



01461

1^{2 es.}

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**ESTUDIO "IN VITRO" SOBRE EL EFECTO DE LA NICOTINA EN
LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LARINGE HUMANA**

TESIS QUE PRESENTA LA :

C.D. M.D. CECILIA GONZÁLEZ MALAGÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN ODONTOLOGÍA

TUTOR

DR. HIGINIO ARZATE

México, D.F. 1998



FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

~~146~~
269139



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

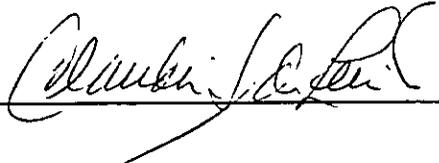
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

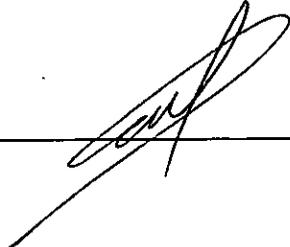
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

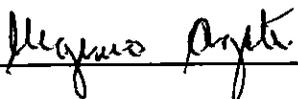
**ESTUDIO "IN VITRO" SOBRE EL EFECTO DE LA NICOTINA EN
LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LARINGE HUMANA**

COMITE DE TESIS

Mtra. Claudia de León Torres  _____
ASESOR

Dr. Manuel Saavedra García  _____
ASESOR

Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros  _____
ASESOR

Dr. Higinio Arzate  _____
DIRECTOR

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Higinio Arzate, por el apoyo recibido en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Al Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros, por la ayuda conferida en el Laboratorio de Farmacología Celular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de realizar esta investigación.

A mi esposo e hijos.

ÍNDICE

Contenido	Número de página
Abstract	1
Resumen	3
Introducción	5
Planteamiento del problema	11
Justificación	12
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Hipótesis	14
Material y métodos	14
Generación y establecimiento	
de la línea celular	15
Procedimiento experimental	16
Ensayo de proliferación celular	17
Ensayo de adhesión celular	18
Ensayo de quimiotracción	19
Ensayo de microscopia electrónica	20
Análisis estadístico	21
Resultados de la investigación	22

Discusión	35
Conclusiones	43
Recomendación de investigaciones a futuro	44
Bibliografía	45
Curriculum vitae	55
Gráfica 1	28
Gráfica 2	29
Gráfica 3	30
Gráfica 4	31
Figura 1	32
Figura 2	33
Figura 3	34

Abstract

Tobacco smoking is the most important Public Health problem in the last decade in developed countries. Multiple factors may contribute to the apparition of cancer in larynx, among them is nicotine, one of chemical component detected in tobacco. The aim of this study was to investigate the effects of nicotine in the larynx epithelial cells "*in vitro*" in a 0.025, 0.5, 1, 2 and 4 μ M nicotine concentration added in to the culture medium. The assays used to evaluate the alteration were cell proliferation, cell adhesion, cell chemotaxis and electronic microscopy. We identified by means of ANOVA, Kruscal Wallis and Student Newman-Keuls tests, that an statistical difference existed in all the nicotine concentration groups. In the cellular proliferation assay 1×10^4 larynx epithelial cells in DMEM selded + 10% FBS were in wells and incubated and we added new overnight medium with 10% FBS + differents nicotine concentrations in to the culture. The cells were cultivated for 24, 48, 72 and 96 hours. We added 20 μ l of MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-y-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), this was dissolved in PBS with 5 mg/ml and added in the culture and incubated for 3 hours. We considered the 0 to 96 hours in which we used nicotine concentrations of 0.025, 0.5, 1, 2, y 4 μ M, a absolute control and negative control. These experimental studies were readied at 570 nm +-E.E.M. in the photometer in the adhesion assay we were sowing cells in seven culture boxes with larynx epithelial cells in DMEM + % of FBS in which we incubated for 24 hours with differences nicotine concentration (0.025, 0.5, 1, 2, y 4 μ M). The cells were tripzinized and sowing 1×10^4 in DMEM + 10% of SFB in plates of 96 wells with out treated for culture. We used a positive control with 5 μ g/ml of collagen 1 and a negative control with methanol. These assays were view in many times: 30, 60, 120 and 240 minutes and readied at 570 nm +-E.E.M. in the photometer In the chemotaxis assay we used 1×10^4 in inserts of 10 mm of diameter in wells with

membranes of polycarbonate of 8 μm and we used the same nicotine concentrations used in the others experiments, with a positive control and negative control. In the electronic microscopy assay we used nicotine concentrations in the larynx epithelial cells but in 24 and 72 hours.

The results in the cell proliferation assay a high concentrations of 1 μM of nicotine caused a low in the number of the cells compared with the control ($p < 0.05$). This was evident in 96 hours of culture in approximately 80%. In adhesion cellular assay we determined that the first hour back for the application of nicotine, the adhesion of the cells increased in about 70% for to decreased in approximately 70% in 240 minutes. In the chemotaxis assay the concentration of 1 μM help to adhesion these cells at the end of this experiment in about 90%, showing significatives differences of $p < 0.05$. In this assay the cellular migration decreased in all nicotine concentrations used in this experiment ($p < 0.05$).

In the electronic microscopy assay the evaluation demonstrated changes of configurations like small cilliar prolongation, a reduction of organelles linke endoplasmic in the citoplasmatic areas, the nucleus showed a small areas of chromatin condensation and a obvious vacuolization. The results that we had discussed before were similar to the clinic malignant neoplastic develop provoked by chemical component (nicotine) studied. We can conclude that nicotine clearly contribute to work out an alteration in cellular proliferation, cellular adhesion, cellular chemotaxis and ultrastructurally assays.

Key words: Tabacco, Nicotine, Epithelial Cells, Larynx, *in vitro*.

Resumen

En las últimas décadas el hábito del tabaco es el principal problema de Salud Pública en los países desarrollados. Existen múltiples factores que pueden contribuir a la aparición de cáncer de laringe, entre ellos se encuentra la nicotina. Creando una línea celular se comprobó que los efectos "in vitro" de la nicotina en las células epiteliales de laringe utilizando concentraciones de 0.025, 0.05, 1, 2 y 4 μM . provocan alteración celular. Los ensayos utilizados para evaluar la alteración celular fueron: proliferación celular, adhesión celular, quimiotaxis celular y cambios ultraestructurales. En el ensayo de proliferación celular 1×10^4 células epiteliales de laringe en DMEM + 10% FBS fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas toda la noche, medio fresco suplementado con 10% FBS + diversas concentraciones de nicotina se adicionaron a los cultivos. Las células fueron cultivadas por 24, 48, 72 y 96 horas. Se les adicionó 20 μl de MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) disolviéndose en PBS a 5 mg/ml, filtrado, adicionado al medio de cultivo e incubado por 3 horas. El MTT fue extraído y disuelto en 100 μL de DMSO. Se consideró el tiempo de 0 a 96 horas separando los ensayos en 24, 48, 72 y 96 horas en los cuales se aplicaron concentraciones de nicotina de 0.025 μM , 0.5 μM , 1 μM , 2 μM y 4 μM , un control absoluto y un control negativo con metanol. Estos estudios experimentales fueron leídos en el fotómetro a una absorbancia de 570 nm \pm E.E.M. (n=4). En el ensayo de adhesión celular se sembraron 7 cajas con células epiteliales de laringe en DMEM +10% de FBS las cuales se incubaron durante 24 horas a diferentes concentraciones de nicotina (0.025, 0.05, 1, 2 y 4 μM); posteriormente se tripsinizaron y se sembraron 1×10^4 en DMEM +10% de SFB en placas de 96 pozos no tratadas previamente para cultivo celular. Se utilizó un control positivo de 5 $\mu\text{g/ml}$ de colágena tipo 1 y un control negativo con metanol. Estos ensayos fueron observados en tiempos de 30, 60, 120 y 240 minutos y leídos en el fotómetro a una absorbancia de 640 nm \pm E.E.M. (n=4). En el ensayo de

quimiotracción se utilizaron 1×10^4 en insertos de 10 mm de diámetro en pozos con membranas de policarbonato de poro de 8 μm utilizando las mismas concentraciones empleadas en los ensayos anteriores; en comparación con un control positivo y otro negativo. En las observaciones ultraestructurales se demostraron cambios morfológicos con dosis de nicotina de 0.025 hasta 4 μM durante períodos de 24 a 72 horas. En la proliferación celular a concentraciones mayores de 1 μM de nicotina se provocó un descenso importante en el número de células con respecto al control ($p < 0.05$). Esto fue evidente principalmente a las 96 horas de cultivo en un 80 %. En la adhesión celular se determinó que a la primera hora posterior a la aplicación de la nicotina, la adhesión de las células se incrementó en un 70 %, para decrecer paulatinamente hasta el nivel basal una vez transcurridos 240 minutos. Sin embargo la concentración de 1 μM al parecer favoreció la adherencia de estas células al término del experimento en un 90%, demostrando diferencias significativas de $p < 0.05$. Se determinó que a cualquier concentración de nicotina la migración celular se vió disminuída ($p < 0.05$). Las células vistas ultraestructuralmente presentaron cambios de configuración, las pequeñas prolongaciones ciliares y los organelos citoplasmáticos disminuían, el núcleo presentó pequeñas zonas de condensación de cromatina así como una gran cantidad de vacuolas no electrondensas dentro del citoplasma. Por los resultados anteriormente mencionados nos dimos cuenta que el comportamiento celular visto a través de estos ensayos, son muy similares al desarrollo de neoplasias malignas provocadas por este tipo de agente bioquímico. La nicotina por si sola es capaz de provocar alteración a nivel proliferativo, adhesivo, quimiotático y ultraestructural en la célula.

Palabras Clave: Tabaco, Nicotina, Células epiteliales, "in vitro".

Introducción

El tabaquismo no obstante haberse generalizado entre los pueblos desde los primeros tiempos, en las últimas décadas ha ido ocupando un lugar cada vez más importante entre los problemas de Salud Pública de los países desarrollados. 1-5 Estudios recientes han demostrado que la adicción al cigarro tiene una relación estrecha con la aparición de diversos padecimientos graves entre los que se observan: hipertensión, arteriosclerosis, cardiopatías y otros que contribuyen al deterioro de la salud del individuo o bien la aparición de neoplasias malignas, mismas que pueden conducir a una muerte temprana. 6-10

La transformación del perfil epidemiológico de nuestro país no escapa al contexto de otras latitudes 11-13 las investigaciones realizadas aunque denotan diferencias muy marcadas por situaciones predominantes de conformidad al modus vivendi de determinados grupos, en todos ellos la muestra notable del incremento de enfermedades en los fumadores habituales así como en los fumadores pasivos se ha reflejado en forma negativa.14-16 Las observaciones clínicas de individuos expuestos al tabaco de manera directa o no, denotaron cambios en su epitelio respiratorio muy probablemente dependientes de la concentración del humo del tabaco así como del tiempo de exposición al mismo. Este fenómeno obedece a que el humo del cigarro tiene elementos específicos gaseosos que contactan con las paredes del epitelio respiratorio.17-19 Durante la combustión los componentes

emitidos del humo se diversifican en un 40% por partículas de alquitrán y nicotina, el 60% restante, por gases integrados por diversos compuestos entre los que destacan: monóxido, fenol, formaldehído, cianuro de hidrógeno, acetaldehído, ácido orgánico, benzoquinóna, acroleína y benzopireno, ²⁰⁻²³ añadiendo a ellos otros elementos como el papel de la envoltura del tabaco y el mentol, capaces de afectar también la mucosa de las vías respiratorias. ²⁴⁻²⁷.

Durante 1997 en el Instituto Nacional de Cancerología, más de 80 nuevos casos de cáncer de laringe fueron diagnosticados, reflejando las estadísticas que la enfermedad ha sido siempre más frecuente en hombres que en mujeres (4.5%), sin embargo, dado que los hábitos tabáquicos de la mujer han ido cambiando de acuerdo al sistema social en que nos desarrollamos, la enfermedad ha ido evolucionando negativamente también en el sexo femenino.

Los daños impresionantes han atraído la atención de los investigadores mundiales estudiando los factores bioquímicos que constituyen el tabaco y su relación con el organismo, pero en ellos sólo se ha usado la analogía puesto que las pruebas clínicas y de laboratorio han sido a nivel experimental solo en animales. Razón por la cual se pensó en la necesidad de llevar a cabo un estudio experimental "*in vitro*" con células epiteliales humanas de laringe, considerando que éste es uno de los órganos mas afectados por el agente bioquímico.

El humo del cigarro está formado fundamentalmente por partículas sólidas de 0.4 micrómetros, suspendidas en una mezcla de gases orgánicos en la que se han identificado mas de 4700 compuestos químicos. Aunque existen métodos complejos y refinados para el análisis del humo, la estandarización de su composición con fines

experimentales es casi imposible entre otras cosas por la gran variedad de preparaciones en cuanto al contenido de alquitrán (de 0 a 38 mg/ cigarrillo y nicotina 1.2 a 2.3 mg), las diferentes mezclas de tabaco y la presencia de filtros ventilados o no, así como los cambios de composición detectados entre la corriente central y marginal del mismo cigarrillo (la primera es la más irritante para el fumador activo y la segunda con el humo exhalado, que de nueva cuenta inhala el fumador pasivo). 28-31

Entre tantas variables es difícil establecer el efecto individual que cada sustancia ejerce sobre el cuerpo a través de éstos estudios analíticos, y resultando más fácil encontrar la respuesta que ejercen estas sustancias utilizadas individualmente ya que algunas afectan a todo el organismo y otras a ciertos tejidos en particular, se vió la necesidad de observar exclusivamente el efecto que produce la nicotina en células epiteliales de la laringe humana *"in vitro"*. 32-36

Los avances recientes en la terapéutica contra el cáncer han desarrollado estudios de los mecanismos básicos celulares que conducen a la tumorigénesis, en ellos se explica la transformación maligna de las células, y siendo los resultado más frecuentes la pérdida del control en cuanto a la proliferación, adhesión y quimiotracción celular, se diseñó la presente investigación basada en estos ensayos.

Para realizar este procedimiento hicimos en diferentes etapas, varios pasos independientes, produciéndose como resultado cambios a nivel genético. Al parecer la carcinogénesis es un fenómeno unitario en el que un cambio genético básico afecta a una cascada de procesos que producen la multitud de propiedades específicas que son el prerrequisito para que una célula se vuelva cancerosa.

El estímulo carcinogénico en el organismo por la nicotina es de un porcentaje elevado, por lo que la gran diversidad de la estructura molecular ha dado lugar a la búsqueda de un principio unificador que debe ser directamente o indirectamente mutagénico. 37-49 Se cree que la mayor parte de los tumores de laringe en el ser humano, se originan como resultado de una serie de fenómenos a través de una multitud de pasos (multifactoriales), en los cuales una alteración mutagénica no reestructurada o reparada en el DNA, es al parecer el paso inicial. Cuando un agente carcinógeno es capaz de inducir mutaciones y translocaciones en el DNA celular, podemos decir que las mutaciones alteran la información genética contenida en el DNA y esta a su vez es transmitida por la célula a sus descendientes, desembocando así en modificaciones metabólicas heredadas. 41-45

Las células malignas a diferencia de sus réplicas normales no son igualmente susceptibles de la regulación de proliferación celular, debido a factores de crecimiento exógenos ya que se cree que requieren menos hormonas o factores de crecimiento, se ha demostrado que las células tumorales son capaces de sintetizar en forma endógena mediante una multitud de pasos (multifactoriales). 46-50

Debido a que una de las cualidades de las células malignas es que permiten en su estudio "*in vitro e in vivo*" la transplantabilidad, ya que es posible que estas células se explanten con facilidad en medios de cultivos o huéspedes singénicos adecuados, lo que en las células normales, con excepción de los fibroblastos, es sumamente difícil de lograr. Y la otra cualidad de éstas células es que se desarrollan fácilmente en medios de cultivo líquidos y semilíquidos, es decir, no dependen de anclaje para su crecimiento, lo cual es imposible en las células normales "*in vitro*".

Además las células cancerosas sufren de la pérdida de la inhibición por contacto, lo que significa que en cultivos celulares de tejidos normales, las células proliferan en una capa monocelular y al ponerse en contacto una célula con otra, cesa la división celular, fenómeno que no se presenta en cultivos de células cancerosas, ya que éstas se conglomeran en empalizada en forma desordenada y el crecimiento es constante, es decir, las limitaciones de movimiento, crecimiento y proliferación se consideran manifestaciones del contacto entre unas y otras células normales, lo que se conoce como "inhibición por contacto", más este término ha sido reemplazado por "inhibición dependiente de densidad".⁵¹⁻⁵³ Por ello la obtención de los resultados que se especifican en el apartado correspondiente, son valideras para cualquier otra investigación.

También se comprobó que los atributos de la célula cancerosa como el escape de los controles que regulan el crecimiento, disminución de la adhesividad y la cohesividad, menor inhibición por contacto e inhibición del crecimiento, dependen de la densidad y capacidad para invadir y dar metástasis, pudiendo guardar relación con alteraciones en la superficie celular y de los componentes relacionados con la membrana observada en los experimentos.⁵³⁻⁵⁵

Todos los cambios fenotípicos de las células malignas entrañan alteraciones bioquímicas importantes, aunque ninguna de las aberraciones bioquímicas observadas en las células cancerosas se consideran datos característicos del cáncer, sí es posible establecer que entre más diferenciada esté la célula neoplásica, guardará más semejanza con sus antecesores normales en lo que se refiere a su comportamiento enzimático. Dentro de las múltiples alteraciones bioquímicas,

encontramos que las células cancerosas muestran un aumento en el metabolismo anaerobio incluso en presencia de oxígeno, fenómeno también observado en células normales de crecimiento rápido. 61-64

Tomando en cuenta que el diagnóstico actual de la oncología ya no debe depender sólo de la estirpe de los tumores, puesto que existen otras formas de apoyarlo a través de la inmunohistoquímica, histoquímica y microscopia electrónica, se vió la necesidad de poder observar a través de un estudio *"in vitro"* estas alteraciones celulares con el fin de ver la posibilidad de su utilidad como un futuro método de diagnóstico preventivo, utilizando la Biología Celular y Molecular dentro de la Oncología como un elemento a priori a cualquier estudio. 65-70

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La nicotina es el factor bioquímico más importante encontrado en el humo del cigarro y es causal de una gran cantidad de agentes mutágenos y carcinógenos productores de una alta incidencia de cáncer laríngeo. 71-73

Después de aspirar el humo del tabaco la nicotina es absorbida fluidamente por el tracto respiratorio, mucosas bucales y la piel. Aproximadamente del 80 al 90 % de la nicotina se metaboliza en el hígado, con pequeñas fracciones en pulmón y riñones.74-76 La vida media posterior a su inhalación o administración parenteral es de 30 a 60 minutos y es eliminada por el riñón a una velocidad de excreción que depende del pH urinario. 77-80

Estudios experimentales han demostrado que el humo del tabaco es capaz de producir mutaciones en modelos bacterianos y ser carcinogénicos cuando se aplica directamente en la piel de animales de experimentación.

La elevada toxicidad de la nicotina y su abundante proporción en el tabaco le confieren gran importancia. Esta sustancia es uno de los pocos alcaloides líquidos con una base volátil, incolora, que se hace parda y toma el color del tabaco al ponerse en contacto con el aire; además es soluble en el agua. 81-87

No obstante ello, los registros médicos que se tienen en la actualidad sobre las neoplasias de cabeza y cuello, existe poca información sobre los efectos que produce la nicotina en la laringe.

En el Registro Nacional de Enfermedades Neoplásicas a cargo de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, no existe estudio alguno que determine el estado actual de la enfermedad ni los factores predeterminantes que la justifiquen, pero basta contemplar a la sociedad en que vivimos, donde los contrastes de este fenómeno epidemiológico a partir de la rápida y desordenada urbanización, el acelerado proceso demográfico, los hábitos sociales y la tensión cotidiana, la han acentuado.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que hasta la fecha no existen a nivel mundial estudios "*in vitro*" de los efectos que produce la nicotina en las células epiteliales de la laringe y debido a la alta toxicidad de este agente bioquímico; el presente estudio se basa en diversos ensayos que se aplicaron a una línea celular epitelial de laringe humana experimentando en: proliferación celular, adhesión celular, quimiotracción celular y de microscopia electrónica de transmisión, a fin de poder demostrar las alteraciones determinantes a nivel citoplasmático y nuclear, cuando éstas células se ponen en contacto con la nicotina.

En el Registro Nacional de Enfermedades Neoplásicas a cargo de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, no existe estudio alguno que determine el estado actual de la enfermedad ni los factores predeterminantes que la justifiquen, pero basta contemplar a la sociedad en que vivimos, donde los contrastes de este fenómeno epidemiológico a partir de la rápida y desordenada urbanización, el acelerado proceso demográfico, los hábitos sociales y la tensión cotidiana, la han acentuado.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que hasta la fecha no existen a nivel mundial estudios "*in vitro*" de los efectos que produce la nicotina en las células epiteliales de la laringe y debido a la alta toxicidad de este agente bioquímico; el presente estudio se basa en diversos ensayos que se aplicaron a una línea celular epitelial de laringe humana experimentando en: proliferación celular, adhesión celular, quimiotracción celular y de microscopia electrónica de transmisión, a fin de poder demostrar las alteraciones determinantes a nivel citoplasmático y nuclear, cuando éstas células se ponen en contacto con la nicotina.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la nicotina en las células epiteliales derivadas del tejido laríngeo humano *"in vitro"*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la **capacidad proliferativa** de las células epiteliales de laringe humana en presencia de diversas concentraciones de nicotina.

- Determinar la **capacidad de adhesión** de las células epiteliales de laringe humana con la aplicación de diferentes concentraciones de nicotina.

- Determinar la **capacidad de migración celular** a diferentes concentraciones de nicotina aplicadas en células epiteliales de laringe humana.

- Determinar los **cambios de configuración a nivel ultraestructural** que presentan las células epiteliales en respuesta a la nicotina.

OBJETIVO GENERAL

•Evaluar el efecto de la nicotina en las células epiteliales derivadas del tejido laríngeo humano *"in vitro"*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

•Determinar la **capacidad proliferativa** de las células epiteliales de laringe humana en presencia de diversas concentraciones de nicotina.

•Determinar la **capacidad de adhesión** de las células epiteliales de laringe humana con la aplicación de diferentes concentraciones de nicotina.

•Determinar la **capacidad de migración celular** a diferentes concentraciones de nicotina aplicadas en células epiteliales de laringe humana.

• Determinar **los cambios de configuración a nivel ultraestructural** que presentan las células epiteliales en respuesta a la nicotina.

HIPÓTESIS

Comprobar que a través de la nicotina se promueve la proliferación celular, disminuye la adhesión así como la quimiotracción de las células epiteliales de laringe humana causando a la vez cambios en su ultraestructura.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES.

La realización de este estudio se efectuó con base en una línea celular epitelial derivada de laringe humana ³¹⁻³³ mediante un experimento "in vitro" basado en la observación a través de la aplicación de varios ensayos como: proliferación celular, adhesión celular, quimiotracción celular y cambios ultraestructurales, los cuales determinaron el efecto que la nicotina produce en las células epiteliales estudiadas. Se utilizaron Instrumentos de microdisección (pinzas, tijeras de Castro Viejo), Solución balanceada de Hanks, Tripsina porcina (0.25%) con EDTA, Medio de cultivo (Dulbecco's Minimun Essential Media, DMEM) Suero Fetal Bovino, Cajas de Cultivo de 25 y 75 cm², Nicotina (Sigma! Chemical Co. ST Louis Mo. USA), Dimetilsulfoxido (DMSO) Campana de flujo laminar (tipo II) Incubador de CO²

HIPÓTESIS

Comprobar que a través de la nicotina se promueve la proliferación celular, disminuye la adhesión así como la quimiotracción de las células epiteliales de laringe humana causando a la vez cambios en su ultraestructura.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES.

La realización de este estudio se efectuó con base en una línea celular epitelial derivada de laringe humana ³¹⁻³³ mediante un experimento "in vitro" basado en la observación a través de la aplicación de varios ensayos como: proliferación celular, adhesión celular, quimiotracción celular y cambios ultraestructurales, los cuales determinaron el efecto que la nicotina produce en las células epiteliales estudiadas. Se utilizaron Instrumentos de microdisección (pinzas, tijeras de Castro Viejo), Solución balanceada de Hanks, Tripsina porcina (0.25%) con EDTA, Medio de cultivo (Dulbecco's Minimun Essential Media, DMEM) Suero Fetal Bovino, Cajas de Cultivo de 25 y 75 cm², Nicotina (Sigmal Chemical Co. ST Louis Mo. USA), Dimetilsulfoxido (DMSO) Campana de flujo laminar (tipo II) Incubador de CO²

Solución fijadora de Karnovsky, Amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M y Microscopio electrónico de transmisión.

Generación y establecimiento de la línea celular

Se obtuvo una biopsia de laringe humana del Instituto Nacional de Cancerología la cual se colocó en un tubo de ensayo que contenía DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Media), suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Posteriormente en una campana de flujo laminar se procedió a lavar la biopsia profusamente y al menos 5 veces con solución balanceada de Hanks a la cual previamente le fueron adicionados antibióticos (Penicilina G 100 U/ml y Estreptomicina 100 µg/ml). Se procedió entonces a la obtención de fragmentos de tejido de aproximadamente 1 mm³ los cuales fueron sembrados en cajas de cultivo de 25 cm² con 1 ml de DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y suero humano al 4%. Las cajas se mantuvieron en una incubadora de CO² y a una temperatura de 37°C durante 7 días aproximadamente hasta que se observó crecimiento celular a partir de los explantes de tejido, los cuales fueron alimentados con 10% de suero fetal bovino en DMEM hasta que las células alcanzaron

confluencia. Las células hasta este punto se les denominó cultivo primario. Una vez confluentes las células fueron tripsinizadas con tripsina porcina-EDTA 0.25%, cuya acción se inhibió con suero fetal bovino al 10% en DMEM, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en DMEM + 10% de suero fetal bovino y vueltas a sembrar nuevamente en cajas de cultivo de 75 cm².

A este cultivo se le denominó pasaje 1. En este momento se pudo considerar el establecimiento de una línea celular.

Procedimiento experimental

Se determinó la dosis letal media (DL50) promovida por la nicotina en células epiteliales. Se sembraron 2×10^4 células epiteliales en cajas de 4 a 48 pozos, las cuales se mantuvieron sin cambio alguno durante toda la noche. Posteriormente se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se utilizaron diversas concentraciones de nicotina hasta determinar cual de estas promueve la muerte del 50% de las células. En base a dichos experimentos se utilizaron concentraciones en el rango donde no se produjo más del 5% de muerte celular. Esto fue evaluado tiñendo las células con azul tripano y contando las células en un hematocitómetro.

Una vez establecida la DL50 se procedió a realizar ensayos de proliferación celular para determinar la acción de la nicotina en ellas y en la replicación del ADN.

Este ensayo se realizó al menos tres veces por triplicado.

Ensayos de Proliferación celular

Se colocaron 1×10^4 células epiteliales en DMEM + 10% FBS, las cuales se sembraron en placas de 96 pozos e incubadas toda la noche para permitir su adhesión a los pozos. Medio fresco suplementado con 10% FBS + diversas concentraciones de nicotina se fueron adicionando a los cultivos. Las células se cultivaron por 24, 48, 72 y 96 horas. Después de lo cual se les adicionó 20 μ l de MTT (3-(4,5-dimetil-2-yl-2,5-difenil bromuro de tetrazolio), que se disolvió en PBS a 5 mg/ml, filtrado, adicionado al medio de cultivo e incubado por 3 horas. El MTT fue extraído y disuelto en 100 μ L de DMSO y la densidad óptica leída a 570 nm \pm E.E.M. (n=4).

Se consideró el tiempo de 0 a 96 horas, separando los ensayos en 24, 48, 72 y 96 horas; se aplicaron concentraciones de nicotina en las células epiteliales de laringe de 0.025 μ M ; 0.5 μ M; 1 μ M; 2 μ M; 4 μ M;, un control absoluto y un control con metanol. ⁸⁸⁻⁹⁶

Este ensayo se realizó al menos tres veces y por triplicado.

Ensayo de adhesión celular

En el ensayo de adhesión celular se sembraron 7 cajas con células epiteliales de laringe en DMEM +10% de FBS las cuales se incubaron durante 24 horas con diferentes concentraciones de nicotina (0.025, 0.05, 1, 2 y 4 μM); posteriormente se tripsinizaron y se sembraron 1×10^4 en DMEM +10% de SFB en placas de 96 pozos no tratadas previamente para cultivo celular. Se utilizó un control positivo de 5 $\mu\text{g/ml}$ de colágena tipo 1 y un control negativo con metanol. Estos ensayos fueron observados en tiempos de 30, 60, 120 y 240 minutos, previo lavado con PBS y se les colocó 50 μl a cada pozo de azul de toluidina al 0.1% +formalina al 35 %; dejando esta solución durante una hora, después fueron lavados con PBS y el colorante extraído y leído en el fotómetro a una absorbancia de 640 nm +- E.E.M. (n=4). 97-100

Este ensayo se realizó al menos tres veces y por triplicado.

Ensayo de quimiotracción

Se utilizaron 1×10^4 células epiteliales de laringe en insertos de 10 mm de diámetro en pozos con membranas de policarbonato en poro de $8 \mu\text{M}$

La nicotina se utilizó en concentraciones de $0.25 \mu\text{M}$, $0.5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ y $2 \mu\text{M}$, disuelta SFM el cual contiene 1% de BSA. Se colocó $100 \mu\text{l}$ en fondo o parte inferior de los pozos.

Se suspendieron 1×10^4 células epiteliales de laringe en $200 \mu\text{l}$ de SFM contenida en 1% de BSA.

Fueron sembradas en los pozos los cuales se incubaron durante 6 horas a 37°C . La respuesta quimiotática fue determinada por un número de células que migraron a la parte inferior de la superficie de la membrana, luego estas fueron teñidas con hematoxilina y posteriormente cuantificadas en cinco campos al azar al microscopio de luz con el objetivo de $40\times$.

La fibronectina del plasma bovino y la misma concentración fueron utilizadas como un control positivo. 101-107

Este ensayo se realizó al menos tres veces y por triplicado.

Microscopia electrónica de transmisión

Se aislaron las células y se fijaron en un Fijador Universal pH 7.2 a 7.4 durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron con un amortiguador de fosfatos Sorensen 0.1M por 15 minutos, se posfijaron las células con tetraóxido de osmio al 2 % durante 15 minutos lavándolas con agua destilada 10 minutos y deshidratándolas con concentraciones graduales de acetona 70, 80, 90 y 100 % (2 cambios) durante 10 minutos. 108-111

Previamente se incluyeron las muestras en una mezcla de acetona y epón-araldita 1:1 durante 1 hora; se destapó el frasco que contenía las muestras y se dejó evaporar la acetona para concentrar cada vez más la resina (1 hora).

Se incluyeron en moldes con epón-araldita a 60 °C y se dejó polimerizar durante toda la noche para después realizar cortes semifinos de 1 a 2 μm , teñir con azul de toluidina y montarlas en laminillas y de esta forma realizar cortes finos de 100 a 200 nm los cuales se montaron en rejillas de cobre de malla 200.

Se contrastó con acetato de uranilo 2.5 % por 15 minutos y citrato de plomo 0.3 % por 10 minutos. 112-115

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron los datos a través del sistema **Sigma Plot 3.0**, utilizando **ANOVA** empleada generalmente para la comparación de más de tres grupos en estudios experimentales y la ayuda de **Kruskal-Wallis** y **Student-Newman-Keuls**.

RESULTADOS

Resultados del ensayo de proliferación celular

El ensayo de proliferación celular demostró que una concentración de nicotina de 0.025 μM a las 24, 48 y 96 horas, no evidenció una inhibición de proliferación significativa, sin embargo a las 72 horas se observó una evidente disminución en el proceso mitótico celular. A una concentración de 0.5 μM a 24 y 96 horas no hubo diferencias significativas con respecto al grupo control; no obstante a las 48 y 72 horas el proceso proliferativo se vió deprimido. A las 24 horas la concentración de 1 μM demostró que hubo una inhibición de proliferación estadísticamente significativa con respecto al control, sin embargo a las 48 y 72 horas la tasa de mitosis se determinó disminuída. A concentraciones de 2 y 4 μM la tasa de proliferación se encuentra deprimida con respecto al control en todos los períodos de observación.

La conclusión de este ensayo es que a concentraciones mayores de 1 μM de nicotina se provocó un descenso importante en el número de células con respecto al control ($p < 0.05$). Esto fue evidente principalmente a las 96 horas de cultivo en un 80 %.

Estos ensayos se comprobaron estadísticamente a través del sistema de Sigmal Plot 3.0 por ANOVA y una prueba de Tukey resultando una $P < 0.05$.

(Gráfica 1,2)

Resultados del ensayo de adhesión celular

El ensayo de adhesión celular demostró que la concentración de $0.025 \mu\text{M}$ de nicotina a los 30 y 60 minutos promovió la adhesión, mientras que a los 120 y 240 minutos disminuyó. En el grupo donde se colocó una concentración de $0.5 \mu\text{M}$ de nicotina se observó un comportamiento similar al anterior. En el grupo al que se le agregó una concentración de $1 \mu\text{M}$ de nicotina se notó un aumento en la adhesión celular a los 30, 60, 120 y 240 minutos con respecto al control, la concentración de nicotina a $2 \mu\text{M}$ no mostró diferencias significativas a los 30, 60 y 180 minutos. A los 240 minutos esta adhesión se observó disminuída.

La conclusión de este ensayo fue que durante la primera hora posterior a la aplicación de la nicotina, la adhesión de las células se incrementó en un 70%, para decrecer paulatinamente hasta el nivel basal una vez transcurridos 240 minutos. Sin embargo la concentración de $1 \mu\text{M}$ al parecer favoreció la adherencia de estas células al término del experimento en un 90%, demostrando diferencias significativas de $p < 0.05$.

Se determinó que a cualquier concentración de nicotina la migración celular se vió disminuida ($p < 0.05$).

Este análisis de comparación de grupos se determinó con la ayuda del método Student- Newman- Keuls dando como resultado $p < 0.05$ (Gráfica 3)

Resultados del ensayo de microscopia electrónica de transmisión

Del ensayo realizado con la microscopia electrónica de células epiteliales de la ringe a las **24 horas** control resultó lo siguiente:

Se observaron prolongaciones celulares hacia la parte superior de las células, la membrana celular se presentó bien definida, citoplasma denso con gran cantidad de organelos, núcleo bien definido con cromatina dispersa en toda su área, nucléolo bien definido; varias mitocondrias en el citoplasma y abundante retículo endoplásmico rugoso rodeando al núcleo, con gránulos de material electron denso.

A las 24 horas experimental las células presentaron una gran vacuolización en su interior, así como la disminución de los organelos celulares y ausencia de prolongaciones citoplasmáticas, el núcleo presentó pequeñas zonas de

condensación de cromatina, nucleolo bien definido, en algunas zonas hay invasión de citoplasma. En el interior de la célula se observan estructuras similares a las que se encuentran en el interior del citoplasma. Presentaron núcleos densos y picnóticos, ruptura de los lisosomas y autólisis, figuras de mielina a nivel de la membrana basal, lisis de retículo endoplásmico, hinchazón de las mitocondrias.

(Figura 1)

En el ensayo realizado de microscopía electrónica se observó que las células epiteliales de laringe a las **48 horas** fueron los siguientes:

Las células a las 48 horas de control presentaron una membrana celular bien definida, se observó disminución en la cantidad de prolongaciones ciliares citoplásmicas, citoplasma bien organizado, gran cantidad de organelos ciliares, aumento en la presencia de gránulos electrodensos, presencia de zonas no bien definidas de apariencia electroclaras, membrana nuclear bien definida, con cromatina dispersa.

Las células a las 48 horas experimental se observaron de una apariencia globular con pequeñas prolongaciones ciliares engrosadas, citoplasma denso alrededor del núcleo y presencia de gran cantidad de vacuolas. Presentaron estructuras electrodensas y el núcleo celular es irregular con zonas de citoplasma y pequeñas condensaciones de cromatina hacia la periferia. **(Figura 2)**

En el ensayo realizado de microscopía electrónica se observó que las células epiteliales de laringe a las **72 horas** fueron los siguientes:

En las células a 72 horas de control se observó una membrana celular bien definida, las prolongaciones son mucho menores, el citoplasma presentó un incremento en los gránulos de material electrodensos, así como zonas electroclaras; gran cantidad de organelos ciliares, citoplasma bien definido, cromatina dispersa.

En las células a 72 horas experimentales las células presentaron una gran vacuolización en su interior así como la disminución de los organelos celulares y ausencia de prolongaciones ciliares citoplasmáticas, el núcleo presenta pequeñas zonas de condensación de cromatina, nucléolo bien definido, en algunas hay invasión de citoplasma. En el interior de la célula se observaron estructuras similares a las que se encuentran en el interior del citoplasma. (Figura 3)

Resultados del ensayo de quimiotracción

En el ensayo de quimiotracción se observó una disminución significativa de la migración celular en las diferentes concentraciones de nicotina; siendo esta diferencia en quimiotaxis más notoria a concentraciones de 1 μ M.

En los resultados del ensayo de quimiotracción se determinó a través del microscopio de luz la cantidad de células epiteliales de laringe existentes en las diferentes concentraciones de nicotina y del control.

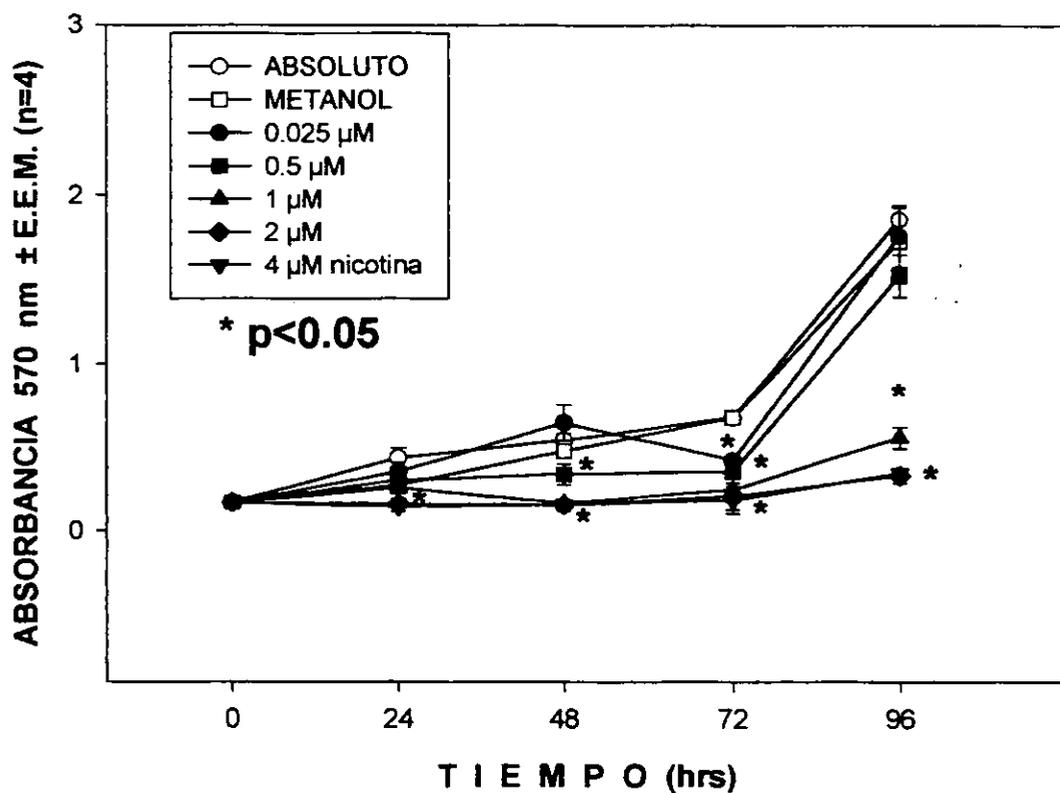
Esto significó que de acuerdo a mayor concentración de nicotina, la capacidad de quimiotracción celular disminuye; las células se alejaron de la

sustancia tóxica ya que se producen cambios en la membrana celular que afectan a la emisión de los pseudópodos (a este procedimiento se le conoce como quimiotaxis).

En el ensayo de quimiotracción se utilizaron 1×10^4 células en insertos de 10 mm de diámetro de policarbonato en pozos de 8 mm en donde a cualquier concentración de nicotina, la migración celular se observó disminuida en un 90 %.

Esto se determinó también a través de una gráfica en la cual se puede notar la diferencia con un valor significativo de $p < 0.05$. (Gráfica 4)

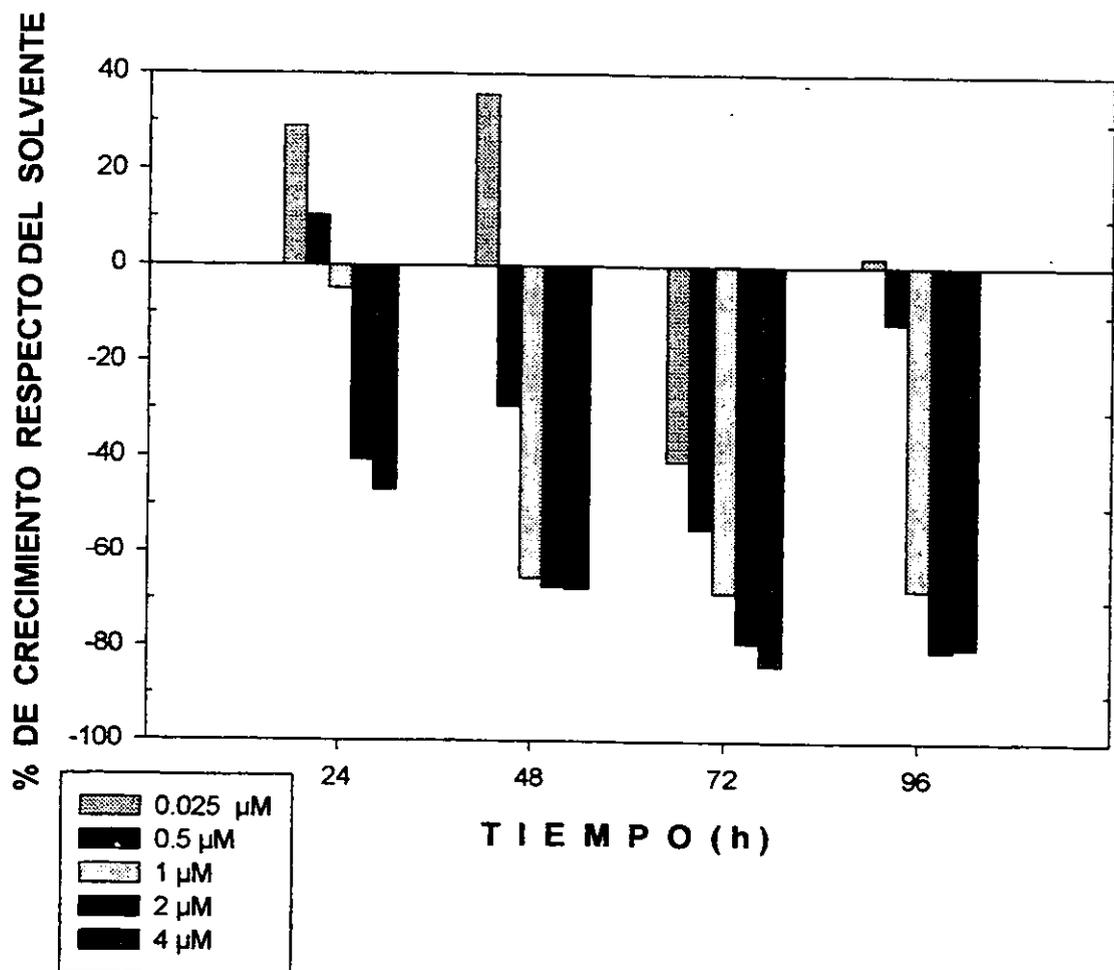
EFFECTO *IN VITRO* DE LA NICOTINA EN LA PROLIFERACION DE CELULAS EPITELIALES DE LARINGE EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DE MTT



Gráfica 1.

* Ensayo de proliferación celular

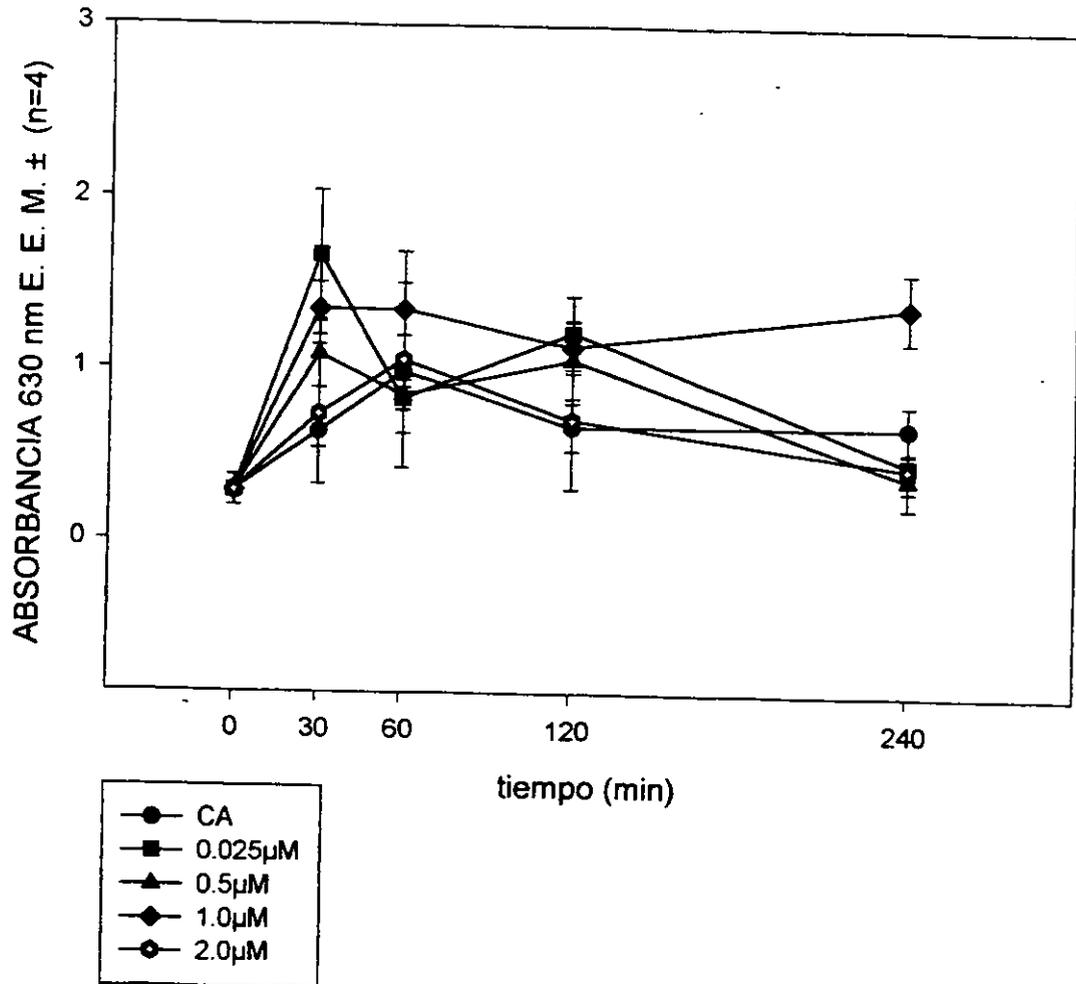
PROLIFERACION DE CELULAS EPITELIALES HUMANAS DE LARINGE TRATADAS CON NICOTINA



Gráfica 2.

* Ensayo de proliferación celular

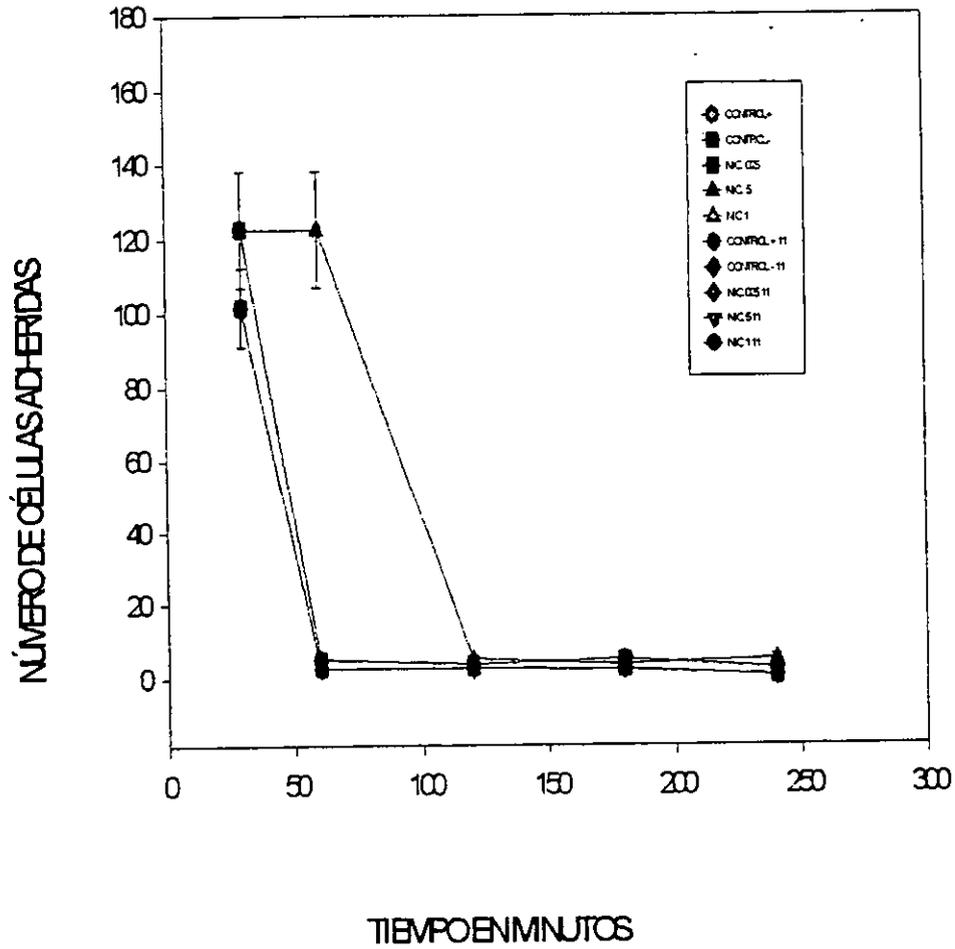
ADHERENCIA DE CELULAS EPITELIALES EN RESPUESTA A NICOTINA



Gráfica 3.

* Ensayo de adhesión celular

ENSAYO DE QUIMIOTRACCIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LARINGE HUMANA



Gráfica 4.

* Ensayo de quimiotracción

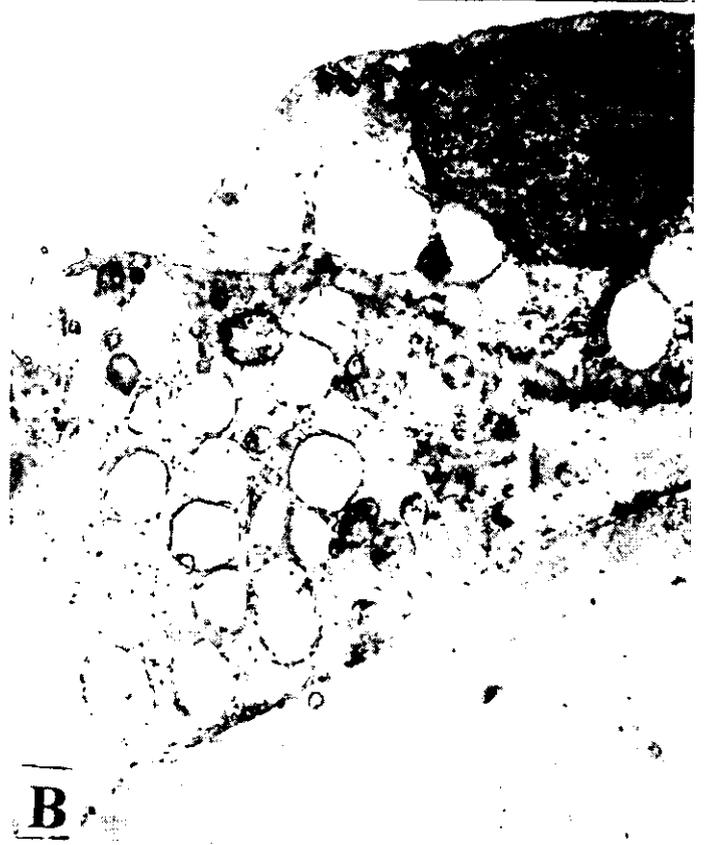
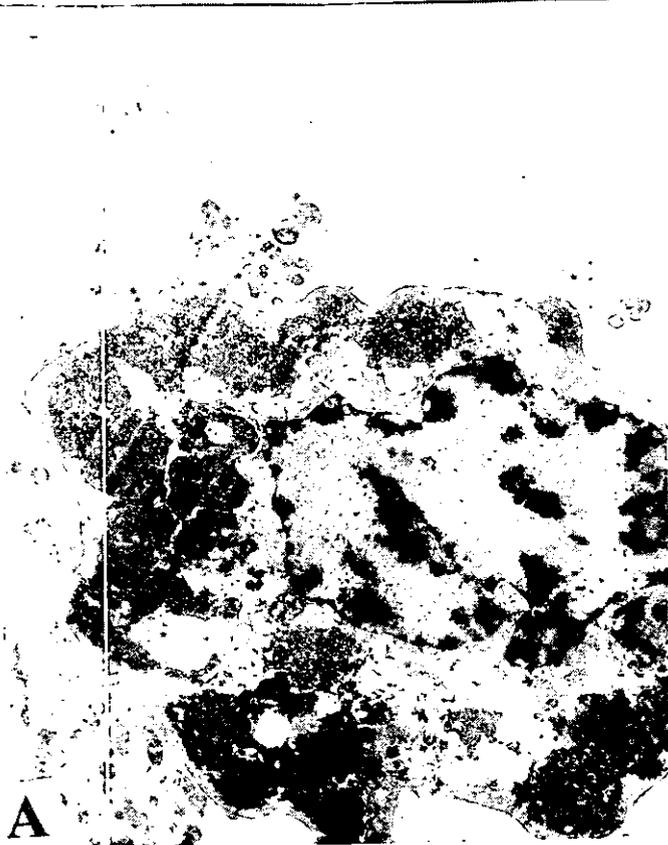
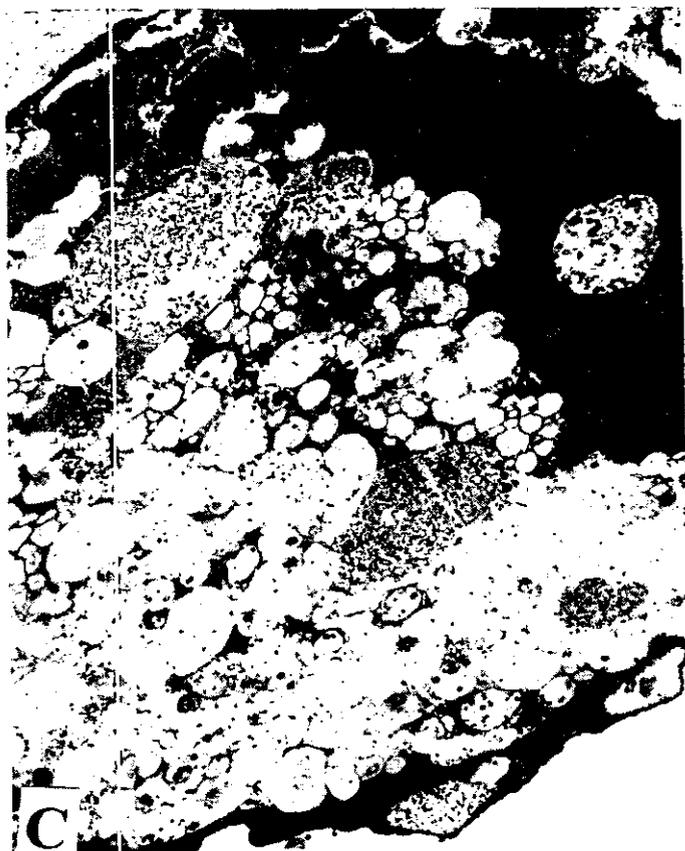


Figura 1
Fotomicrografía de las células epiteliales de laringe con nicotina a las 24 hrs vistas al microscopio electrónico de transmisión a 9.000X.
A.-control; B,C,D.-nicotina





A

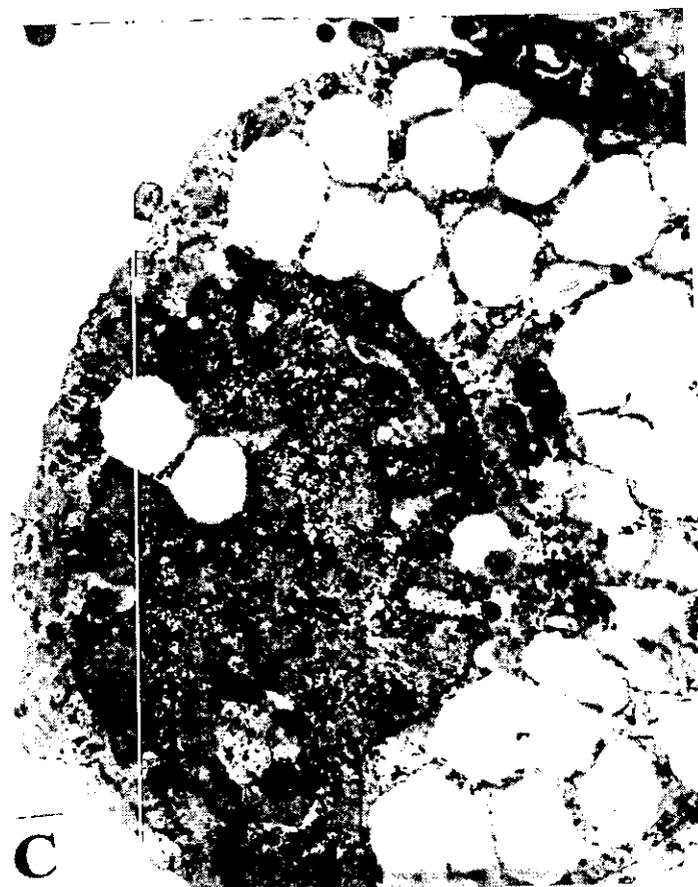


B

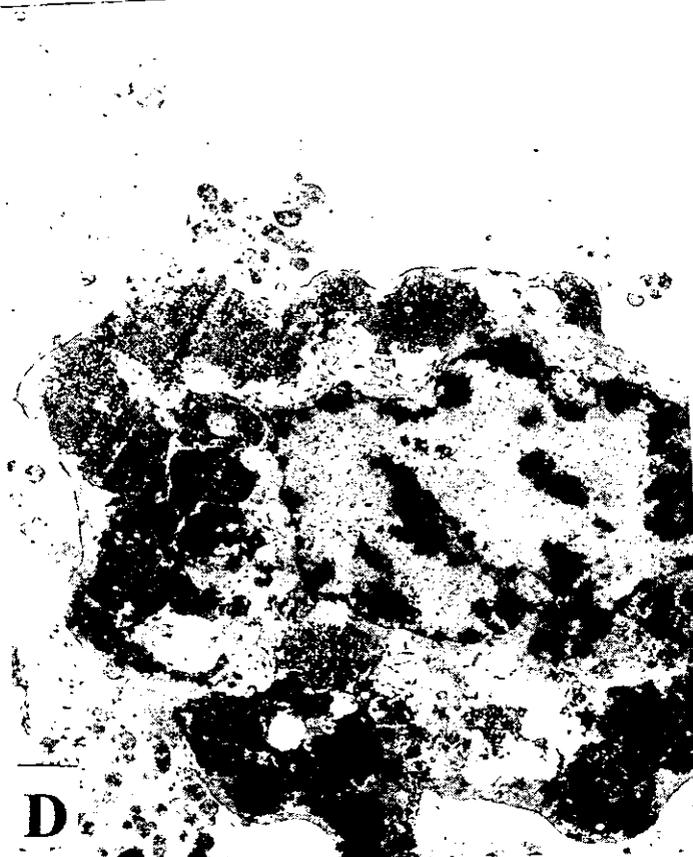
Figura 2

Fotomicrografía de las células epiteliales de laringe con nicotina a las 48 hrs vistas al microscopio electrónico de transmisión a 9.000X y 13,000X.

A.-control; B,C,D.-nicotina



C



D

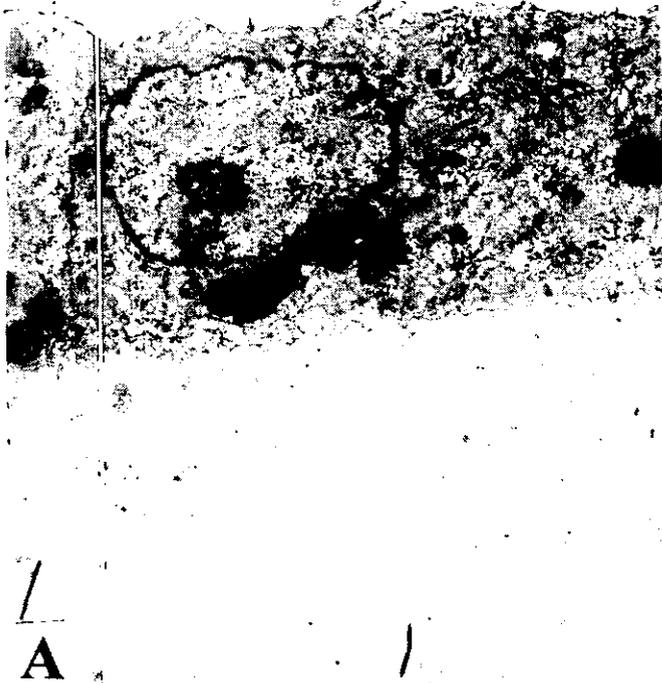
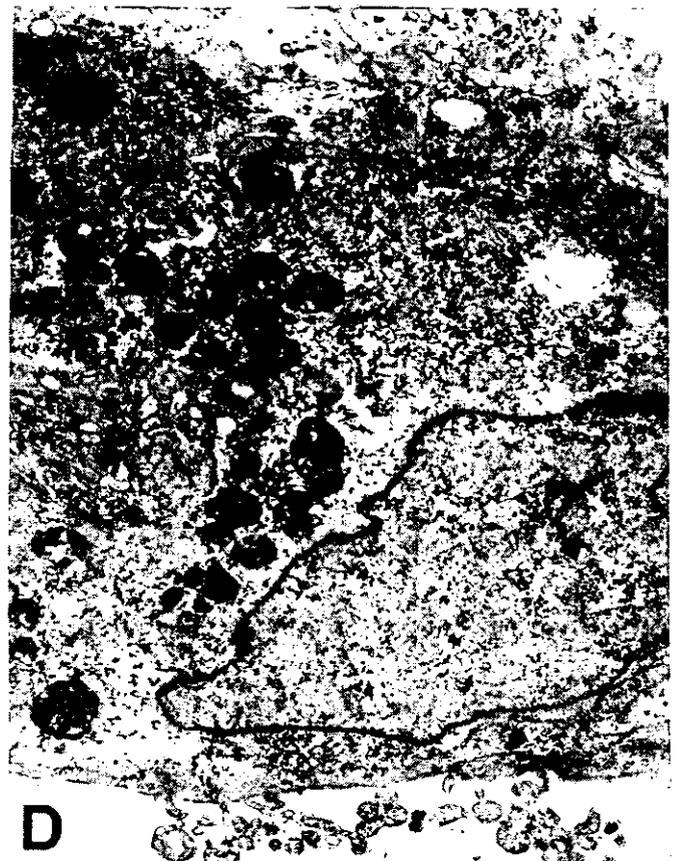
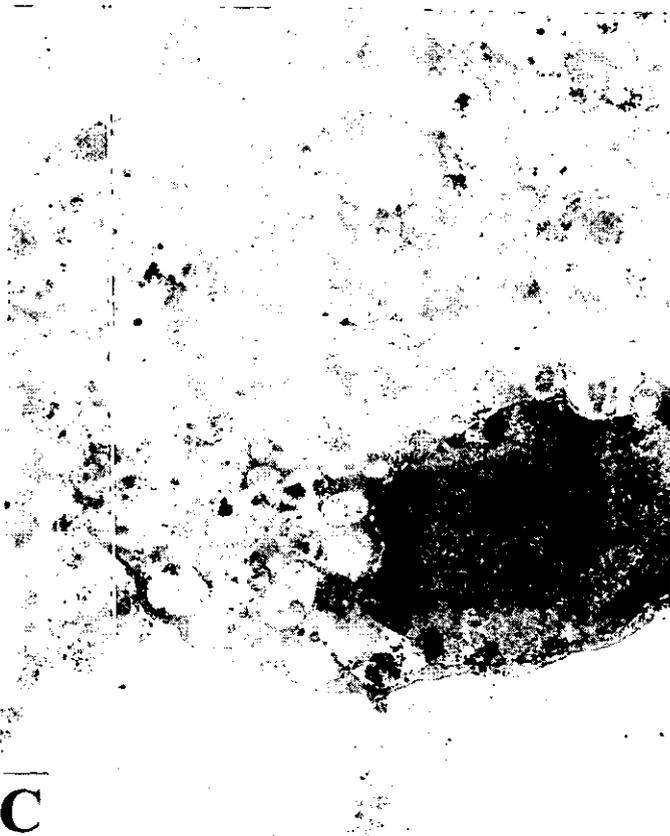


Figura 3

Fotomicrofotografía de las células epiteliales de laringe con nicotina a las 72 hrs vistas al microscopio electrónico de transmisión a 9.000X y 13.000X.

A.-control; B,C,D.-nicotina



DISCUSIÓN

El tabaquismo ha ocupado uno de los primeros lugares entre los problemas médicos y de Salud Pública, los diversos padecimientos que acarrea adquiere mayor importancia como causa de incapacidad y muerte, teniendo desde luego, serias repercusiones entre las personas que no lo son, como el fumador pasivo; recientemente se han realizado investigaciones mediante las cuales se detectaron cambios a nivel de los epitelios bucales y respiratorios, dependientes de las concentraciones del humo del tabaco y del tiempo de exposición al mismo. 75-77

El humo del cigarro tiene componentes específicos gaseosos que alcanzan a todas las porciones del epitelio bucal respiratorio. Como producto de la combustión, aproximadamente el 40% del humo del tabaco se encuentra formado por partículas de alquitrán y nicotina; el 60% restante por gases integrados por diversos compuestos entre los que destacan el monóxido de carbono, fenoles, formaldehído, cianuro de hidrógeno, acetaldehído, ácidos orgánicos, benzoquinóna, acroleína y 3-4 de benzopireno. 78-80

De acuerdo a las investigaciones realizadas la mayoría de los componentes carcinógenos del tabaco se forman debido a la alta combustión; en cuanto al componente bioquímico más importante del tabaco (nicotina) se ha mencionado que tiene un efecto mutagénico y carcinógeno para el ser humano que se ha deducido a través de análisis y estudios experimentales en animales de laboratorio. 81-83.

También se ha presumido que una persona con el hábito de fumar de 20 a 40 cigarrillos diarios y durante aproximadamente veinte años, dependiendo de la susceptibilidad, factores genéticos y la forma de inhalación de los elementos que lo componen, tendrá además de otras alteraciones en la cavidad bucal, piso de boca y tejidos adyacentes, probabilidades de desarrollar un cáncer laríngeo. ^{86,87}

Debido a que en la literatura médica y experimental no se han realizado estudios sobre el tema, se vió la necesidad de observar en forma directa el efecto que la nicotina provoca en las células epiteliales de laringe humana; para ello se creó una línea celular específica "*in vitro*", y después de someterla a varios ensayos que han quedado previamente establecidos, se detectó el efecto que la nicotina produce en ellas.

La mayor parte de los conocimientos actuales sobre la activación de las células se basan en experimentos "*in vitro*", puesto que a través de ellas las células controladas después de aplicarles diversos tipos de estímulos, se pueden estudiar así como medir sus respuestas de forma precisa. Se cree que los resultados de las células en este tipo de experimentos son las mismas que se producen normalmente *in vivo*. ^{87,88}

La conformación de esta investigación basada en diferentes estudios determinó que el ensayo de proliferación celular a concentraciones mayores de $1\mu\text{M}$ de nicotina provocó un descenso en el número de células con respecto al control en un 60%. Esto fue evidente a las 96 horas de cultivo principalmente en un 80%. La

proporción obtenida en este estudio es similar a la consignada en la literatura, ya que un individuo que fuma aproximadamente 40 cigarrillos diarios tendría una equivalencia a una concentración de $1\mu\text{M}$ durante 96 horas; las células in vivo pueden sufrir alteraciones de acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo derivadas de la susceptibilidad de cada individuo, la calidad del tabaco y la forma de presentación (inhulado o masticado o con filtro) dependiendo el sistema inmune de cada organismo. Es por ello que en células neoplásicas malignas el agente bioquímico (nicotina) provoca alteraciones en cuanto el control de crecimiento; dando como resultado una división a una velocidad variable en forma errática, que no sigue las leyes normales de la reproducción celular. Este crecimiento desordenado observado "*in vitro*" y que sucede in vivo, finalmente constituye el tumor que invade los tejidos. 89-91

El crecimiento de la célula se atribuye a sustancias que no logran detener el ciclo celular o que promueven crecimiento incontrolable. Clínicamente la velocidad del desarrollo de un tumor se mide por el tiempo de duplicación que es el período necesario para que la célula se divida y surja una nueva célula; varía de una semana a un año, y a veces más. La diferencia se debe en ocasiones al tipo particular de tejido tumoral y a la naturaleza heterogénea de las células, aunque otras son capaces de reproducirse en pocos días en el ser humano. No es raro observar que tumores voluminosos dupliquen su tamaño a una velocidad de crecimiento impresionante en muy poco tiempo. En sus últimas etapas de desarrollo, el tumor muestra muy pocas células en proliferación activa; pierde células de diferenciación,

muerte o descamación, con una rapidez comparable a la velocidad con que se reproducen. El tumor se inicia a partir de una célula, por lo tanto existe una etapa de latencia antes que la masa tumoral sea perceptible. En el momento en que aparece el tumor se considera como una etapa de continua evolución. 92-94

Lo importante de estas investigaciones es poder detectar métodos que revelen la presencia del tumor antes que su crecimiento sea observable; varios de ellos son más sensibles a la terapéutica citotóxica durante el período de latencia; es por esto que se recomienda realizar pruebas de radioinmunoensayo en todas aquellas personas que están en contacto con este agente bioquímico a través del hábito del tabaco. Dependiendo de la dosis de nicotina, su efecto relativamente discreto, es irreversible, aditivo y transmisible a la célula progenitora en un lapso de algunas horas. Los efectos se manifiestan por sí mismos únicamente después de meses o años de exposición. 94-96

La nicotina que forma parte del contenido del tabaco, se le considera un agente carcinógeno químico y en combinación con otros componentes, reviste mayor importancia clínica por su efecto en el tracto aereodigestivo superior; independientemente de que el tabaco sea masticado, fumado o simplemente inhalado. Todas las formas son débilmente carcinogénicas y requieren de una alta dosis total para sufrir efecto. Esta información se ha adquirido a través de varios estudios epidemiológicos realizados a nivel mundial, a cuya aceptación se ha resistido la industria del tabaco, con base a razones económicas, las que también

manifiestan y sostienen que no existen pruebas experimentales que apoyen los hallazgos clínicos evidentes. 81-84

En los resultados de adhesión celular se determinó que a la primera hora posterior a la aplicación de la nicotina, la adhesión de las células se incrementó en un 70 % para decrecer paulatinamente hasta el nivel basal una vez transcurridos 240 minutos. Sin embargo la concentración de 1 μ M al parecer favoreció la adherencia de estas células al término del experimento en un 90%, demostrando diferencias significativas de $p < 0.05$. Se determinó que a cualquier concentración de nicotina la migración celular se vió disminuída ($p < 0.05$).

El ensayo indica que la célula neoplásica pierde paulatinamente la capacidad de adhesión celular en un momento dado, esto hace independiente a la célula flotando casi en forma libre. El resultado de esto y un crecimiento descontrolado de las células pueden propiciar una metástasis a partir de un cáncer primario, puesto que la membrana celular controla la comunicación entre las células vecinas. La distorsión de los mensajes puede limitar la capacidad de las células para conservarse en contacto e interpretar las señales que limitan la reproducción celular.

81-83

La estructura involucrada en esto, es el genoma de la célula que se alteró por la aplicación de la nicotina, sin embargo cuando las células cancerígenas se adhieren firmemente a los vasos sanguíneos, tienen mayor probabilidad de producir metástasis que cuando son poco adherentes a ellos; aquí es donde interviene el sistema inmunitario en nuestro organismo; esta tendencia de producir metástasis no

es al azar sino que claramente refleja la presencia de un control de origen genético. El éxito del proceso metastásico parece que depende de la química de superficie de la célula cancerosa y de la relación que guardan entre si dichas células con la pared de los vasos. Las metástasis varían, de entre uno y otro paciente, y de un cáncer a otro. 99-101

En el ensayo de quimiotracción se determinó que a cualquier concentración de nicotina la migración celular se vió disminuida ($p < 0.05$). El estímulo que provoca el desplazamiento de la célula tumoral se conoce poco, pero se piensa que no es la simple pérdida de la inhibición por contacto o la adherencia con las células vecinas.

Las células cancerosas tienen tendencia a la movilidad, lo que aunado a la pérdida de la afinidad por contacto, produce metástasis en sitios distantes del organismo. 102-105

En el ensayo realizado con microscopia electrónica se observó que las células epiteliales experimentales de laringe presentaron una membrana celular bien definida con poros que selectivamente dejan entrar y salir moléculas de diferentes tamaños, lo que resulta importante puesto que las funciones de esta membrana son vitales para la célula.

El observar muy poca cantidad de mitocondrias nos indica que la célula pierde sus centrales motoras, las mismas que tienen la capacidad de almacenar energía en moléculas específicas disponibles para la célula; estas se encuentran constituidas por un retículo endoplasmático liso en su parte externa y uno rugoso en su parte interna que ayudan a incrementar el potencial para producir reacción liberadora de

energía. Dentro de ellas se encuentra una matriz semisólida que contiene las enzimas que catalizan las reacciones involucradas en la liberación de la energía de los nutrientes. También se encuentra ADN y ribosomas, lo que permite a la mitocondria sintetizar proteínas sin que participe el núcleo y el mecanismo de síntesis de proteínas presentes en el citoplasma. Las mitocondrias obtienen energía de las moléculas y la almacenan en forma fácilmente utilizable por la célula. Todas estas acciones se perdieron por la aplicación de nicotina a diferentes concentraciones. Lo anterior ha sido sustentado a través de la literatura mediante la microscopia electrónica de transmisión. 108-110

Lo antes mencionado se realizó con el propósito de determinar que efectivamente la célula en cualquier tiempo experimental sufre alteraciones como núcleos densos y picnóticos, ruptura de los lisosomas y autólisis, figuras de mielina a nivel de la membrana basal, lisis de retículo endoplásmico, alteración de las mitocondrias y condensaciones; dándonos como resultado una lesión irreversible. A esta lesión se asocia morfológicamente la intensa vacuolización de las mitocondrias, incluyendo las crestas, alteración de la membrana basal, inflamación de los lisosomas y pérdida de cilios. 111,112

La fisiopatología del desarrollo del tumor estudiado y comprobado por la literatura de investigaciones recientes, nos indica que la lesión que se produce en el epitelio ciliar que recubre desde la nariz hasta los bronquios incluyendo laringe, se debe a los contaminantes del humo del cigarro, ejerciendo su acción tóxica sobre el moco y las células epiteliales, produciendo ciliostasis, modificación de las secreciones, liberación de enzimas proteolíticas debido a los polinucleares y

modificaciones de las propiedades reológicas del moco. Asimismo en los fumadores se encuentra alteración a través de los cilios, los cuales son más cortos que los de los no fumadores; observando también ausencia de coordinación en los movimientos y en algunos sitios hasta pérdida de cilios, así como inflamación de las células basales y atipias celulares.

Estos ensayos se pueden sustentar únicamente con estudios que se han realizado con animales de experimentación donde se les administraron diferentes dosis de nicotina durante períodos variables, y a los que se les efectuaron estudios histopatológicos del epitelio nasal mediante microscopia electrónica, comparados con los controles. Los resultados obtenidos en la mayoría de los estudios fue que a menor concentración de humo del tabaco se observó pérdida ciliar, infiltrado linfocitario submucoso; además en la microscopia electrónica se observaron cambios a nivel ciliar, como asimetría y elongación de los mismos. Conforme se les aumentaba la concentración del humo, a la pérdida ciliar se le agregaba un incremento en la cantidad de células caliciformes y la presencia de un franco infiltrado linfocitario. Se menciona también en los estudios que la cantidad de cigarrillo por día (20) advierten alteración mayor y pérdida de cilios. 113-116

Por los resultados anteriormente mencionados podemos concluir que el comportamiento celular visto a través de estos ensayos son muy similares al desarrollo de neoplasias malignas provocadas por este tipo de agente bioquímico, el cual por sí solo es capaz de provocar alteración a nivel proliferativo, adhesivo, quimiotáctico y ultraestructural en la célula.

CONCLUSIONES

- La nicotina por sí sola es capaz de provocar alteración a nivel proliferativo, adhesivo, quimiotáctico y ultraestructural en la célula.

- A nivel proliferativo se demostró que a concentraciones mayores de 1 μM de nicotina se provoca un descenso importante en el número de células con respecto al control en un 80%.

- A nivel adhesivo se comprobó que durante la primera hora posterior a la aplicación de la nicotina, la adhesión incrementa, para decrecer paulatinamente hasta el nivel basal una vez transcurridos 240 minutos y que a la concentración de 1 μM la adhesión se favorece.

- A nivel de quimiotracción se determinó una disminución significativa de la migración celular en las diferentes concentraciones de nicotina, siendo más determinante a 1 μM .

- A nivel de quimiotracción se determinó una disminución significativa de la migración celular en las diferentes concentraciones de nicotina, siendo más determinantes a 1 μM .

- A nivel ultraestructural se observaron cambios de configuración, las prolongaciones ciliares, los organelos citoplasmáticos disminuyeron, el núcleo presentó zonas de condensación de cromatina así como gran cantidad de vacuolas electrondensas dentro del citoplasma.

RECOMENDACION DE INVESTIGACIONES A FUTURO

Consideramos realizar más estudios experimentales "*in vitro*" sobre el efecto de la nicotina en células epiteliales de laringe humana y en animales de laboratorio para complementar esta investigación que se considera muy importante por los resultados obtenidos.

- A nivel ultraestructural se observaron cambios de configuración, las prolongaciones ciliares, los organelos citoplasmáticos disminuyeron, el núcleo presentó zonas de condensación de cromatina así como gran cantidad de vacuolas electrondensas dentro del citoplasma.

RECOMENDACION DE INVESTIGACIONES A FUTURO

Consideramos realizar más estudios experimentales "*in vitro*" sobre el efecto de la nicotina en células epiteliales de laringe humana y en animales de laboratorio para complementar esta investigación que se considera muy importante por los resultados obtenidos.

Bibliografía

- 1.- Morales Suárez. and Varela MM. Toxic habits in relation to cancer of larynx. *Acta Otorrinolaringol Esp*, **48**: 45-50, 1997.
- 2.- Boyle P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe; a review including the recommendations of European Cancer Experts Consensus meeting, Helsenki , *Lung cancer*. **17**: 1-60,1997
- 3.- Moe K. Regional metastasis in patients with advanced laryngeal cancer. Department of veterans affairs laryngeal cancer Study Group. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg*. **122**: 644 -648, 1996.
- 4.-Szyfter W. Estimation of aromatic DNA adduct levels in laryngeal tumors in relation to cancer staging .*Otolaryngol Pol*. **49**: 410-417, 1995.
- 5.- Dole R. Cancers weakly related to smoking, *Br. Med Bull*. **5**: 35-49, 1996.
- 6.- Riboli E. Nutrition and laryngeal cancer. *Cancer causes control*. **7**: 147-56, 1996.
- 7.- Cattaruzza MS. Epidemiology of laryngeal cancer . *Eur. J. Cancer B. Oral oncol*. **32**: 293-305, 1996.
- 8.- Proiet MN. Head and Neck Cancer screening among 4611 tobacco users older than forty years. *Otolaryngol head and Neck Surg*. **116**: 201-208,1997.
- 9.- Maier H. Alcohol drinking and tobacco smoking are the chief risk factors for ENT tumors. Increased incidence of mouth., cavity, pharyngeal and laryngeal carcinomas. *Fortschr. Med*. **20**: 157 -160,1995.
- 10.- Anonymous, cigar smoking among teenagers. United States. Massachusetts, and new York; 1996. *MMWR Morb Mortal WKLY Rep*. **46**: 433-440,1997.
- 11.- Kuller LH. and Ockene JK. Department of Epidemiology; Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh Pennsylvania 15261. *Prev. Med.*. **20**: 638-654, 1991
- 12.- Bolinder G. and Alfredsson L. Smokeless use and increased cardiovascular mortality among swedish construction workers. *Am. J. Pub. health*, **84**: 399,400, 1994.

- 13.- Komdo T. and Tagami S. Current Smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. *Am. J. Respiratory & Critical Care Medicine*. **149**: 178-182, 1994.
- 14.- Gennbaceu, O. Maternal Smoking inhibits early human cytotrophoblast differentiation, *Reprod. Toxicol.* **9**: 245-55, 1995.
- 15.- Hasséus B. Immunotoxic effects of smokeless tobacco on the accessory cell function of rat oral epithelium. *Eur. J. Oral Sci.* **105**: 45-55, 1997.
- 16.- Maier H. and Tish M. Epidemiology of laryngeal cancer, results of the Heidelberg case-control study. Department of otorrinolaryngology/Head and Neck Surgery. Armed Forces Hospital ULM. *Acta otolaryngol Suppl (stockh)*. **527**: 160-164, 1997.
- 17.- Liu Y. Metabolism and macromolecular interaction of tobacco-specific carcinogen 4- (methylnitrosamino) 1- (3 pyridyl) 1- butan one in cultured explants and epithelial cells of human buccal Mucosa *Carcinogenesis* . **14**: 2383-2388, 1993.
- 18.- Li Wan. and Po A. Transdermal nicotine in smoking cessation. A meta-analysis. *European Journal of clinical Pharmacology*, **45**: 519-528, 1993.
- 19.- Heishman SJ., Snyder FR. and Henningfield JE. Performance, subjective, and physiological effects of nicotine in no- smokers. *Rug and Alcohol Dependence*. **34**: 11-18, 1993.
- 20.- Tate JC., Pomerleau OF. and Pomerleau CS. Temporal stability and within-subject consistency of nicotine withdrawal symptoms. *Journal of Substance Abuse*. **5**: 3553-3563, 1993.
- 21.- Pomerleau C.S., Ehrlich E. and Tate JC. The female weight-control smoker: a profile. *Journal of Substance Abuse*. **5**: 391-400, 1993
- 22.- Gutierrez Ganzarain A., Playan Uson J. and Rubio Aranda E. Effect of the smoking habit on carbohydrate metabolism. *Anales de Medicina Interna*. **10**: 583-586, 1993.
- 23.- Seaton MJ. and Vesells ES. Variables affecting nicotine metabolism. *Pharmacology and Therapeutics*. **60**: 461-500, 1993.
- 24.- Tseng C.J., Appalsamy M. and Robertson D. Effects of nicotine on brain stem mechanisms of cardiovascular control. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **265**: 1511-1518, 1993.
- 25.- Toth E., Vizi ES. and Lajtha A. Effect of nicotine on levels of extracellular amino acids in regions of the rat brain in vivo. *Neuropharmacology*. **32**: 827-632, 1993.

- 26.- Hart C. and Ksir C. Nicotine effects on dopamine clearance in rat nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry*. **66**: 216-221, 1996.
- 27.- Reddy A., Sood A. and Rust Pf. The effect of nicotine on in vitro sperm motion characteristics. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. **12**: 217-2.23, 1995.
- 28.- Wigoda P., Netscher DT. and Thornby J. Vasoactive effects of smoking as mediated through nicotinic stimulation of sympathetic nerve fibers. *Journal of Hand Surgery-Americana* Volum. **20**: 718-724, 1995.
- 29.- Hee J., Callais F. and Momas I. Smokers' behaviour and exposure according to cigarette yield and smoking experience. *Pharmacology, Biochemistry Behavior*. **52**: 195-203, 1995.
- 30.- Furuno K., Okazaki M. and Esto K. Effects of exposure to cigarette smoke on intestinal propulsion in rats. *Acta Medica*. **49**: 201-204, 1995.
- 31.- Madhok TC., Matta SG. and Sharp BM. Nicotine regulates nicotinic cholinergic and subunit m RNAs in PC 12 cells through protein kinase A. *Brain Research Molecular Brain Research*. **32**: 143-150, 1995 .
- 32.- Doolittle Dj., Winegar R. and Lee Ck Caldwell Ws. The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutation Research*. **344**: 95-102, 1995.
- 33.- Murray Rp., Johnston JJ. and Dolce JJ. Social support for smoking cessation and abstinence; the Lung Health Study. Lung Health Study Research Group. *Addictive Behaviors*. **20**: 159-170, 1995.
- 34.- Boyle RG., Jensen J. and Hatsukami DK. Measuring dependence in smokeless tobacco users. *Addictive Behaviors*. **20**: 443-450, 1995.
- 35.- Bush R. and Wooden M. Smoking and Absence from work: Australian evidence. *Social Science Medicine*. **41**: 437-446, 1995.
- 35.- Fant RV. and Schuh KJ. Response to smoking as a function of prior smoking amounts. *Psychopharmacology*. **119**: 385-390, 1995.
- 37.- Bencherif M., Fowler K. and Lukas RJ. Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal brain. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. **275**: 987-994, 1995.
- 38.- Bobo JK., Slade J. and Hoffman AL. Nicotine Addiction counseling for chemically dependent patients. *Psychiatric Services*. **46**: 945-947, 1995.

- 39.- Bartalena L., Bogazzi F. and Tanda ML. Cigarette smoking and the thyroid. *European Journal of Endocrinology*. **133**: 507-512, 1995
- 40.- Waldum HL., Nilsen OG. and Nilsen T. Long-term effects of inhaled nicotine. *Life Sciences*. **58**: 1339-1346, 1996.
- 41.- Wu-Wang Cy., Xu Xr. and Wang SL. Benzo(a)pyrene and nicotine alter prostaglandin E2 receptor and its functions in hamster buccal mucosa. *Toxicology Letters*. **84**: 81-88, 1996.
- 42.- Barnes DE., Hanaauer P. and Slade J. Environmental tobacco smoke. The Brown and Williamson documents. *JAMA*. **274**: 248-253, 1995.
- 43.- Shu XO., Hatch MC. and Mills J. Maternal Smoking, alcohol drinking, caffeine consumption, and fetal growth: results from a prospective study. *Epidemiology*. **6**: 115-120, 1995.
- 44.- Hemler M.E. VLA proteins in the integrin family: structure, functions, and their role on leucocytes. *Annual Review of Immunology* **8**: 365-400, 1990.
- 45.- Hynes R.O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell Adhesion. *Cell* **69**: 11-25, 1992
- 46.- Akiyama S.K. and Larjava H. Differences in the biosynthesis and localisation of the fibronectin receptor in normal and transformed cultured human cells. *Cancer Res.*, **50**: 1601-1607. 1990.
- 47.- Picker L.J., Nakachee M. and Butcher, E.C. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules in diverse cell types. *J. Cell Biol.* **1**: 9227-9237, 1989.
- 48.- Peltone J., Larjava H. and Jakkola, D. (1989) Localisation of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminina in human skin. *J. Clin Invest.* **84**: 1916-1917, 1993.
- 49.- Vleminckx K., Vakaet L. and Jr., Mareel M. Genetic modulation of E-cadherin expression by epithelial tumour cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. **66**: 107-119, 1991
- 50.- Hynes R.O. The impact of molecular biology on models for cell adhesion. *BioEssays* **16**: 663-669, 1994.
- 51.- Heino J. Regulation of integrin expression. In cell adhesion molecules in cancer and inflammation. Epenetos A.A., Pignatelli M. Ed Harwood academic publishers Switzerland **12**: 147-153., 1995.

- 52.-** Hynes R.O. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*. **48**: 549-554, 1987.
- 53.-** Hynes R.O. Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*. **69**: 11-25, 1992.
- 54.-** M.H. Ginsberg. Integrins: dynamic regulation of ligand binding in: Cell adhesion: the cytoplasmic face of D. Critchley 654 meeting held at the University of Leicester 4-7 april. Department of vascular biology, *The scripps research institute, La Jolla Ca. .S.A.Biochem Soc Trans. Abstract*. 1995.
- 55.-** Jalkanen S., Reichert R.A. and Gallatin W.M. Homing receptors and the control of lymphocyte migration *Immunol Rev*. **91**: 39-60, 1986.
- 56.-** Schwartz M.A., Ingber D.E. and Lawrence M. Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH. *Exp Cell Res*. **195**: 533-535, 1991.
- 57.-** Hormia M., Ylanee J. and Virtanen Y. Expression of integrins in human gingiva. *J. Dent. Res*. **69**: 1817-1823. 1990.
- 58.-** Main A.L., Harvey T.S. and Baron M. The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions *Cell*. **71**: 671-678, 1992.
- 59.-** Potts J.B. and Campbell ID. Fibronectin structure and assembly *Curr. Op.1 Cell. Biol*. **6**: 648-665., 1994.
- 60.-** Morla A. and Ruoslahti E. A fibronectin self-assembly site involved in *fibronectin matrix assembly: reconstruction of a synthetic peptide*. *J. Cell Biol*. **118**: 421-429, 1992.
- 61.-** Yamada K.M. Cell surface interactions with extracellular materials. *Ann Rev Biochem*. **52**: 761-769, 1983.
- 62.-** Vineis P., Talaska G. and Malavaille C. DNA adducts in urothelial cells: relationship with biomarkers of exposure to arylamines and polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco smoke. *International Journal of Cancer*. **65**: 14-16, 1996.
- 63.-** Department of Oral Biology, Indiana University, Indianapolis 46202-5186, USA. *Clin.Diag. Lab. Immunol*. **3**: 578-583. 1996.
- 64.-** kratzke RA. And Kramer. Evaluation of in vitro chemosensitivity using human lung cancer cell line. *J. BSCell Biochem Suppl*. **24**: 160-164. 1995.
- 65.-** Abul K., Abbas. And Andrew H. Inmunología Celular Y Molecular. Segunda Edición .Editorial Interamericana. 1995.

- 66.- Griflais R., Andre P.M. and Thibon M. K-tuple frequency in the human genome and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **25**: 3887-3891. 1991.
- 67.- Hopkinson I., Evans W. and Chant D. Institution. Wound healing Research Unit, University of Wales Collage of medicine, cardiff, UK. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection of collagen transcripts in healing human wounds. *European Journal of Clinical Investigation*. **25**: 539-542, 1995.
- 68.- Chomczynsky P. and Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159,1997.
- 69.- Kruszak JR., Novak LA. and Brown HG. An ultrastructural analysis of the epithelial - fiber interface (EFI) in primate lenses. Department of pathology, Rush-Prosby-ST Luke's Medical Center, IL 60612. *Exp. Eye Res.* **61**: 579-597, 1995.
- 70.- Wong CJ., Peiffer IR. and Oglesbee S. Feline Ocular Epithelial response to growth factors in vitro. Department of ophtalmology, School of medicine, University of North Carolina Hill 27599-7040 USA. *Am J. Vet Res.* **57**:1748-1752,1996.
- 71.- Swaminathan R., Bicknese S. and Periasamy N. Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane; translational diffusion of a small fluorescent solute measured by total internal reflection - fluorescence photobleaching recovery. Departmente of medicine.USA. *Biophys J.* **71**: 1140 -1145, 1996.
- 72.- Guibaud N., Gas N. and Dupont MA. Effects of differentiation inducing agents on maturation of human MCF - 7 breast cancer4 cells. Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Fondamentales, CNRS, toulouse, France. *J. Cell Physiol.* **1**: 1622-1672, 1990.
- 73.- Dallai S., Guilisano M. and Dolli, G. Scanning electronic microscopy study of nasopharyngeal carcinoma. Department de Anatomia Umana, Università di Firenze. *Eiol Sol Ital Biol Sper.* **66**: 303-308, 1990.
- 74.- Riciardelli EJ., Persing J.A. and Romano JA; Morgan RF; OGLE RC.A rapid in vitro assay of celular chemomigration in a epithelial carcinoma cell line. Section Of Plastic Surgery, University of Iowa. Hospitals and clinics, Iowa city, USA. *Plast. Reconstr Surg.* **96**: 1689-1693, 1995.
- 75.- Kuller L. h., Ockene. And J. K. Meilahn E. Carcinogenesis. *Prev. Med.* **20**: 638-654. 1991.

- 76.- Hasséus B., Wallstrom M. and Osterdahl B G. Immunotoxic effects of smokeless tobacco on accessory cell function of oral epithelium. *Eur J Oral Sci*, **105**: 45-51, 1997.
- 77.- Kodama M., Kaneko M. and Aida M. Free chemistry of cigarette smoke and its implications in human cancer. *Anticancer Res*. **17**: 433-437, 1997.
- 78.- Witschi H., Espiritu I. and Peeake JL. The carcinogenicity of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis*. **18**: 575-586, 1997.
- 79.- Gregtory R.L. and Gfell LE. Effect of nicotine on secretory component synthesis by secretory epithelial cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. **3**: 578-583, 1996.
- 80.- Blank U., Ruckes C. and Clauss W.. Effects of nicotine on human nasal epithelium: evidence for nicotinic receptor in non-excitabile cells. *Pflugers Arch*. **434**: 531-586, 1997.
- 81.- Hoffmann D., Melikian A.A. and Wynder. EL. Scientific challenges in environmental carcinogenesis. *Prev Med*. **25**: 14-22, 1996.
- 82.- Gupta P.C., Murti PR. And Bhonsle RB. Epidemiology of cancer by tobacco products and the significance of TSNA. *Crit Rev Toxicol*. **26**: 183-198, 1996.
- 83.- Hoffmann D., Rivenson A. and Heecht SS. The biological significance of tobacco-specific N-nitrosamines: smoking and adenocarcinoma of lung. *Crit Rev Toxicol*. **26**: 199-211, 1996.
- 84.- Boule P. Cancer , cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations el European Cancer Experts Consensus Meeting, Hælsinki. *Lug cancer*. **17** : 1-6, 1997
- 85.- Waldum HL., Nilsen, OG. and Nilsen T. Long-term effects of inhaled nicotine. *Life Sci*. **58**: 1339-1346. 1996.
- 86.- Van Gilder TJ., Remington PL. And Fiore MC. The direct effects of nicotine use on human health. *Wis Med J*. **96**: 43.48, 1997.
- 87.- Zur hausen H. Papillomavirus infecctions a mayor cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. **1288**: 55-78. 1996.
- 88.- Fabrikant JL. The Kinetics of cellular proliferation in human tissues. Determination of duration of DNA synthesis using double labeling autoradiografy. *Br J. Cancer* .**24**: 122-127. 1990.

- 89.- Speyer MT., Jackson JA. and Burkey BB. The effects of 13-cis retinoic acid on squamous cell carcinoma proliferation and adhesion to extracellular matrix proteins. *Laryngoscope*. **107**: 44-48, 1997.
- 90.- Warner HR. Aging and regulation of apoptosis. *Curr Top Cell Regul*. **35**: 107-121, 1997.
- 91.- Hoying JB. and Williams SK. Effects of basic fibroblast growth factor on human microvessel endothelial cell migration on collagen 1 correlates inversely with adhesion and is cell density dependent. *J. Cell Physiol*. **168** :294-304. 1996.
- 92.-Chow M. and Rubin H. Irreversibility of cellular aging and neoplastic transformation: a clonal analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 9793-9798, 1996.
- 93.- Kyo S., Klumpp DJ. and Inoue M. Expression of API during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J. Gen Virol*. **78**: 401-411, 1997.
- 94.- Drummond AE., Mc Pherson SJ. and Laslett. A. Application of a chromogenic bioassay for the measurement of the proliferation of endothelial cells in vitro under the influence of the effects of steroid hormones and growth factors. *J Biochem Biophys Methods*. **31**: 123-134, 1996.
- 95.- Broich G., Lavezzi AM. and Biondo, B. PCNA a cell proliferation marker in vocal cord cancer. Part 11: Recurrence in malignant laryngeal lesions. *In Vivo*. **10**: 175-178, 1996.
- 96.- Kusaba Y. Clinicopathological study on the proliferation and differentiation of laryngeal carcinoma and dysplasia. *Fukuoka Igaku Zasshi*. **83**: 426-433, 1992.
- 97.-Jecker P., Ptok M. and Pabst R. Age dependency of the composition of immunocompetent cells and expression of adhesion molecules in rat laryngeal mucosa. *Laryngoscope*. **106**: 733-738, 1996.
- 98.- Keely PJ., Fong AM. and Zutter MM. Alteration of collagen- dependent adhesion, motility, and morphogenesis by expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. *J cell Sci*. **108**: 595-607, 1995.
- 99.- Fujii K., Dousaka Nakajima N. and Imamura S. Epidermal growth factor enhancement of HSC-1 human cutaneous squamous carcinoma cell adhesion and migration on type I collagen involves selective up-regulation of alpha 2 beta 1 integrin expression. *Exp. Cell. Res*. **216**: 261-272, 1995.

- 100.-** Zaidi TS., Fleiszig SM. and Preston, MJ. Lipopolysaccharide outer core is a ligand for cornelia cell binding ingestion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **37**: 976-986, 1996.
- 101.-** Ricciardelli EJ., Persing JA. And Romano JA. A rapid in vitro assay of cellular chemomigration in an epithelial carcinoma cells line. *Plast Reconstr. Surg.* **96**: 1689-1693, 1995.
- 102.-** Rosen EM., Golberg ID. and Liu-D. Tumor necrosis factor stimukates epithelial tumor cell motility. *Cancer Res.* **51**: 5315-5321, 1991.
- 103.-** Makman MH., Bilfinger TV. and Stefano GB. Human granulocytes contain an opiate alkaloid selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immuol.* **154**: 1323-1330, 1995.
- 104.-** Sherratt JA., Sage EH. and Murray JD. Chemical control of eukaaryotic cell movement : a new model. *J Theor Biol.* **162**: 23-40,1993.
- 105.-** Jay PY., Pasternak C. and Elson EL. Studies of mechanical aspects of amoeboid locomotion. *Blood Cells.* **19**: 375-386, 1993.
- 106.-** Partsch G. and Schwarzer C. An indirect bioluminescence method for the quantitative meaaasurement of poly morphonuclear cell chemotaxis. *J Biolumin Chemilumin.* **6**: 159-167, 1991.
- 107.-** Lafrenie RM., Wahl, LM. and Epstein JS. HIV-1- Tat protein promotes chemotaxis and invasive behavior by monocytes. *J Immunol.* **157**: 974-977, 1996.
- 108.-** kahler CM., Kirchmair R. and Kaufmann G. R. Microscopic emanation of laryngeal cancer *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**: 932-939, 1997.
- 109.-** Ziemski Z., Rak J. and Krajewska B. Bochnia M. Histological and electron microscopic examinations of laryngeal papilloma in children and adults. *Otolaryngol Pol.* **44**: 19-32. 1990.
- 110.-** Szewczyk AJ. Correlation of clinical and histological pictures of precancerous conditions and early-stage glottic carcinoma. *Otolaryngol.* **46**: 448-456, 1992.
- 111.-** Wenig BM. Laryngeal mucosal malignant melanoma. A clinicopathologic, immohistochemical, and ultrastructural studdy of four patients and a review of the literature. *Cancer.* **75**: 1568-1577, 1995.

112.- Kasantikul V., Keelawat S. and Maneesri S. Panichabhongse. Moderately differentiated neuroendocrine carcinoma (atypical carcinoid) of the larynx. *J med Assoc Thai.* **80**: 396-401. 1997.

113.-Teixeira De Magalhaes F. and Pardal De Oliveira. Angiomyxoma of larynx. Report of one case of a myxoid fibbrohistiicytic lesion. *Pathologica.* **87**: 539-543,1995.

114.- Murakami H., Matsuoka H. and Fukiage T. Electron microscopic observation of killer cells induced by mixed culture of lymphocytes with autologous cancer cells and further culture with recombinant interleukin-2. *Auris Nasus larynx.* **19**: 175-188, 1992.

115.- Hoki K., Sambe S. and AsakuraK. Malignant melanoma in the maxillary sinus- a case successfully treated with radiotherapy. *Auris Nasus larynx.* **12**: 81-87, 1985.

CURRICULUM VITAE

NOMBRE: González Malagón M.D. Cecilia

DOMICILIO: Hacienda de Mimiahuapan No. 16 ote. La
Floresta Coyoacan, Tlalpan. CP: 014310.
México, D.F.
Telefono. 677-44-66

ESCOLARIDAD: Lic. en Odontología
Universidad Intercontinental 82-86
México, D. F.
Cédula profesional No. 1894045

Especialidad en Patología Bucal
Universidad Autónoma Metropolitana 93-95
Unidad Xochimilco
Registro Profesional No. 94100086

Sub-especialidad en Patología Bucal Oncológica.
Instituto Nacional de Cancerología
Médico Residente R-2 S.S.A.
Adscripción: División de Educación Médica
Ingreso: 01.03-95
Egreso: 03-07-97
México. D:F:

Estudiante de la Maestría en Odontología
División de Estudios de Posgrado e Investigación de
la Universidad Nacional Autónoma de México
Generación 96-97.

IDIOMAS: Inglés
Frances

PRACTICA PROFESIONAL

Consultorio Privado: Hacienda de Mimiahuapan 16
Ote. La Floresta Coyoacan, Tlalpan 86-93

DOCENCIA:

Instituto Nacional de Cancerología
Instituto Politécnico Nacional.

Anualmente invitada como docente para impartir el
curso de Neoplasias del Aparato Estomatognático.
1995 a la fecha.

Universidad Nacional Autónoma de México
Ayudante de Profesor "B"
Laboratorio de Biología Celular
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología.

INVESTIGACIONES:

LESIONES BUCALES CON INSUFICIENCIA
RENAL CRONICA
Instituto Nacional de la Nutricion "Salvador
Zubiran" 1994.

TUMORES MIXTOS METASTATIZANTES DE
GLANDULAS SALIVALES
Instituto Nacional de Cancerologia 1995.

ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DE LA
NICOTINA EN CELULAS EPITELIALES DE
LARINGE.
Laboratorio de Biología Celular
División de Estudios de Posgrado e Investigación.
UNAM. 1996 - 1998.

PUBLICACIONES:

CAPITULO N. 5

TITULADO:

TUMORES EPITELIALES DE CABEZA Y CUELLO

LIBRO PATOLOGIA ONCOLOGICA

EDITORIAL Mc Graw- Hill

INTERAMERICAN PRIMERA EDICION 1997

CAPITULO N. 6

TITULADO:

TUMORES DE GLANDULAS SALIVALES

LIBRO PATOLOGIA ONCOLOGICA

EDITORIAL Mc Graw- Hill

INTERAMERICANA PRIMERA EDICION 1997

TUMORES MIXTOS DE GLANDULAS SALIVALES

PARAMETROS HISTOPATOLOGICOS

DIFERENCIALES ENTRE LOS ADENOMAS

PLEOMORFOS Y TUMORES MIXTOS MALIGNOS.

Publicado como trabajo de investigación en la
Revista Cancerología del Instituto Nacional de
Cancerología

Vol. 43, No.- 3

Julio-Septiembre, 1997.

**ESTUDIO "IN VITRO" SOBRE EL EFECTO DE LA
NICOTINA EN CÉLULAS EPITELIALES DE
LARINGE HUMANA.**

Publicado como trabajo de investigación en la
Reunión Anual de Estudiantes de Investigación
Biomédica y de la Salud 1998.

Revista de la Facultad de Medicina, UNAM.

Vol. 41, No. 2

Suplemento 1

Marzo-Abril 1998 ISSN 0026-1742

Publicacion en proceso:

CAPITULO

FACTORES DE RIESGO DE CANCER DE

LARINGE

EN EL LIBRO TITULADO " LARINGE"

Instituto Nacional de Cancerología

Editorial Española.

Publicación en proceso:

CAPITULO

ADENOMAS DE GLANDULAS SALIVALES

EN EL LIBRO TITULADO GLANDULAS
SALIVALES

Instituto Nacional de cancerologia

Editorial Mc-Graw Hill Interamerica.

CONFERENCIAS:

PONENTE EN LA REUNIÓN ANUAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y DE LA SALUD
1998.

TEMA: ESTUDIO " IN VITRO" SOBRE EL EFECTO
DE LA NICOTINA EN CÉLULAS EPITELIALES DE
LARINGE HUMANA.

PONENTE EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGÍA.

TEMA: TUMORES NO ODONTOGÉNICOS
SEPTIEMBRE DE 1997.

PONENTE EL INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGÍA.

TEMA: NEOPLASIAS MALIGNAS DE CAVIDAD
ORAL.

AGOSTO DE 1997.