, y S D, Lu. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein ramifications for the complex physiology of TNF *Cell* 53: 43
24. Balkwill, F.R. (1988) Tumor necrosis factor and lymphotoxin In Balkwill, R.R. *Cytokines in Cancer Therapy*. Oxford Oxford University Press
25. Immamura, K, Spriggs, D, y D, Kufe (1987) Expression of tumor necrosis factor receptors on human monocytes and internalization of receptor bound ligand. *J. Immunol.* 139: 2989
26. Scheurich, P, Unglab, R, Maxeiner, B, Tinoma, B, Zugmaier, G, y K, Pflizenmaier. (1986) Rapid modulation of tumour necrosis factor membrane receptor by activators of protein kinase C. *Biochem Biophys Commun* 141 855
27. Vilcek, J, Palombella, V J, Zhang, Y, Lin, J X, Feinman, R, Reis, L F L, y J, Le. (1988). Mechanisms and significance of the mitogenic and antiviral actions of TNF. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol* 139 307
28. Fiers, W; Browckaert, P; y A L. Goldberg (1987) Structure-function relationship of tumour necrosis factor and its mechanism of action In *Tumour Necrosis Factor and Related Cytokines*. (Ciba Foundation Symposium 131) Chichester: Wiley, pp 109.
29. Sugarman, B J, Lewis, G D, Eesalu, T E, Aggarwal, B B, y H M, Shepard (1987). Effects of growth factors on the antiproliferative activity of tumor necrosis factor. *Cancer. Res.* 47: 480.
30. Dinarello, C A. (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism *Blood* 77:1627.
31. Webb, A.C; Collins, K L; Auron, P E; Eddy, R L, Nakai, H, Byers, M G, Haley, L L, Henry, W.M, and T.B. Shows (1986) Interleukin-1 gene (IL-1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res* 5 77
32. Quill, H, Gaur, A, Brown, d, Infante, A J, y R P Phillips (1989) Synergistic activation of GM-CSF production by IL-1 and IL-2 in murine TH1 cells *J Immunol* 143: 2242.
33. Dower, S. K, Sims, J E, Ceretti, D P, y T A, Bird. (1992) The interleukin-1 system: Receptors, ligands and signals. En Kishimoto T. (ed) *Interleukins Molecular biology and Immunology*. Chem Immunol karger. Zwitterland p 33
34. Mizel, S B (1990) Cyclic AMP and interleukin 1 signal transduction. *Immunol Today.* 11: 390.
35. O'Neil, L.A; Bird, T A; y J, Saklatvala (1990). Interleukin 1 signal transduction. *Immunol Today* 11: 392
36. Palmer, J.N; Hartogensis, W E, Patten, M, Fortuin, D, y C.S. Long. (1995): Interleukin-1 β Induces Cardiac Myocyte Growth but Inhibits Cardiac Fibroblasts Proliferation in Culture. *J Clin. Inv Inc.* 95: 2555.

37. Kilian, P.L; Kafka, K.L; Biondi, D.A; Lipman, J.M, Benjamin, W.R; Feldman, D; y C.A. Campen. (1991) Antiproliferative effect of interleukin-1 on human ovarian carcinoma cell line (NIH.O.VCAR.3) *Cancer Research* 51: 1823.
38. Johnson, T.C; Kinders, R.J, y B.G, Sharifi. (1985) Purification of a cell growth inhibitor from bovine cerebral cortex cell. *Life Sci* 37: 1117.
39. Sharifi, B.G, Bascom, C.C, Fattaey, H, Nash, S, y T.C Johnson. (1986) Relationship between protease activity and a sialoglycopeptide inhibitor isolated from bovine brain. *J. Cell Biochem* 31: 41
40. Sharifi B.G y T.C, Johnson (1987) Affinity labeling of the sialoglycopeptide antimetogen receptor. *J Biol Chem* 262: 15752
41. Pardee, A.B (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603
42. Chou, H.H, Sharifi, B.G, Bascom, C.C, Johnson, T.C, y J.P Perchellet (1987) A unique sialoglycopeptide growth regulator tat inhibits mitogenic activity of a phorbol ester tumor promoter. *Cancer Lett* 35: 119
43. Fattaey, H, Bascom, C.C, y T.C, Johnson (1991) Modulation of growth-related gene expression and cell cycle synchronization by a sialoglycopeptide growth inhibitor. *Expl Cell Res* 194: 62
44. Edson, G.D, Gattaey, H.K, y T.C, Johnson. (1991) Cell cycle arrest and cellular differentiation mediated by a cell surface glycopeptide. *Life Sci* 48: 1813
45. Johnson, T.C, Enebo, D.J, Moos, P.J, y H.K Fattaey (1992) The role of a cell surface inhibitor in early signal transduction associated with the regulation of cell division and differentiation. *Trans Kans Acad Sci* 95: 11
46. Bohmer, F.D, Sun, O, Pepperle, M, Muller, T, Eriksson, U, Wang, J.L, y R. Grosse (1987) Antibodies against mammary derived growth inhibitor (MDGI) react with a fibroblast growth inhibitor and with heart fatty acid binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 1425
47. Kinders, R.J, Johnson, T.C, y M. Rachmeler (1979) An inhibitor of protein synthesis prepared by protease treatment of mouse cerebral cortex cells. *Life Sci* 24: 43
48. Kinders, R.J, y T.C, Johnson (1981) Glycopeptides prepared from mouse cerebrum inhibit protein synthesis and cell division in baby hamster cells but not in their polyoma virus-transformed analogs. *Expl Cell Res* 136: 31
49. Hsu, Y.M, y J.L, Wang (1986) Growth inhibitory control in cultured 3T3 fibroblasts. V Purification of Mr 13,000 polipeptide responsible for growth inhibitor activity. *J Cell. Biol.* 102: 370.
50. Waldmann, A.T. (1991) Minireview. The interleukin-2 Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 266: 2681
51. Riddell, S, Martin A, Chever, P, y D. Greenberg (1988) Interleukin-2 in Cancer Immunotherapy. *1st Atlas of Science Immunology* 175-183
52. Rubinchik E, y F Levi-Schaffer. (1996) Interleukin-2 inhibits 3T3 fibroblast proliferation. *Life Sciences* 58: 1509.
53. Wieser, R.J, y Oesch, F (1986) Contact inhibition of growth of human diploid fibroblasts by immobilized plasma membrane glycoproteins. *J Cell Biol.* 103: 361.
54. Wieser, R.J; Schuts, S; Tschank, G, Thomas, H, Dienes, H.P, y F. Oesch (1990). Isolation and characterization of a 60-70 kD plasma membrane glycoprotein involved in the contact-dependent inhibition of growth. *J. Cell. Biol* 111: 2681.

55. Charp, P.A; Kinders, R.J, y T.C. Johnson (1983) G2 cell cycle arrest induced by glycopeptides isolated from bovine cerebral cortex. *J. Cell. Biol.* 97:311.
56. Camacho-Hubner, C, Busby, W.H, McCusker, R.H, Wright G, y D.R Clemmons (1992). Identification of the forms of insulin-like growth factor-binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion. *J. Biol. Chem.* 267: 11949.
57. Blat, C; Villaudi, J, y L. Harel (1994) Density-Dependent Inhibition of Mouse Embryo Fibroblast Growth: Involvement of IGFBP-3. *Expl Cell Research* 215: 114.
58. Morin, S; De la Porte, S, Fiszman, M, y J, Koenig (1995) Inhibition of proliferation in 8-week-old mdx mouse muscle fibroblasts in vitro. *Differentiation* 59: 145.
59. Reeve, J.G, Guadano, A, Xiong, J, Morgan, J, y N.M. Bleehen (1995) Diminished expression of insulin-like growth factor (IGF)binding protein-5 and activation of IGF-1 mediated autocrine growth in simian virus 40-transformed human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 270: 135.
60. Hang, W, Kimura, T, Mashima, K, Miyazaki, K, Masaki, H, Yamashita, J, y T Horio. (1986) Purification and properties of epithelial growth inhibitor (EG1) from human platelets its separation from type beta transforming growth factor (TGF-beta). *J. Biochem* 100: 687.
61. Macieira-Coelho, A, y A. Soderberg (1993) Growth Inhibitory Activity in Extracts From Human Fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 154: 92.
62. Macieira-Coelho, A (1996) A growth inhibitor implicated in the growth arrest of human fibroblasts. *FEBS Letters* 378: 61.
63. Hashimoto, C, Masako, A, y Yukiharu. (1994). Isolation and characterization of a growth inhibitory factor from hamster liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 1220: 107.
64. A.beris, B, Bray, D, Lewis, J, Raff, M; Robertis, K, y J.D. Watson (1994) *Molecular Biology of The Cell*. Third Edition. Garland Publishing, Inc. New York & London.
65. De Robertis, E, Saez, F.A, y E.M.F. Robertis (1975) *Cell biology*. W.B Saunders Company. Philadelphia. E.U.A.
66. Meager Anthony (1993) *Cytokines*. Prentice Hall Advanced Reference Series. Physical and Life Sciences. New Jersey. U.S.A.
67. Pardee, B.A. (1989) *G1 Events and Regulation of Cell Proliferation*. Science 246: 603.
68. Darnell, James, Lodish, Harvey, y David Baltimore 1990. *Molecular Cell Biology*. (Second Edition). Scientific American Books. England.
69. Lewin, Benjamin (1994) *Genes*. V. Oxford University Press and Cell Press. Oxford U.S.A.
70. Franco Eduardo (1993) *Human Papillomavirus and The Natural History of Cervical Cancer*. Highlights from. *Infections in Medicine*. 10.
71. Brinton, L.A; Reeves, W.C, y M.M. Brenes (1989). The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous women. *Int. J. Cancer.* 44: 199.
72. Franco E.L. (1991) Viral etiology of cervical cancer. A critique of the evidence. *Rev. Infect Dis* 13: 1195.
73. Ponten, J, Adami, H, Bergstrom, R; Dillner, J; Friber, L; Gustafsson, L; Miller, A; Parkin, D, Lparen, P, y D. Trichopoulos. (1995) Strategies for Global Control of Cervical Cancer. *Int. J. Cancer.* 60: 1.

74. Freshney, R.I. (1994) Culture of animal cell. A manual of basis technique. 3a ed. Wiley-Liss INC. New York USA.
75. Griffiths, B. (1988) Scaling-up of animal cell cultures Ed. Freshney, R.I Animal Cell Culture. A practical approach 2a de IRL Press England
76. Monroy, G.A; Rocha, Z. L; Trejo, B C; Ramirez, G J, Dario, M.R; y S.B. Weiss. (1993). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cancer cervico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleina I. *Oncologia* 7 69
77. Kueng, W, Silber, E, y U Eppenberger (1989) Quantification of cells cultured on 96-well plates *Analytical Biochemistry*. 182: 16
78. Stryer Lubert (1995) Fourth Edition *Biochemistry* W H Freemand and Company. New York
79. Smith, P K, Kronh, R I, Hermanson, G T, Mallia, A K y F.H. Gartner. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150: 76
80. Harlow, D, y D. Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*. New York. Cold Spring Harbor Press USA
81. Ochs, D.C, McConkey, E.H, y D W Sammons (1981) Silver stains for proteins in polyacrylamide gels A comparison of six methods *Electrophoresis* 2: 304.
82. Watts, C, Brady, A, Sarcevic, B, De Fazio, A, Musgrove, E; y R. Sutherland 1995. Antiestrogen Inhibition of Cell Cycle Progression in Breast Cancer Cells Is Associated with Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase Activity and Decreased Retinoblastoma Protein Phosphorylation *Molecular Endocrinology* 9 180-4.
83. Sambrook, J, Fritsch, E F, y T Maniatis. 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Ford, N, and C Nolan Eds) 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
84. Bishop, J M (1991) Molecular themes in oncogenesis *Cell* 64 235
85. Kuzumaki, T; Matsuda, A, Ito, K; y K. Ishikawa 1996 Cell adhesion to substratum and activation of tyrosine kinases are essentially required for G1/S phase transition in BALB/c 3T3 fibroblast *Biochimica et Biophysica Acta*. 1310 185
86. Sporn, M.B, y A B Roberts (1985) Autocrine growth factors and cancer. *Nature*. 313: 745.
87. Hallek, M, Lupisto, W M, Slattery, K.E, Griffin, J E, y T J Ernest. 1992. Interferon γ increases the expression of the gene encoding the β subunit of the Granulocyte Macrophage Colony stimulating Factor Receptor. *Blood* 80 1736.
88. Schindler, R, y C A Dinnarello 1990. Interleukin 1 In *Growth Factors, Differentiation Factors and Cytokines* Habenicht A (Ed) Springer Verlag Berlin Heidelberg
89. Scott, G A, Leof, E B, Shipley, G D, and H.L Moses 1986 *Growth Factors and Cancer*. *Cancer Research* 46 1015-1029
90. Lahio, M, De Caprio, J A, Ludlow, J, Luington, M D, and J Massague. (1990). Growth Inhibition by TGF linked to suppression of retinoblastoma Protein Phosphorylation. *Cell*. 62: 178.
91. Enebo, D.J, Fattaey, H.K, Moos P J; y T.C. Johnson. (1994). Role of the Retinoblastoma Protein in Cell Cycle Arrest Mediated by a Novel Cell Surface Proliferation Inhibitor *J. Cell. Biochem*. 55: 200.

92. Saurin, A.J; Hamlett, J; Clague, M.J, y S R Pennington (1996) Inhibition of mitogen-induced DNA synthesis by bafilomycin A1 in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem J* 313: 65.
93. Bi, N; y M D Mamrack (1994) PMA inhibits the Growth of Human Fibroblasts after the Induction of Immediate-Early Genes *Expl Cell Research* 212: 105.
94. Nakamura, Y; Tate, L; Erti, R; Kawamoto, M; Mio, T; adachi, Y; Romberger, D; Kuizumi, S; Gossman, G; Robbins, R; Spurzem, J; y S Rennard (1995) Bronchial epithelial cells regulate fibroblasts proliferation *J Physiol* 269:L377.
95. Shoji, S; Rickard, K; Takizawa, H; Erti, R; linder, J; y S rennard (1990) Lung Fibroblasts Produce Growth Stiuatory Activity for Bronchial Epithelial Cells *Am. Rev. Respir. Dis.* 141.

APENDICE

Preparación del Medio de Cultivo RPMI

Se mide aproximadamente el 90% del volumen final requerido de agua destilada y desionizada y se coloca en un recipiente de tamaño lo más cercano posible a la medida del volumen final a preparar. La temperatura del agua debe ser de 15 a 20°C. Bajo agitación lenta y constante se adiciona el RPMI-1640 (RPMI-1640 Medium Sigma Chem. USA) hasta su disolución, no debe aplicarse calor al agua. Con un volumen menor al 5% del total de agua se enjuaga el paquete que contenga el Medio en polvo para remover cualquier traza de éste que hubiera quedado adherido y se adiciona al recipiente.

A la solución obtenida se le adicionan 2.0 g de Bicarbonato de Sodio o 26.8 ml de solución de Bicarbonato de Sodio al 75% por cada litro de volumen final de Medio a prepararse. El medio en su presentación comercial contiene ya el aminoácido L-glutamina, sin embargo, el cultivo de celular requiere de una mayor concentración del mismo. Por tal motivo, en esta etapa de la preparación se adiciona L-glutamina (Sigma, Chem. USA) en una concentración 2 mM. La agitación es útil para la total disolución de estos compuestos.

Se ajusta la solución a pH de 7.2-7.4 a 20°C usando para este fin hidróxido de sodio. Se adiciona la cantidad de agua requerida para completar el volumen final y se esteriliza la solución filtrándola con membranas de poro de 0.22µ.

Composición del RPMI-1640

Sales inorgánicas	Concentración (g/l)
Nitrato de Calcio 4H ₂ O	0.100
Sulfato de Magnesio anhidro	0.04884
Cloruro de Sodio	6.0
Fosfato Dibásico de Sodio anhidro	0.8

Aminoácidos	
L-arginina	0.2
L-asparagina	0.050
L-ácido aspártico	0.20
L-cistina 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.300
Glicina	0.10
L-histidina	0.015
L-hidroxiprolina	0.020
L-isoleucinas	0.050
L-leucina	0.050
L-lisina HCl	0.040
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.020
L-serina	0.030
L-treonina	0.020
L-triptofano	0.005
L-tirosina	0.02883
L-valina	0.020

Vitaminas

D-biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Acido-p-Amino Benzoico	0.001
Acido-D-Pantoténico	0.00025
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B-12	0.000005

Otros

D-Glucosa	2.0
Glutation reducido	0.001
HEPES	5.958

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Se usa para mantener las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de magnesio	0.1 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato monoácido de sodio	2.16 g
Fosfato diácido de potasio	0.2 g

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se adiciona los 100 ml que contiene el cloruro de magnesio y el de calcio. Se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con un diámetro de poro de 22 μ . La solución se almacena a temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

Verseno

Esta solución se emplea para despegar células tumorales adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se pesan las siguientes sustancias:

Tris base	3.04 g
Cloruro de sodio	8.00 g
Cloruro de potasio	0.40 g
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA)	0.40 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 10 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

Tripsina.

La enzima tripsina es utilizada para remover los fibroblastos adheridos de la caja de cultivo. Para su preparación se pesan 0.05 g de tripsina y se diluyen en 100 ml de verseno estéril. La solución se conserva en refrigeración hasta el momento de su uso.

Determinación de cinéticas de proliferación.

La cinética de proliferación de fibroblastos fue calibrada mediante una regresión exponencial o semilogarítmica, aplicando en la fase de proliferación exponencial. En esta fase de crecimiento se propone la siguiente ecuación:

$$y = c dx$$

Como sugiere el nombre exponencial, la variable independiente x aparece en el exponente, transformándose a la siguiente ecuación:

$$\log y = \log c + x \log d$$

si:

$$\log c = a \quad \text{y} \quad \log d = b$$

entonces sustituyendo en la ecuación queda:

$$\log y = a + bx$$

Esta es la ecuación lineal en $\log y$, y en $\log x$, la cual es una función semilogarítmica, de manera que si se llevan dos puntos a papel semilogarítmico se obtiene una recta.

Para la determinación del tiempo de doblaje, se toman 2 puntos de la línea recta obtenida en papel semilogarítmico, en donde el segundo punto corresponde al doble de la densidad celular del primero, y se determinan los tiempos correspondientes, los cuales se restan, obteniéndose con ello el tiempo de doblaje.

TABLA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico.
AMP	Monofosfato de Adenosina.
ARN	Acido Ribonucleico.
BCSG	Glicopéptido de Superficie Celular de Cerebro.
CaCu	Cancer Cérvico-Uterino.
CeReS-18	Sialoglicopeptido Inhibidor.
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal.
EGI	Inhibidor del Crecimiento Epidermal.
FCR	Receptor para Inmunoglobulina.
FGF	Factor del Crecimiento de Fibroblastos.
FGFR	Regulador del Crecimiento de Fibroblastos.
FIP	Factor Inhibidor de la Proliferación.
g	Gravedades.
gr	Gramos.
GTP	Trifosfato de Guanosina.
h	Hora.
HPV	Virus del Papiloma Humano.
IFN γ	Interferón gama.
IGF	Factor de Crecimiento parecido a Insulina.
IL-1 β	Interleucina 1 beta.
IL-2	Interleucina 2.
kDa	Kilodaltones.
LT	Linfotoxina.
M	Fase de Mitosis.
MCF	Medio Condicionado de Fibroblastos.
MDGI	Inhibidor del Crecimiento de Células Mamarias.
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
min	Minutos.
μ	Microlitro.
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical.
nm	Nanometros.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
PGE2	Prostaglandina E2.
pI	Punto Isoeléctrico.
RB	Proteina de Retinoblastoma.
S	Fase de Síntesis de ADN.
SFB	Suero Fetal de Bovino.
TGF β	Factor de Crecimiento Transformante beta.
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa.
TPA	12- <i>o</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato.