

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

3

EFFECTO DEL $TGF\beta$ EN LA PROLIFERACION DE
CELULAS DE CANCER CERVICO-UTERINO Y SU
IMPLICACION CON LAS PROTEINAS DEL CICLO
CELULAR p27, cdk4, Rb y p53.

289649

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS
BIOLOGIA CELULAR**

P R E S E N T A :

BIOL. MARIA ANTONIETA CHAVEZ GONZALEZ

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

MEXICO, D.F.

2001



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios de Posgrado
OFICIO FCIE/DEP/1388/00

ASUNTO: Asignación de jurado

M EN C LUIS SANCHEZ SANCHEZ
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) alumno(a) **BIOL. MARÍA ANTONIETA CHAVEZ GONZALEZ**, quien desarrolló el trabajo de Tesis titulado: "Efecto del TGF β en la proliferación de células de Cáncer Cérico-Uterino, y su implicación con las proteínas del ciclo celular p27, cdk4, Rb y p53 "

Así mismo, les comunico a los siguientes miembros que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas los ha designado como sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (Biología Celular).

CARGO	GRADO.	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	M EN C.	LUIS SANCHEZ SANCHEZ
PRIMER VOCAL	DR.	BENNY WEISS STEIDER
SEGUNDO VOCAL	DRA.	MARÍA DE LOURDES GUTIERREZ XICONTECATL
TERCER VOCAL	DR.	ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
SECRETARIO	DRA.	VILMA MALDONADO LAGUNAS
SUPLENTE	DRA.	REBECA LOPEZ MARURE
SUPLENTE	DR. de 3er. CYCLE.	ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., 08 de Septiembre de 2000
JEFE DE LA DIVISION

DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA



DIV. EST. POSGRADO

MCO/ASR/mmm

Este trabajo se realizo en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del
Cáncer de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer,
FES-Zaragoza. UNAM, bajo la dirección del M en C. Luis Sánchez Sánchez.

Durante la realización de éste trabajo se contó con el apoyo de la Beca de
CONACYT IN124758.

A Dios ...

AGRADECIMIENTOS

Al M en C. Luis Sánchez Sánchez por todos los conocimientos compartidos, por su amistad, y por la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación científica.

Al Dr. Benny Weiss Steider, y la Dra. Lourdes Gutiérrez Xicotencatl, por su valiosa asesoría y sus comentarios en la revisión a éste manuscrito.

A los Doctores: Edgar Zenteno Galindo y Vilma Maldonado Lagunas por sus valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo.

Al Doctor Alejandro Zentella Dehesa, por su apoyo durante el desarrollo del proyecto, por los conocimientos compartidos, y por su invaluable espíritu de cooperación.

Agradezco especialmente a la Dra. Rebeca López Marure, quien además de ser una excelente investigadora, es una amiga siempre dispuesta a colaborar y compartir sus conocimientos con la sencillez y generosidad que la caracterizan.

Gracias a todos los miembros de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, especialmente Fernando Flores, Jorge Hernández y Rodrigo Zambrano, que han hecho que mi estancia en el laboratorio este llena de momentos gratos.

DEDICATORIAS.

A mi Papa[†], quien me enseñó a encontrarle el lado bueno a la escuela y que aunque no pudo llegar a ver realizada esta meta, se que hoy la comparte conmigo, y espera la realización de todas las que siguen.

A mi Abuelita[†], que siempre me impulso y consintió mis berrinches... desde donde estas se que estas conmigo.

A mi Mamá, el más grande ejemplo de amor, confianza y fortaleza, aún en los momentos más difíciles, y quien ha hecho que mi familia siga siendo lo maravillosa que siempre ha sido. Mami, este trabajo es tuyo.

A mis hermanos: Tere, Chio y Gus, por todos los momentos felices y no tan felices que hemos compartido, por su confianza y su incondicional apoyo.

A la gran Familia González principalmente a mi abuelito y mis tíos Lalo y Pepe, que han convertido en un gran apoyo, y en los mas jóvenes y divertidos ángeles de la guarda.

A Antonio Alvarado, quien a base de amor, respeto y mucha paciencia se ha convertido en una persona muy importante en mi vida.

A mis grandes amigos, que han compartido cada momento de mi vida y a quienes les debo muchos de mis momentos de felicidad.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Factor de Crecimiento Transformante beta	4
Señalización Intracelular	6
TGF β y la proteína supresora de tumor Rb	9
TGF β y su relación con ciclinas, cdk, y CDKI	11
TGF β y p53	16
TGF β y proliferación	17
TGF β y tumorigénesis	18
Cáncer Cérvico-Uterino	22
Objetivos	24
Hipótesis	25
Método	26
Obtención de Células Fibroblásticas y Epiteliales de cérvix	26
Obtención de Células Tumorales Calo, InBI, Hela y la línea celular Mv1Lu	27
Ensayos Biológicos	27
Determinación del Inicio de la Fase de Síntesis de ADN	29
Evaluación de la Incorporación de Timidina Tritiada	29

ELISA	30
Determinación de la Expresión de p27, cdk4, Rb y p53.	31
Western Blot	31
Análisis de la Expresión de ARNm	32
Estadística	33
Resultados	34
Efecto del TGF β en la proliferación de células de CaCu	34
Producción de TGF β por las líneas tumorales de CaCu	38
Determinación del inicio de la fase de Síntesis de ADN.	42
Expresión de algunas proteínas involucradas en la vía de señalización de TGF β	43
Discusión de resultados	49
Conclusiones	57
Literatura Citada	58
Apéndice	70
Abreviaturas	77

RESUMEN

El Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF β), es una molécula ampliamente caracterizada, cuya actividad biológica principal es inhibir la progresión del ciclo celular en la fase G₁ de la mayoría de las células de mamífero, especialmente en células de origen epitelial, endotelial y linfohematopoyéticas. El efecto inhibitor es llevado a cabo a través de la participación de moléculas inhibitoras de cinasas dependientes de ciclinas como p27, quién evita la formación de complejos ciclina-cdk (especialmente ciclina D1-cdk4), y con ello la progresión del ciclo celular a la fase de síntesis, al mantener a la fosfoproteína nuclear Rb en un estado hipofosforilado, asociado a factores de transcripción como E2F, necesarios para la fase de síntesis. Sin embargo, se conoce que el TGF β es capaz de perder su efecto inhibitor en células que tienen al gen supresor de tumores p53 mutado, lo que sugiere que esta molécula también está implicada en su señalización.

En este trabajo se encontró que las células tumorales de Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu): CaLo, InBI y HeLa, provenientes de tumores de pacientes con cáncer cérvico-uterino, son inducidas a proliferar por el TGF β , sugiriendo que la vía de señalización de esta molécula como inhibidor de la proliferación se encuentra alterada.

En este sentido, se evaluó el estado de fosforilación de la proteína Rb en estos tres tipos celulares y se encontró que contrario a lo que sucede en el caso de la inhibición de la proliferación, la proteína Rb permanece en un estado hiperfosforilado. Aunado a estos datos, hemos encontrado disminución en la expresión de la proteína p27, incremento en la expresión de las proteínas cdk4 y p53, cuando las células CaLo, InBI y HeLa son tratadas con 10ng/ml de TGF β . Estos eventos, podrían sugerir un posible mecanismo por el cual las células tumorales pierden la capacidad de ser reguladas negativamente en su proliferación por este factor.

Además en este trabajo se presentan evidencias de que el efecto mitogénico provocado por el TGF β en las líneas tumorales CaLo, InBI y HeLa, podría estar relacionado con la presencia del Virus del Papiloma Humano (HPV), ya que líneas celulares libres de infección por HPV no son estimuladas a proliferar por éste factor.

INTRODUCCION.

La proliferación, diferenciación y funciones celulares están reguladas por un complejo grupo de moléculas que son esenciales para la comunicación de los sistemas biológicos. Estas moléculas, conocidas como moduladores biológicos, ejercen muy variadas respuestas dependiendo de su concentración, de las condiciones microambientales en que se encuentran inmersas y del tejido o linaje celular blanco (Nathan, 1991).

La mayoría de estos moduladores, son pequeñas moléculas de naturaleza protéica o glicoprotéica que median efectos biológicos en muchos tipos celulares. El interés inicial en los moduladores biológicos se debió a su participación en procesos inflamatorios, desarrollo y la respuesta inmune. Sin embargo, actualmente se sabe que estas moléculas participan en un sin número de procesos fisiológicos, dentro de los que se incluyen los mecanismos que regulan la división celular, la diferenciación celular, la senescencia, la apoptosis, etc. (Sporn, 1988).

El proceso de división celular está regulado fundamentalmente por dos tipos de moduladores biológicos, los que inducen a las células a proliferar, y los que inhiben la proliferación. Dentro del primer grupo encontramos moléculas como los factores estimulantes de colonias (CSF), el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), etc.; mientras que en el grupo de inhibidores encontramos al Factor de Necrosis Tumoral alfa ($TNF\alpha$), la Interleucina 1 beta ($IL-1\beta$), y el Factor de Crecimiento Transformante beta ($TGF\beta$), entre otros.

De las moléculas antes mencionadas, el $TGF\beta$ ha generado gran interés debido a su fuerte capacidad inhibidora de la proliferación, además de que se encuentra implicado en la regulación de diversos procesos celulares normales e incluso tumorales (Fearon, 1990).

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β

El Factor de Crecimiento Transformante beta ($\text{TGF}\beta$ del inglés Transforming Growth Factor) forma parte de una amplia familia de moduladores celulares, en los que se incluyen activinas, inhibinas, proteínas morfogénicas de hueso y la subfamilia del $\text{TGF}\beta$; además de que incluye algunos miembros menos relacionados como sustancias inhibidoras Mullerianas y Factores Neurotróficos derivados de la Glia (Massagué, 1990).

Particularmente la subfamilia del $\text{TGF}\beta$ está compuesta por tres isoformas encontradas en mamíferos, ($\text{TGF}\beta$ 1-3, codificados en diferentes cromosomas humanos: 19q-13.1, 1q41, y 14q23, respectivamente), una cuarta isoforma ($\text{TGF}\beta$ 4) aislada de rana, y una quinta ($\text{TGF}\beta$ 5) aislada de pollo (Massagué, 1998). Estructuralmente el $\text{TGF}\beta$ es un polipéptido dímérico constituido de 112 aminoácidos. El dímero de $\text{TGF}\beta$ tiene un peso molecular de 25 kDa y es inicialmente sintetizado como una molécula de 390 aminoácidos conocida como pro- $\text{TGF}\beta$ (Lyons, 1990).

Esta molécula precursora, se encuentra unida a un péptido asociado a latencia (LAP), el cual permanece unido al $\text{TGF}\beta$ aún después de su secreción, y evita que esta molécula tenga alguna actividad biológica. Un tercer componente del complejo de $\text{TGF}\beta$ latente, es una glicoproteína de secreción, conocida como proteína de unión a $\text{TGF}\beta$ (LTBP), la cual se une a LAP, y aunque no está implicada en la latencia, interviene en los procesos de secreción, almacén en la matriz extracelular y en la activación del complejo (Miyazono, 1993).

Aunque el mecanismo de activación fisiológica de $\text{TGF}\beta$ no está bien determinado, se ha sugerido que éste implica la proteólisis de LAP, así como cambios en el pH y temperatura (Massagué, 1998).

El $\text{TGF}\beta$ es producido por casi todas las células maduras, pero su expresión se incrementa en procesos de reparación de tejidos, remodelación de huesos e

inflamación. El TGF β es también almacenado en altas concentraciones en plaquetas, y puede ser liberado rápidamente en sitios de daño celular. Las fuentes celulares del TGF β son linfocitos T_H2 y T_H3, osteoblastos, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, plaquetas, células de Sertoli, y macrófagos. Además se encuentra en pulmón, en riñón, placenta, cordón umbilical, y particularmente en altas concentraciones en hueso y bazo (Meager, 1991; Bharat, 1992; Mire, 1998).

De manera general, el TGF β regula mecanismos de apoptosis, adhesión, crecimiento y diferenciación celular (Heldin, 1997). Además, el TGF β se ha mostrado como un fuerte supresor inmune, ya que es capaz de inhibir la activación y proliferación de células T, B y NK (Susan, 1998). Así mismo está caracterizado dentro de las principales citocinas fibrogénicas ya que es capaz de inducir y estimular la producción de tejido conectivo (Sporn, 1988). El TGF β estimula a células fibroblásticas y macrófagos a producir moléculas de matriz extracelular, principalmente colágena, elastina y fibronectina, al tiempo que es capaz de disminuir la expresión de colagenasas e inhibidores de la producción de matriz extracelular (Kovacs, 1994).

El TGF β es un potente inhibidor fisiológico de la proliferación celular. La mayoría de las células de mamífero son inhibidas por el TGF β , pero este efecto inhibitorio es más pronunciado en células epiteliales, endoteliales, linfohematopoyéticas y algunas células de origen neuroectodermal. En todos estos casos la inhibición de la proliferación es ejercida en la fase G₁ del ciclo celular (Polyak, 1996).

El TGF β regula sus efectos biológicos mediante la interacción con receptores de superficie celular, a través de los cuales se desencadenan un conjunto de señales intracelulares en las que participan diversas moléculas, hasta obtener el efecto biológico final producido por esta molécula.

Señalización Intracelular.

La respuesta celular al TGF β es iniciada por la unión del ligando dimérico a receptores membranales, que poseen actividad de cinasa en residuos de serina y treonina. Estos receptores se agrupan en dos subfamilias asociadas a membrana: el receptor de tipo I (T β RI) y el receptor tipo II (T β RII), los cuales son estructuralmente muy similares (Fig. 1), y un tercer tipo conocido como receptor β -glicano, presente en la membrana celular y que también se encuentra de manera soluble. Los receptores tipo I y II, son los encargados de realizar el inicio de la señalización intracelular del TGF β , mientras que el receptor tipo III conocido como β -glicano, es un proteoglicano transmembranal con un dominio citoplásmico corto sin aparente actividad de señalización, pero que parece regular el acceso del TGF β a los receptores I y II (López, 1993)

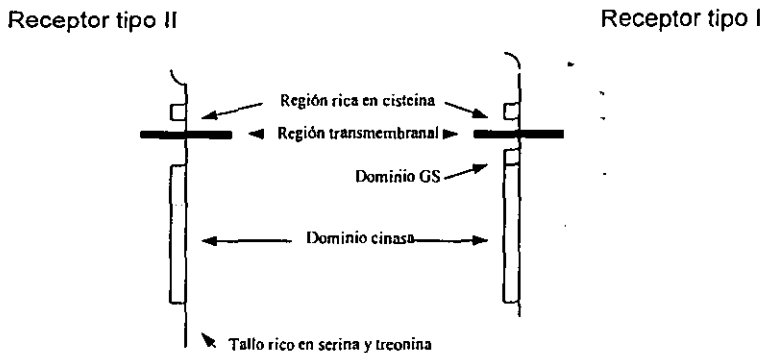


Figura 1. Estructura de los receptores tipo I y II para el TGF β

Los receptores tipo I y tipo II poseen pequeñas regiones extracelulares ricas en residuos de cisteína y regiones intracelulares con dominios cinasas. El receptor tipo I tiene una región rica en residuos de glicina y de serina (GS)

importante para la transmisión de la señal al interior celular. El TGF β se une inicialmente con el T β RII y posteriormente el T β RI es reclutado a formar parte del complejo. En este momento el T β RII fosforila al T β RI en la región GS activándolo para su posterior señalización al núcleo (Frengh, 1996). El complejo de señalización del receptor consiste en un heterotetrámero formado por dos moléculas de T β RI y dos de T β RII (Fig. 2).

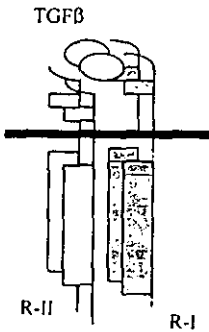


Fig. 2. Complejo de señalización del receptor, unido a TGF β

Una vez que el TGF β se une al tetrámero de receptores, la señal de TGF β es transmitida al núcleo a través de la familia de proteínas SMAD, que fueron descubiertas en 1996, y deben su nombre a la estrecha homología que guardan con los genes Mad y con los genes Sma, presentes en *Drosophila* y *C. Elegans*, respectivamente (Savage, 1996).

La familia de proteínas SMAD, puede ser dividida en tres subgrupos. El primer subgrupo comprende aquellas SMAD que son sustrato directo de la familia del receptor de TGF β . El segundo grupo incluye las SMAD que no son sustratos del receptor pero participan en la señalización por asociación con las SMAD activadas por el receptor. El tercer grupo consiste en proteínas que inhiben la activación de las SMAD y que pueden denominarse como anti-SMAD (Lagna, 1996).

Cada una de las SMAD es activada por miembros específicos de la familia del TGF β y en respuesta a ello transmiten la señal recibida al núcleo, para participar en la activación transcripcional de los genes inducidos por los respectivos agonistas. Esta información ha conducido a un modelo en el que la Smad 2 y la Smad 3 que son activadas inicialmente por el receptor tipo I del TGF β se asocian con Smad 4, misma que se acumula y transloca al núcleo, en donde finalmente activa la transcripción dependiente de TGF β (Fig. 3). Este modelo indica entonces que las proteínas SMAD transmiten directamente la señal del TGF β (o miembros de su familia) desde el receptor de superficie celular hasta el núcleo (Kretzschmar, 1998).

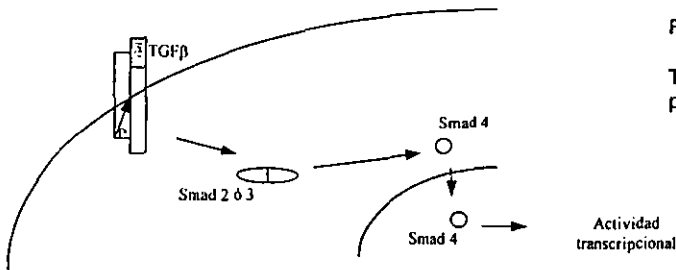


Figura 3.
Señalización de
TGF β a través de las
proteínas SMAD

Una vez que la señal del TGF β ha sido enviada al núcleo, se ha detectado la activación transcripcional de varios genes, que incluyen a los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p15^{Ink4b}, p21^{Cip1} y p27^{Kip1}, cuya expresión media el arresto en el ciclo celular (Reynisdóttir, 1997). Así mismo estimula la transcripción de genes que codifican a proteínas de matriz extracelular como las colágenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y la elastina (Marigo, 1994). El TGF β también es capaz de inhibir la transcripción de c-myc y el cdc25, los cuales se encuentran involucrados con efectos antiproliferativos (Iavarone, 1997).

TGF β y la proteína del Retinoblastoma (Rb).

La proteína supresora de tumor (Rb) es codificada por el gen del mismo nombre, que da como producto una fosfoproteína nuclear con peso molecular de 105 kDa. Esta proteína forma parte de una familia que incluye a las proteínas pRb, p107 y p130, que participan en la regulación de la transición de las fases G₁ a S del ciclo celular (Lipinski, 1999). La proteína Rb es regulada por fosforilación: su forma menos fosforilada o activa (hipofosforilada), inhibe la progresión del ciclo celular a través de la unión e inactivación de factores de transcripción como el E2F y cinasas como c-abl cuya actividad es requerida para la fase de síntesis de ADN (S). El estado activo de la proteína Rb se encuentra durante las fases G₀ y G₁ del ciclo celular (La Thangé, 1994).

Cuando esta proteína se hiperfosforila aproximadamente en el último tercio de la fase G₁, pierde afinidad por los factores de transcripción a los que se encuentra unidos, mismos que son liberados para favorecer el paso de la célula a la fase S (Nevins, 1998). La forma hiperfosforilada de Rb se presenta en las fases S y G₂ del ciclo celular, para finalmente volver a su estado hipofosforilado durante la mitosis (Figura 4) (Marhin, 1996).

En cuanto a la relación del TGF β con la proteína Rb, se ha encontrado que células epiteliales, endoteliales y neuronales tratadas con el TGF β son inhibidas en su proliferación, debido a que mantienen un estado hipofosforilado de Rb, lo que implica que los factores de transcripción no son liberados, evitando con ello la transición a la fase S del ciclo celular. Este evento ha hecho que la Rb se considere como una proteína supresora de tumores, la cual tiene su punto de control en la fase G₁ del ciclo celular (Laiho, 1990., Polyak, 1996).

La manera en la que el TGF β modifica el estado de fosforilación de la proteína Rb, requiere de la participación de familias de proteínas que regulan la transición del ciclo celular en la fase G₁, entre ellas se incluyen a las ciclinas, a las

cinas dependientes de ciclinas, y a los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas.

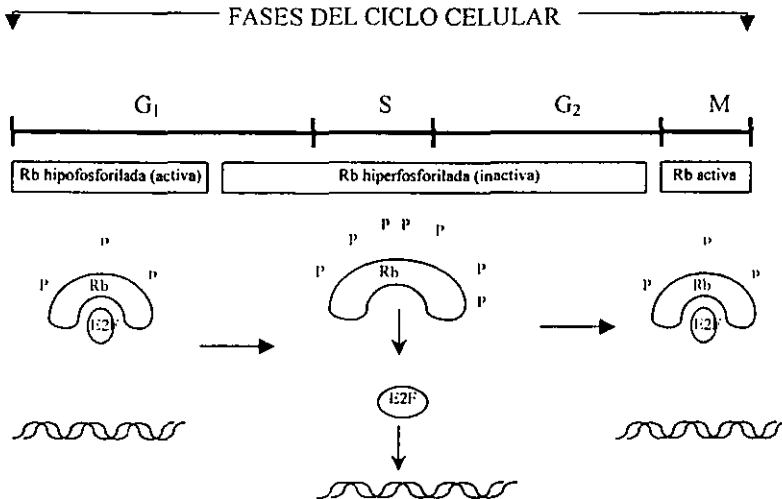


Figura 4: Estados de fosforilación de la proteína Rb en las diferentes fases del ciclo celular.

El TGF β y su relación con las Ciclinas, las Cinasas Dependientes de Ciclinas (Cdk) y los Inhibidores de Cinasas Dependientes de Ciclinas (CKI).

Las ciclinas son un grupo de proteínas que constituyen la subunidad reguladora en complejos con proteínas cinasas dependientes de ciclinas (cdk). Las ciclinas se unen a las cdk usando una secuencia conservada de 87 aminoácidos. En la actualidad se conocen 10 clases de ciclinas designadas de la A a la J, y algunas de ellas como sucede con la ciclina D, tienen diferentes subclases (D1, D2, D3) (Donnellan, 1999).

Las proteínas cdk forman parte de una familia de proteínas serina- treonina cinasas, que constituyen la subunidad catalítica de los complejos ciclina-cdk (Pines, 1994). La subunidad catalítica (cdk) es inactiva hasta el momento en que forma un complejo con la ciclina, y para esta activación la cdk es fosforilada en un residuo de treonina (Figura 5)(Morgan, 1996).

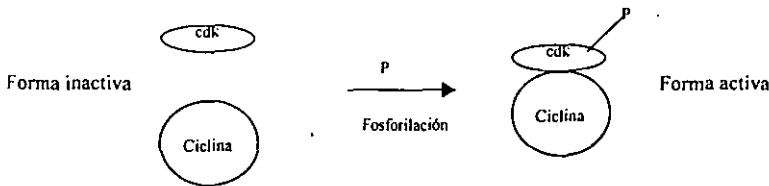


Figura 5: Activación de los complejos ciclina cdk.

Los complejos ciclina-cdk deben su nombre a que controlan puntos específicos de progresión en el ciclo celular, que se involucran con eventos de duplicación del ADN, control de daño al ADN, entrada a la mitosis y morfogénesis (Sia, 1996).

La formación de los complejos cdk-ciclina ocurre en puntos específicos del ciclo celular, y está sujeta a señales extracelulares, y aunque las ciclinas pueden unirse a más de una cdk, existen combinaciones preferenciales que les confiere

una actividad específica (Fig. 6), como sucede con el complejo ciclina D1/cdk4 que ha mostrado la capacidad de unirse y fosforilar el producto del gen del retinoblastoma (Geng, 1993).

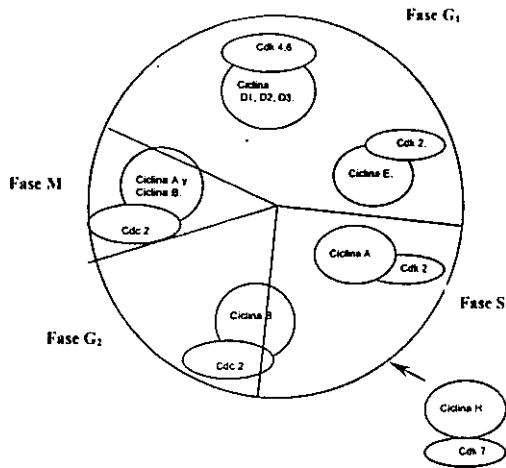


Figura 6. Combinaciones preferenciales de los diferentes complejos ciclina-cdk a lo largo del ciclo celular (Hunter, 1994).

Así como los complejos ciclina/cdk son capaces de controlar el ciclo celular, existe un grupo de moléculas de reciente descubrimiento que tienen la capacidad de regular negativamente la actividad de los complejos ciclina-cdk. Estas moléculas se conocen como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI), y tienen la función de evitar la formación de los complejos ciclina/cdk (Peter, 1994).

Los CDKI se han dividido en dos familias, con base en su funcionalidad y propiedades estructurales: la familia INK y la familia Kip/Cip (Luo, 1995).

La primera incluye las proteínas p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, las cuales poseen dominios de anquirina repetidos y no presentan similitud estructural con otros inhibidores conocidos. La proteína p16 fue inicialmente

detectada por su capacidad de unirse con el cdk4, mientras que las proteínas p19 y p18 mostraron habilidad para interactuar con cdk4 y cdk6. (Xiong, 1993 B). Funcionalmente, las proteínas de esta familia no requieren de la presencia de la proteína Rb para ejercer su efecto inhibitorio, como sucede en el caso de la familia Kip/Cip, que han mostrado tener estrecha relación con Rb (Poliak, 1996).

A la familia Kip/Cip pertenecen las proteínas p27^{Kip1}, p21^{Cip1/WAF1} y p57^{Kip2} que se asocian principalmente con los complejos ciclina-cdk involucrados en la progresión de las fases G₁/S del ciclo celular (Xiong, 1993 A., Floreness, 1998).

La proteína p21^{Cip1/WAF1} se transcribe por medio de la proteína p53 en respuesta a daño al material genético, y una vez activo es capaz de bloquear la progresión del ciclo celular en la fase G₁. Además p21 también ha mostrado activarse en diferenciación celular, probablemente como un prerrequisito que controle la salida del ciclo celular. Así mismo es inducido en la apoptosis y en la senescencia de manera independiente a p53 sugiriendo que esta molécula puede intervenir en diferentes procesos celulares. (Di Leonardo, 1994).

Otra alternativa por la que la proteína p21 bloquea la proliferación celular, es mediante la unión al Antígeno Nuclear de Células en Proliferación (PCNA), evitando con ello la actividad transcripcional de este último. Así mismo, es capaz de inducir la expresión del gen GADD45 que también se une a PCNA y bloquea la proliferación celular (Levine, 1997).

La proteína p27 por su parte, fue originalmente identificada como un CDKI que detiene la progresión del ciclo celular, en respuesta a inhibición por contacto o por la inducción con TGFβ (Koff, 1993). Además la proteína p27 se incrementa durante la diferenciación, y ha mostrado ser un importante regulador de la progresión de las fases G₁/S del ciclo celular al unirse a los complejos ciclina D-cdk4 y prevenir con ello su activación (Coats, 1996).

Finalmente, el CDKI p57, ha sido implicado en procesos de diferenciación celular y en la respuesta a estrés, manteniendo a las células detenidas en su proliferación (Lee, 1995). Esta proteína se ha detectado mutada en cáncer de

mama, pulmón, ovario y testículo, por lo que ha llegado a considerarse un gen supresor de tumores (Polyak, 1996).

Los diferentes complejos ciclina-cdk, se activan e inactivan en diferentes fases del ciclo celular, y existen señales extracelulares que regulan sus actividades, de esta forma se sabe que los mitógenos incrementan la actividad de los complejos ciclina-cdk, mientras que los anti-mitógenos inhiben la actividad de los mismos. El balance entre esta actividad positiva y negativa determina entonces que tanto la célula prolifera o permanece en estado de quiescencia, decisión que se toma en la fase G₁ del ciclo celular (Sherr, 1994).

En el caso particular del TGFβ sobre la actividad de los complejos ciclina-cdk, se ha observado, que éste conduce a una disminución en la actividad de las ciclinas y los cdk, particularmente para el caso de los complejos ciclina D/cdk4 y ciclina E/cdk2 (Hatakeyama, 1994). Esta falta de actividad, se asocia con la disminución en los niveles de ARN mensajero y proteínas de diferentes ciclinas y cdk, aunque se sugiere que el TGFβ también puede prevenir la formación de los diferentes complejos ciclina-cdk (Polyak, 1994).

En células epiteliales, el TGFβ inhibe la expresión de cdk4 y previene la activación del complejo ciclina D-cdk4 (Ewen, 1993). También es capaz de bloquear la formación y activación del complejo ciclina E-cdk2 sin afectar la expresión de ambas moléculas (Koff, 1993). Aunado a estos datos se ha detectado que cuando se inhibe la proliferación de células epiteliales de pulmón Mv1Lu, por medio de TGFβ, se provoca un bloqueo en la síntesis de cdk4, y una falta de formación del complejo ciclina D-cdk4, lo que conduce a la quiescencia de dichas células (Polyak, 1996). Por otra parte, en células Mv1Lu y en células epiteliales mamarias humanas, se ha detectado que el tratamiento con el TGFβ conduce a un incremento en los niveles de la proteína p27, el cual disminuye completamente la actividad cinasa de los complejos ciclina-cdk, conduciendo con ello a un paro en la progresión del ciclo celular en la fase G₁ (Reinisdottir, 1995). Por otro lado, el TGFβ induce la expresión de la proteína y el ARN para p27 en

células B, en donde el TGF β no tiene efecto en la expresión de la cdk4 o la proteína p21 (Kamesaki, 1998).

En queratinocitos humanos el TGF β incrementa la expresión de p21, que se une e inhibe la actividad cinasa de cdk2 (Xion, 1993 A). Así mismo, en algunos tipos celulares epiteliales ováricos el TGF β induce la expresión de p21, aunque son poco sensibles a su efecto inhibitor (Hurteau, 1999). Aunado a esta información, Datto (1995) demostró que el TGF β puede causar una rápida inducción transcripcional de p21, sugiriendo que este inhibidor es capaz de responder tanto a señales intra como extracelulares para detener la proliferación en la fase G₁ del ciclo, aún de forma no dependiente de p53. Por lo que se considera que el TGF β es un potente regulador de la progresión del ciclo celular no sólo en células normales, sino también en células con procesos transformantes.

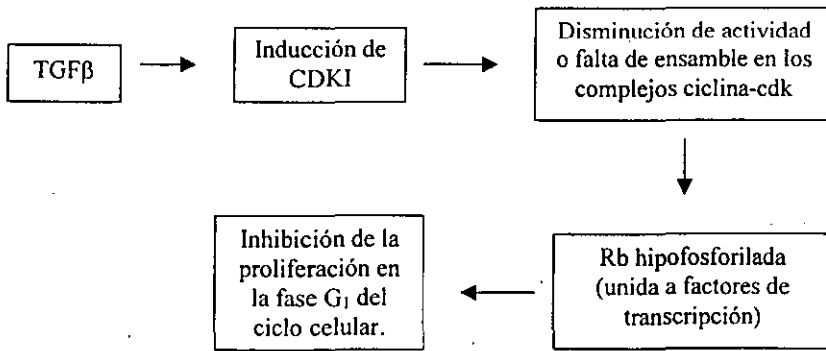


Figura 7. Mecanismo por el cual el TGF β inhibe la proliferación celular:

El TGF β y p53

El gen supresor de tumor p53 es una fosfoproteína nuclear de 375 aminoácidos involucrada en procesos de proliferación celular, apoptosis, senescencia, reparación de ADN, diferenciación celular y angiogénesis. (Amudson, 1998., Jayaraman, 1999). p53 se encuentra usualmente en bajas concentraciones y su vida media es corta, debido a que existen proteasas que la degradan por vías dependientes de ubiquitinación (Levine, 1992).

La proteína p53 es activada por diversos estímulos, entre los que se encuentran daño al ADN, hipoxia, cambios en el potencial de la membrana, adhesión celular y la expresión de algunos oncogenes (Amudson, 1998). En respuesta a estos estímulos p53 sufre modificaciones postranscripcionales, que la convierten de una proteína latente, a su forma activa (Meek, 1998), y una vez activada p53 participa en las actividades celulares antes descritas.

En el caso de la proliferación celular p53 juega un papel importante en la vigilancia y en la regulación de la fase G₁ del ciclo celular, ya que en respuesta a algunas formas de daño al ADN p53 activa el CDK_i p21, mismo que se une a complejos ciclina D-cdk4 y/o ciclina E-cdk2 para bloquear la hiperfosforilación de la proteína Rb y con ello la progresión del ciclo celular (Sionov, 1999).

p53 también puede inhibir la proliferación de una forma independiente a p21, mediante la unión a la ciclina H, inhibiendo así la actividad cinasa del complejo ciclina H-cdk7, el cual activa a la ciclina A-cdk2, necesarios para la transición a la fase S del ciclo celular (Schneider, 1998).

p53 se encuentra comúnmente mutada en células de carcinoma de colon, mama, así como en tumores de cabeza y cuello, leucemia mieloide crónica y cáncer de piel. Interesantemente estas formas transformantes de p53 codifican a proteínas con tiempos de vida media prolongados, capaces de inactivar a la proteína silvestre por la formación de complejos heterotetraméricos (Milner, 1991). Sin embargo, en muchos casos de cáncer humano, p53 sólo se encuentra mutada en un alelo, pero se ha sugerido que el alelo mutante posee actividad dominante

negativa, que puede conducir a la inactivación de la proteína en estado silvestre (Wolf, 1984)

En cuanto a la relación de p53 con el efecto inhibidor de TGF β existen reportes en donde se menciona que células mutadas de p53, presentan un bajo efecto inhibidor de la proliferación causado por TGF β (Reiss, 1997; Gerwin, 1992), además de que se ha demostrado que en células epiteliales de pulmón, la inhibición en la expresión de cdk4 provocada por el TGF β es dependiente de la presencia de p53 en forma normal (Ewen, 1995). Aunado a ello, Landesman (1997), reportó que el TGF β estimula la activación de p53 en cultivos primarios, lo cual se observa mediante un incremento en la fosforilación de p53, en la localización intracelular de la misma, y en una alta inducción de ARNm de p21.

Aún cuando la célula cuenta con un amplio grupo de moléculas encargadas de vigilar y proteger los procesos celulares, existen mecanismos que dañan alguno o varios de los componentes implicados en dichos procesos, como sucede en el caso de las células tumorales, quienes responden de manera anormal a los mecanismos celulares. Dichos mecanismos incluyen desde la respuesta a factores externos, hasta la expresión alterada de diferentes genes; tal y como sucede en el caso del TGF β y distintos tipos celulares de origen tumoral.

El TGF β y proliferación

A pesar de que el TGF β es un inhibidor de la proliferación por excelencia, se ha determinado que es capaz de estimular la proliferación de fibroblastos de pulmón humano (Clark, 1997), y de ratón a concentraciones de 10 ng/ml (Mc Gowan, 1992), así como fibroblastos de ojo humano a concentraciones de 1ng/ml (Cunliffe, 1996). Sin embargo, la manera en la que el TGF β realiza esta actividad estimuladora de la proliferación no esta determinada.

En este sentido, diversos grupos de investigación estudian que tanto la actividad del TGF β puede asociarse con la activación de miembros de la familia de Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK), y se ha encontrado que la

proteína cinasa activada por TGF β (TAK1) es rápidamente incrementada en respuesta a TGF β y otros miembros de su familia (Massagué, 1998). Por lo que no se descarta que exista una regulación de SMAD a través de las MAPK (Kretzschmar, 1998).

El TGF β y tumorigénesis

En cuanto a la relación de TGF β con el desarrollo tumoral, se ha documentado que un buen número de células tumorales muestran resistencia al efecto inhibitor del TGF β (Serra, 1996), además de que se conoce que la resistencia a la inhibición está en relación con el estado invasivo del tumor, modelo que se ha documentado en carcinoma colorrectal, melanoma y glioma, (Filmus, 1992).

En tumores como carcinoma pancreático, la falta de inhibición a la proliferación por el TGF β se debe a mutaciones, o a una expresión disminuida del receptor tipo I (Baldwin, 1996., Lu, 1997). . Aunado a este dato, se ha documentado que en cáncer colorrectal y melanoma se presenta una mutación en el receptor tipo II, que disminuye la transducción de la señal para la inhibición de la proliferación por TGF β (Lu, 1999).

Otro evento relacionado con el TGF β en la tumorigénesis es el que varias líneas celulares de cáncer de mama producen cantidades elevadas de TGF β el cual también ha mostrado disminuir la actividad citotóxica de los linfocitos T en el mismo tumor (Reiss, 1997). Aunado a ello, cultivos de adenocarcinomas pancreáticos incrementan de 8 a 10 veces su producción de TGF β en comparación con células de páncreas normal (Lu, 1997). En carcinoma colorrectal y osteosarcoma, también se han encontrado elevados niveles de la proteína y el ARNm para el TGF β , el cual pierde su capacidad de inhibir la proliferación (Matsushita, 1999., Kloen, 1997). Del mismo modo, Cui (1996), demostró que el

TGF β inhibe la formación de tumores benignos de piel, pero incrementa la progresión del tumor en carcinomas invasivos .

Además de la resistencia a la inhibición por TGF β antes descrita, se ha encontrado que en diferentes procesos carcinogénicos existe desregulación de las vías de señalización intracelular utilizadas por el TGF β (Massagué, 1998). Por ejemplo, se ha encontrado que existen mutaciones que inactivan a las proteínas Smad en cánceres humanos, particularmente la Smad 4 se encuentra alterada en carcinoma colorectal, en cánceres de mama, ovario, cabeza y cuello, esófago, colon, y cáncer de pulmón (Korchynskyi, 1999) y mutada en el 50% de los carcinomas pancreáticos (Datto, 1999). Por otra parte, se ha detectado que en cáncer pancreático la Smad 6 se encuentra en altos niveles, lo que produce un bloqueo de la inhibición de la proliferación causada por TGF β , así como un incremento en la adherencia tumoral (Kleeff, 1999). En cuanto a la Smad 2, se ha reportado que se encuentra mutada en cáncer de colon y cabeza y cuello (Eppert, 1996), mientras que la Smad 3 no ha sido reportada como alterada en ningún tipo de cáncer humano (Riggins, 1997).

Otro grupo de moléculas implicadas en el desarrollo de tumores son los complejos ciclina-cdk, particularmente las ciclinas D y E, que se sobre-expresan en células de carcinomas escamosos de cabeza y cuello, en cáncer de esófago y en líneas celulares de cáncer de mama (Keyomarsi, 1995., Bartkova, 1995), esta sobre-expresión conduce a una más rápida progresión en la fase G₁ del ciclo celular y su consiguiente entrada a la fase de síntesis. Aunado a estos datos se ha encontrado que la ciclina D₁ tiene la capacidad de contribuir con el oncogen ras en la transformación celular (Hinds, 1994).

En cuanto a los CDKI, se ha demostrado que su falta de expresión está estrechamente relacionada con el desarrollo y la predisposición a cáncer. En el caso particular de p27 se ha detectado alto nivel de expresión en carcinomas primarios de mama y colon (Sgambato, 1998), además de que bajos niveles de expresión de esta proteína ha sido utilizado como un factor pronóstico de poca supervivencia en carcinomas de mama, gástrico y cáncer pulmonar de células

pequeñas (Tan, 1997; Esposito, 1997). p21 por su parte, se encuentra raramente mutado en cánceres humanos (Sgambato, 1998), sin embargo, en melanomas humanos ha sido detectada una baja expresión del ARNm y la proteína, hecho que contribuye a la progresión tumoral (Maelandsmo, 1996). La expresión de p21 se ha utilizado como un factor pronóstico favorable en carcinoma de células escamosas de pulmón (Komiya, 1997).

Con respecto a la proteína supresora de tumor Rb, se han detectado anomalías estructurales que la hacen disfuncional en un importante número de tumores humanos, entre los que se encuentran: cáncer de pulmón, colorectal, próstata, mamario, de cabeza y cuello, osteosarcomas, etc (Toguchida, 1989). En algunos de estos tumores el gene Rb normal se ha introducido por microinyección y el crecimiento celular es interrumpido (Huang, 1988).

Sin embargo, existen moléculas que pueden hacer que la proteína Rb pierda su capacidad reguladora de la proliferación y permanezca en un estado hiperfosforilado. Tal es el caso de las proteínas del adenovirus E1A, el antígeno T de SV40 y la proteína oncogénica E7 del virus del papiloma humano (HPV) quienes se unen a la proteína Rb y la mantienen en un estado hiperfosforilado, inactivando así su función como regulador negativo de la proliferación celular (Münger, 1992).

Particularmente en el caso de la oncoproteína E7 del virus del Papiloma Humano, se sabe que se une a la proteína Rb y otras proteínas relacionadas (p107 y p130) preferencialmente en la fase G₀/G₁ del ciclo celular. Esta interacción conduce a la inactivación de los complejos entre la proteína Rb y el factor de transcripción E2F alterando la actividad transcripcional de éste último. Este es un mecanismo por el cual E7 contribuye a la desregulación del ciclo celular, aunque se ha demostrado no ser suficiente para la transformación (Jones, 1997., Chellapan, 1991). Sin embargo, no se sabe aún que pasa con la proteína Rb en células que presentan la proteína E7 después de ser estimuladas con TGF β .

La proteína p53 por su parte, se encuentra mutada en el 50-55% de todos los cánceres humanos (Hollstein, 1994), y también es blanco de la proteína oncogénica E6, proveniente del HPV quien se une a la proteína p53 y promueve su degradación, eliminando así su actividad como supresor de la proliferación celular. Particularmente en el caso del CaCu, se ha detectado que la asociación de E6 con p53 contribuye a la oncogénesis del carcinoma cervical, encontrando además, que mutaciones en esta proteína ocurren con alta frecuencia en líneas celulares libres de HPV, mientras que en líneas positivas para HPV rara vez se encuentran mutaciones (Park, 1994), por lo que se ha sugerido que para el desarrollo de este tipo de cáncer otros mecanismos independientes a p53 deben estar implicados (Levine, 1997).

No obstante lo anterior, se ha demostrado que en células fibroblásticas y no en epitelios provenientes de CaCu que contienen la oncoproteína E6 del HPV, se induce seis veces la actividad del promotor del TGF β (Dey, 1997), además se ha reportado que los adenocarcinomas cervicales secretan niveles de 207 a 282 pg / ml de TGF β , lo que no sucede con cultivos de carcinomas escamosos, por lo que se ha sugerido que el tipo histológico del cáncer cervical puede también estar relacionado con las diferencias en la secreción del TGF β (Santin, 1997). Con respecto a este último punto se ha documentado que el hecho que las células de CaCu produzcan su propio TGF β conduce a que las células vecinas al tumor secreten metaloproteinasas de matriz extracelular (que se encargan de degradar la matriz extracelular), y garanticen con ello la invasión y metástasis del tumor (Gilles, 1996).

De acuerdo con lo anterior cabe aclarar que aunque las vías de señalización del TGF β son de las mejores estudiadas, existen importantes interrogantes acerca de cómo las células pierden la capacidad de ser inhibidas en su proliferación por el TGF β , y mayor aún, como logran convertir el efecto inhibitor en un efecto mitogénico, por lo que resulta de importancia evaluar si las moléculas Rb, p53, p27, y cdk4 que se encuentran implicadas en la vía de señalización de

inhibición de la proliferación por TGF β , presentan alguna alteración que permita explicar el cambio de actividad biológica de esta molécula.

CANCER CERVICO-UTERINO

El crecimiento celular, está regulado por procesos que responden estrictamente a las necesidades del cuerpo, sin embargo, ocasionalmente el estricto mecanismo que regula la multiplicación celular se rompe y ocasiona un crecimiento nulo o desmedido de las células, aún cuando el organismo no lo requiera (Darnell, 1994)

Una manifestación del crecimiento celular desmedido sucede en el caso del cáncer, en donde las células adquieren diversas propiedades y características que las hacen peligrosas para el huésped ya que son capaces de evadir los mecanismos que regulan la división en las células normales, y continúan dividiéndose mas alla de los límites normales establecidos por el organismo (Lewin, 1994). Las células tumorales pierden la capacidad de inhibición por contacto, y continúan proliferando e incluso encimándose unas sobre de otras. Así mismo, las células de origen tumoral requieren menor concentración de factores reguladores de la proliferación, crecimiento y supervivencia, e incluso son capaces de producir sus propios factores de crecimiento y garantizar con ello su propia proliferación. (Darnell, 1994).

Dentro de los tumores de mayor incidencia se encuentra el CaCu que es la principal causa de muerte por neoplasias en las mujeres mexicanas, y éstos tumores se desarrollan a partir de precursores pre-invasivos que pueden existir por varios años sin generar síntoma que permita detectar su presencia (Franco, 1993).

La etiología del CaCu es desconocida, pero estudios epidemiológicos demuestran que el riesgo de cáncer cervical está asociado con el inicio de la actividad sexual a temprana edad, con el alto número de compañeros sexuales, y

con la multiparidad (Brinton, 1989). Además dentro de los factores de riesgo se incluyen los compuestos del tabaco (que han sido encontrados en la mucosa cervical), el uso de anticonceptivos orales, y depresores del sistema inmune, así como una deficiencia en la dieta en carotenos, y vitaminas C y A (Franco, 1991).

El CaCu también se ha asociado directamente con la infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV: del inglés Human Papilloma Virus), la cual se presenta en el 90% de las pacientes con CaCu.

El HPV forma parte de una amplia familia de virus que induce tumores epiteliales y fibroepiteliales (Ponten, 1995). Hasta el momento, han sido descritos mas de 70 tipos de HPV y cerca de 30 de ellos están asociados con lesiones del tracto anogenital. Estos virus a su vez se ha dividido en de bajo, y alto riesgo. Los primeros se asocian a lesiones genitales benignas, mientras que los virus de alto riesgo se involucran con neoplasias intraepiteliales cervicales, que pueden progresar a cáncer (Münger, 1995).

De los virus de alto riesgo, los que más frecuentemente se han asociado al CaCu son los HPV tipos 16 y 18. Ambos virus, presentan la particularidad de integrar el genoma viral al genoma del huésped, mecanismo que en la mayoría de los casos ocurre en la proximidad de proto-oncogenes celulares (Dürst, 1987).

La integración viral, tiene como consecuencia la integración de los genes virales E6 y E7, que son consistentemente expresados en células de carcinoma cervical y cuya expresión, es requerida para mantener el fenotipo celular transformado (Münger, 1995).

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del TGF β en la proliferación de células de Cáncer Cervical y su relación sobre la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular Rb, cdk4, p27 y p53.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto del TGF β en la proliferación de las líneas tumorales de CaCu CaLo, InBI y HeLa, así como en fibroblastos de cérvix normal humano.
- Evaluar si las células Calo, Hela e InBI son capaces de secretar TGF β al medio de cultivo, y si esta molécula es biológicamente activa.
- Determinar los niveles basales de expresión de las proteínas Rb, p53, cdk4 y p27 tanto en células tumorales como en fibroblastos provenientes del cérvix humano.
- Evaluar los niveles de expresión de las proteínas Rb, p53, cdk4 y p27 en células fibroblásticas y tumorales de CaCu estimuladas con el TGF β .

HIPOTESIS

Se ha demostrado que el TGF β ejerce su efecto inhibitor a través de una vía de señalización constituida primordialmente por moléculas específicas como la proteína Rb, la ciclina D1, la cdk 4, y el CDKI p27. Del mismo modo se ha encontrado que algunas células tumorales pueden perder su sensibilidad a la actividad inhibitora de la proliferación provocada por el TGF β , en donde adquiere características de inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular, supresor inmune e incluso mitógeno (Gilles, 1996; Santin, 1997). No obstante esta información y a pesar de ser una de las moléculas mejor caracterizadas, no se conoce el mecanismo por el cual bajo algunas circunstancias el TGF β induce proliferación celular.

En base a esta información, se espera que si las células tumorales son inducidas a proliferar con este factor, la expresión de alguna de las moléculas implicadas en la vía de señalización del efecto inhibitor del TGF β se encuentre alterada, permitiendo generar información que conduzca a explicar el porqué la misma molécula puede tener un efecto inhibitor o mitogénico en el proceso de proliferación celular, y qué tanto estas alteraciones pudieran estar asociadas con el estado transformante de la célula.

METODO

Obtención de Células Fibroblásticas y Epiteliales de Cérvix.

Las células fibroblásticas y epiteliales de cervix normal humano fueron obtenidas de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a cáncer cérvico uterino (CaCu). La pieza quirúrgica se transportó en medio de cultivo RPMI (Apéndice 1) (Sigma Chemical Co. U.S.A) al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Hyclone, U.S.A) a 4 °C, y se procesó en las siguientes 2 ó 3 hrs. mediante una disgregación enzimática con tripsina al 0.05% (Apéndice 2) en Verseno (Apéndice 3), a 37 °C. Brevemente la disgregación consistió en cortar el tejido en trozos de entre 3 y 5 mm, mismos que se pusieron en contacto con tripsina al 0.05% durante 15 y 30 minutos en agitación constante a 37°C. Una vez concluido este tiempo, el tejido se disgregó y se filtró a través de una malla de nylon y se procedió a centrifugar por 5 min. a 70xg. El botón celular obtenido fue resuspendido en RPMI al 20% de SFB y las células se cultivaron por 24 hrs. Al término de este tiempo el medio fue retirado con el propósito de eliminar a las células muertas, dejando las células adheridas en RPMI al 10% de SFB, para considerar a las células obtenidas de esta disgregación como R₀ (Stanley, 1979).

Las resiembras R₂ y R₃ presentaron una apariencia celular típica de fibroblastos, correlacionada con la prueba de determinación de desmogleina (Apéndice 4), detectando únicamente un 2% de células positivas para dicha proteína, lo que permitió establecer cultivos de fibroblastos con una pureza superior al 98%.

Las células epiteliales fueron obtenidas de manera similar a los fibroblastos y fueron cultivadas en RPMI al 10% de SFB más 0.5 mg/ml de Insulina y 10 µg/ml de Hidrocortisona, con el propósito de estimular el crecimiento del linaje epitelial. Después de 15 días de tratamiento los cultivos presentaron un 98% de positividad a la desmogleina.

Obtención de Células Tumorales CaLo, HeLa e InBI.

Las líneas tumorales provenientes de CaCu, CaLo, InBI, HeLa, C33 y ViBo fueron gentilmente donadas por el Dr. Alberto Monroy (D.F. México) quién estableció las líneas CaLo e InBI en su laboratorio (Rangel, 1993). Inicialmente las células fueron cultivadas en RPMI al 10% de SFB por 48 h y posteriormente fueron resembradas en cajas petri de 5 ml (NUNCLON) para su uso en los ensayos biológicos así como para la extracción de proteínas y RNA.

La línea epitelial de pulmón Mv1Lu que es sensible a TGF β para inhibir su proliferación, fue gentilmente donada por el Dr. Alejandro Zentella (D.F. México). Las células inicialmente criopreservadas, fueron cultivadas en RPMI al 10% de SFB por 24 h, mostrando una viabilidad inicial del 60%. Posteriormente el medio fue retirado y las células adheridas (vivas) fueron despegadas con Verseno y lavadas por centrifugación en RPMI a 70xg.

Ensayos Biológicos.

Evaluación del efecto del TGF β sobre la proliferación de las diferentes líneas celulares.

Para evaluar el efecto del TGF β (Sigma Immuno-Chemical Co. U.S.A) en la proliferación de las líneas tumorales y normales de cérvix, y de acuerdo con el análisis de tiempo de doblaje se sembraron 2×10^3 células normales y 2.5×10^3 células tumorales en crecimiento exponencial en RPMI al 10% de SFB en cajas de cultivo de 96 pozos.

Después de 24 hrs. de cultivo se cambio por medio fresco que contenía 1 μ Ci/ml de timidina tritiada con una actividad específica de 5Ci/mmol (Amersham), y se agregó TGF β en diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1, 3, 5, 10 y 20 ng/ml). Después de que el estímulo permaneció 3 días en las células tumorales y 5 días en las células fibroblásticas, la incorporación de la timidina tritiada fue evaluada mediante la técnica

de incorporación de timidina tritiada (Zentella, 1991) en un contador de centelleo de emisión Beta tipo Beckman LS6500.

Efecto de los Medios Condicionados en la proliferación de la línea celular Mv1Lu.

Para evaluar el efecto del TGF β contenido en los Medios Condicionados de las líneas tumorales sobre la proliferación de la línea celular Mv1Lu, se sembraron 2.5×10^3 células Mv1Lu en crecimiento exponencial en cajas de cultivo de 96 pozos (Nunc, Inc). El cultivo se suplementó con RPMI al 10% de SFB. Después de 24 hrs, el medio de cultivo se cambio por medio fresco que contenía $1 \mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada y las células Mv1Lu se estimularon con 1ng/ml de TGF β , así como con diferentes concentraciones de proteína total (250, 125, 75, 30 y $15 \mu\text{g}$ de proteína) proveniente de los Medios Condicionados de las células tumorales. La incorporación de timidina tritiada fue evaluada después de 3 días de cultivo mediante un contador de centelleo.

Efecto del TGF β secretado por las células tumorales sobre la capacidad proliferativa de las mismas.

Para evaluar el efecto del TGF β endógeno sobre la proliferación de las células tumorales, se cultivaron 2.5×10^3 células tumorales en crecimiento exponencial en RPMI al 10% de SFB, en cajas de cultivo de 96 pozos. Después de 24 hrs. de cultivo, el medio fue cambiado por medio fresco que contenía $1 \mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada y las células fueron inducidas con Medio Condicionado Tumoral tratado previamente por 1h con $1 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-TGF β humano (R&D Systems), para finalmente mantener el cultivo por otros tres días. Una vez concluido este tiempo, la incorporación de timidina tritiada fue evaluada en un contador de centelleo.

Determinación del Inicio de la Fase de Síntesis de ADN.

Para determinar la entrada a la fase de síntesis, las diferentes líneas celulares en crecimiento exponencial fueron sincronizadas mediante eliminación de SFB del cultivo por 12 hrs. para las células tumorales y 24 hrs. para las células fibroblásticas.

Posteriormente se sembraron 10×10^3 células tumorales y 12×10^3 células fibroblásticas en RPMI al 10% de SFB en placas de 24 pozos. Los cultivos fueron pulsados cada 3 hrs. con $1 \mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada, hasta completar un periodo de 30 y 60 hrs. para las células tumorales y fibroblásticas respectivamente. Concluido el tiempo, la incorporación de timidina tritiada fue evaluada. La relación entre la incorporación del material radioactivo y el tiempo, permiten establecer el inicio y término de la síntesis de ADN (fase S del ciclo celular).

Evaluación de la Incorporación de Timidina Tritiada

Los diferentes ensayos en los que se utilizó timidina tritiada, fueron evaluados de la siguiente manera:

Después de concluido el tiempo de cada uno de los experimentos, las células fueron lavadas con PBS, y fijadas con metanol al 95% en PBS (*Apéndice 5*) durante 20 min, para nuevamente ser lavadas con PBS. Terminado este procedimiento, las células se lisaron con NaOH 0.2M, por lo menos durante 6 hrs. Después de la lisis la solución de Na OH de cada pozo se colocó de manera individual en 3 ml de líquido de centelleo (Beckman), contenido en viales para contador de centelleo, los cuales fueron cuantificados como CPM (cuentas por minuto), en un contador de centelleo de emisión beta tipo Beckman LS6500 (Zentella, 1991).

ELISA

Para cuantificar la cantidad de TGF β secretado por las células tumorales, se utilizó el inmunoanálisis de ELISA (Coligan, 1992) en donde 200 ng de proteína total proveniente de Medio Condicionado (MC) de células tumorales y fibroblásticas, fue colocado en una placa de cultivo de 96 pozos en amortiguador de carbonatos (*Apéndice 6*) durante 24 h, al término de este tiempo la placa se lavó tres veces con TBS al 0.05% de Tween (TBS-Tween) (*Apéndice 7*) y posteriormente se le agregó el anticuerpo primario anti TGF β humano generado en conejo (1:40,000) diluido en un volumen final de 100 μ l de TBS el cual se incubó por 1.5 h a 37°C, posteriormente la placa se lavó tres veces con TBS-Tween. Seguido de este lavado se realizó una incubación con 100 μ l de anticuerpo secundario α -conejo IgG conjugado con peroxidasa (GIBCO BRL) (1:3000) por 1 h a 37°C, a continuación, se realizaron tres lavados con TBS-tween, para finalmente revelar el ensayo mediante la adición de 100 μ l de Solucion Amortiguadora de Citratos (*Apéndice 8*) que contenía OPD (500 μ g/ml) manteniéndolo en oscuridad por 10 min, después de este tiempo la reacción fue detenida con 25 μ l de H₂SO₄ 2.5N y el ensayo se evaluó en un lector de microplacas (TECAN SPECTRA) a una longitud de onda de 490 nm.

Paralelamente, y con la finalidad de realizar una evaluación cuantitativa del TGF β producido, se empleó una curva patrón de TGF β con las siguientes concentraciones: 5 ng, 2 ng, 1 ng, 0.5ng, 0.25 ng, 0.1ng. Así mismo se empleó un control negativo, en donde sólo se incubó con el anticuerpo secundario, con la finalidad de eliminar los posibles errores provocados por alguna unión inespecífica del anticuerpo secundario.

Determinación de la Expresión de p27, cdk4, Rb y p53.

Para la determinación de la expresión de proteínas, se extrajo la proteína total de las células CaLo, InBI, HeLa y Fibroblastos de la siguiente manera:

Se cultivaron 5×10^6 células tanto tumorales como fibroblásticas en RPMI al 10% de SFB por 24 hrs. Posteriormente los cultivos fueron sincronizados mediante dos pasos: el primer paso consistió en retirar el medio de los cultivos y cambiarlo por RPMI al 1% durante un período máximo de 20 hrs; el segundo paso consistió en retirar el medio de los cultivos, lavar tres veces con PBS y dejar los cultivos en RPMI sin SFB por 8 hrs. a 37°C para células tumorales y 24 hrs. en el caso de fibroblastos. A continuación, las células fueron inducidas con RPMI al 10% de SFB, con o sin 10ng/ml de TGF β por 8 hrs. Al término de este tiempo, las células fueron lisadas mediante una solución de lisis que contenía Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 120mM; NaF 100mM, NaVO₃ 200mM, y NP40 0.5%; aprotinina 1.3 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml y PMSF 0.58 mM. La solución de lisis se dejó actuar por 20 minutos a 4°C, para posteriormente centrifugar durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación fue recuperado y la concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford (Apéndice 9) (BIO-RAD). La proteína fue almacenada a -20°C hasta su empleo para Western Blot (Whitaker, 1997).

Western Blot.

Las proteínas celulares extraídas fueron separadas por medio de electroforesis en mini-geles de poliacrilamida (Coligan, 1992 y Sambrook, 1989) al 7.5% para el caso de la proteína Rb, mientras que para las proteínas p53, cdk4, y p27, se emplearon geles al 12.5%. La separación electroforética se realizó con 100 μ g de proteína en

condiciones reductoras a 75 voltios por 2.5 hrs. y posteriormente el gel se transfirió a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia en semiseco por 1,5 hrs. a 120 mili amperes a 4°C. La eficiencia de la transferencia se determinó mediante la tinción de la membrana de nitrocelulosa con Rojo de Ponceau S para su posterior lavado con agua.

La membrana de nitrocelulosa (GIBCO BRL) con las proteínas inmovilizadas se bloqueó con 5% de leche semidescremada en solución amortiguadora de TBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces con TBS-tween y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente: anti Rb humano (0.4µg/ml) (PharMingen), anti p53 humano (2µg/ml) (Oncogene), anti cdk4 humano (5µg/ml) (Neo Markers), y anti CDK1 p27 humano (1µg/ml) (Neo Markers) en solución amortiguadora de TBS durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, la membrana fue lavada 5 veces con TBS-tween y posteriormente se agregó un anticuerpo secundario IgG conjugado con biotina (DAKO) diluido 1:3000 en TBS, mismo que se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue lavada 5 veces con TBS-tween y enseguida se incubó por 1 hora con avidina conjugado con fosfatasa alcalina (DAKO) diluido 1:5000 en TBS. Finalmente la membrana se reveló en amortiguador de fosfatasa alcalina (*Apéndice 10*) que contenía NBT y BCIP (*Apéndice 11*). La reacción fue detenida en un tiempo máximo de 15 minutos lavando con agua destilada (Coligan, 1992 y Sambrook, 1989).

Análisis de la Expresión de ARNm

5x10⁶ células tumorales o fibroblásticas fueron sembradas en RPMI al 10% de SFB por 24 hrs. para posteriormente sincronizar las células mediante la forma antes descrita. Después de la sincronización, las células tumorales fueron inducidas con 10 ng/ml de TGFβ por 4 hrs. en el caso de las células tumorales, o con 10 ng/ml por 24 hrs. en el caso de células fibroblásticas. Al cabo de este tiempo las diferentes líneas

celulares fueron despegadas de la caja y el botón celular obtenido fue resuspendido en 500 μ l de trisol.

La extracción del ARN se realizó mediante el empleo de cloroformo e isopropanol, y una vez obtenido el ARN, se lavó con etanol al 75% para finalmente ser resuspendido en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) (Apéndice 12).

El ARN fue separado por electroforesis en un gel de agarosa y formaldehído, y posteriormente fue transferido a una membrana de nylon para su posterior hibridación (Sambrook, 1989).

La membrana de nylon se prehibridizó utilizando una solución que contenía SSC 6x (Apéndice 13), y Solución Denhardt (Apéndice 14) 5X, 0.5% de SDS, 50% de formamida, y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón. La prehibridación se realizó por 4 hrs. a 42°C, y una vez transcurrido este tiempo se adicionó la sonda previamente marcada con 32 P (Amersham), misma que se incubó por 48 hrs. a 42°C, para finalmente lavarse y ser expuesta a un cartucho para ARN, el cual fue leído en un STORM, en donde se evaluó la presencia del ARN.

Todos los reactivos ocupados en este trabajo fueron solicitados en Sigma Chemical Co. U.S.A. y en GIBCO-BRL.

Análisis Estadístico.

Todos los resultados fueron sometidos a análisis estadístico de prueba de t de student suponiendo varianzas iguales o a análisis de varianza de un solo factor, utilizando los paquetes estadísticos del programa Excel.

RESULTADOS

Efecto del TGF β en la proliferación de células de CaCu.

Teniendo como antecedente que el TGF β es un fuerte inhibidor de la proliferación de células de origen epitelial, así como de algunas líneas celulares tumorales a concentraciones de 10 ng/ml, y con la finalidad de determinar el efecto de este factor en la proliferación de líneas tumorales provenientes de CaCu, se evaluó el efecto del TGF β (10 ng/ml) sobre la proliferación de las líneas celulares CaLo, InBl y HeLa (Figura 1). Los resultados obtenidos muestran que contrario a lo establecido en la literatura para células de origen epitelial en donde se menciona que éstas son inhibidas en su proliferación con 10 ng/ml de TGF β (Polyak, 1996., Boyd, 1989), las células tumorales son estimuladas a proliferar en un 50, 40 y 42 % para las células CaLo, InBl y HeLa respectivamente. Sin embargo, al medir el efecto de esta misma molécula en la proliferación de células de cérvix normal humano, se observa una inhibición de la proliferación en un 30% para células epiteliales y en un 40 % para células fibroblásticas, implicando que el efecto mitogénico del TGF β sobre las células tumorales, es inherente de las mismas, y no se debe a la falta de actividad del factor, ya que éste mantuvo su función inhibidora en células normales de cérvix.

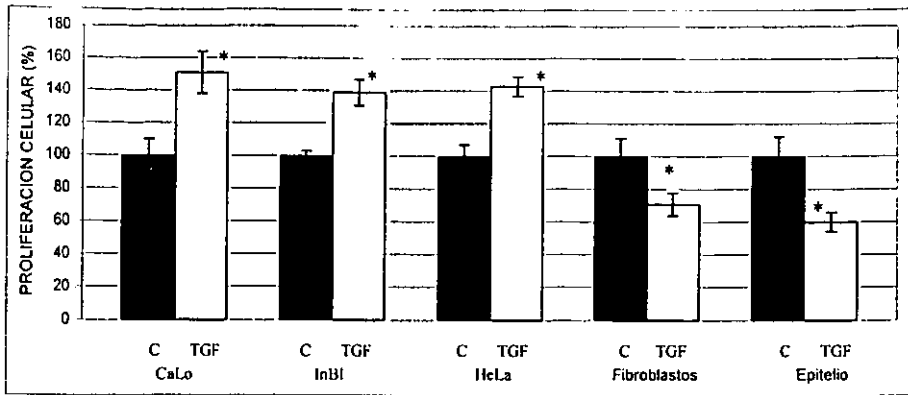


Figura 1. Efecto del TGF β en la proliferación de células normales y tumorales de cérvix humano. 2×10^3 Células normales y 2.5×10^3 células tumorales de cérvix en crecimiento exponencial fueron sembradas con RPMI al 10% de SFB (C) o con RPMI al 10% de SFB más 10ng/ml de TGF β (TGF) y se adicionó $1 \mu\text{Ci}$ /ml de timidina tritiada. El ensayo se evaluó a los 3 días en el caso de células tumorales y a los 5 días para el caso de las células normales, mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada. Los resultados son expresados en porcentaje, tomando como el cien por ciento el número de cuentas por minuto (cpm) totales obtenidas en el control, para cada tipo celular evaluado. *Diferencia significativa con $P < 0.005$ en cada una de las líneas celulares tratadas, con respecto a su control.

La falta de actividad inhibitoria por el TGF β observada en las células tumorales condujo a pensar que las células podían tener alguna de las siguientes modificaciones: que la dosis de TGF β empleada para inhibir la proliferación de células tumorales no sea la adecuada; que la presencia del Virus del Papiloma Humano Tipo 18 (presente en estas células tumorales) modifique la actividad del TGF β , que al igual que lo que sucede con otros tumores, las células CaLo, InBI y HeLa sean capaces de secretar su propio TGF β que las induzca a la proliferación; o que alguno de los componentes involucrados en la vía de señalización del TGF β se encuentre alterado.

Teniendo el antecedente que existen células que pueden inhibirse a diferentes dosis de TGF β , se realizó una evaluación dosis dependiente, con la finalidad de determinar si existe una concentración adecuada para producir inhibición de la proliferación en las células tumorales CaLo, InBI y HeLa (Figura 2).

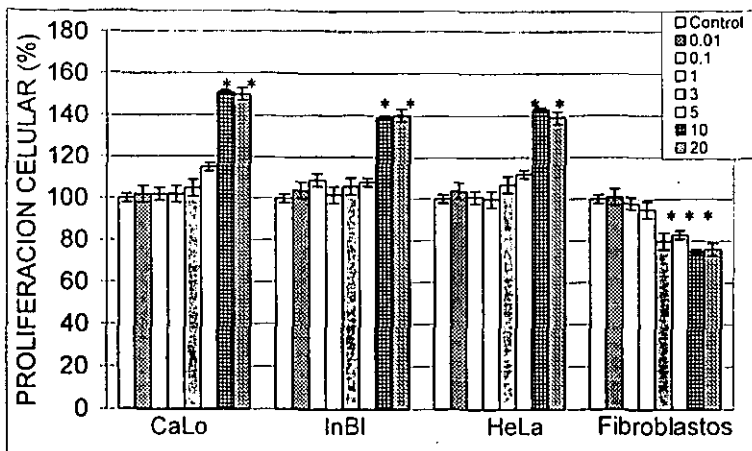


Figura 2. Evaluación de la concentración de TGF β sobre la proliferación de las líneas tumorales de CaCu Calo, InBI y HeLa. 2×10^3 células normales y 2.5×10^3 células tumorales de cérvix en crecimiento exponencial fueron sembradas en RPMI al 10% de SFB (Control) o en RPMI al 10% de SFB más 0.01, 0.1, 1, 3, 5, 10 y 20ng/ml de TGF β y 1 μ Ci/ml de timidina tritiada. El ensayo se evaluó a los 3 días mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada, y se correlacionaron los datos a porcentaje de proliferación, tomando como 100% el control. * Diferencia significativa con respecto al control con $P < 0.005$

El resultado demuestra que las células tumorales CaLo InBI y HeLa son resistentes al efecto inhibitor provocado por el TGF β en concentraciones menores de 5ng/ml, sin embargo, se registra un efecto mitogénico semejante a concentraciones de 10 y 20 ng/ml, lo que sugiere que estos tipos celulares han perdido la capacidad de inhibir su proliferación mediante el TGF β , lo que no sucede en el caso de los fibroblastos normales, quienes son inhibidos en su proliferación a diferentes concentraciones de TGF β .

El resultado anterior generó la posibilidad que probablemente la presencia del HPV contribuya a cambiar el efecto biológico observado para ésta molécula. Por este motivo, y con la finalidad de evaluar el efecto del TGF β en líneas celulares de CaCu libres de HPV, se utilizaron las células ViBo y C33, que fueron tratadas con 10ng/ml de TGF β (Figura 3)

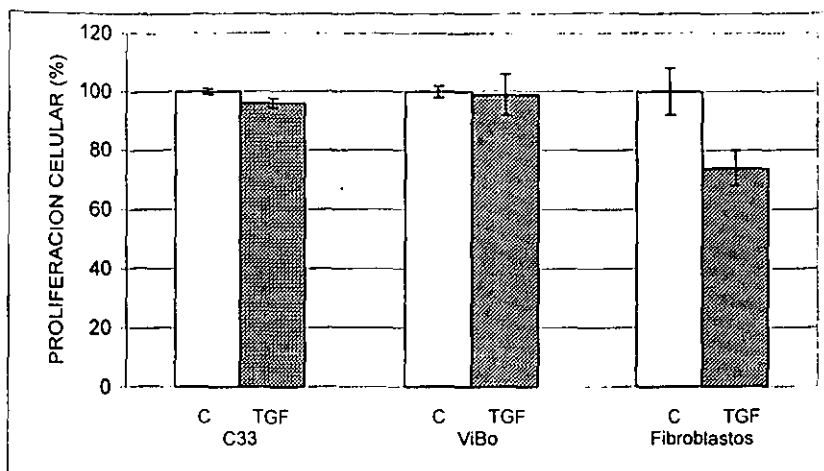


Figura 3. Efecto del $TGF\beta$ en la proliferación de las líneas celulares libres de HPV 18 ViBo y C33. 2.5×10^3 células tumorales en crecimiento exponencial fueron sembradas en RPMI al 10% de SFB (C) o en RPMI al 10% de SFB más 10ng/ml de $TGF\beta$ (TGF) y $1\mu Ci/ml$ de timidina tritiada. El ensayo se evaluó a los 3 días mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada. Los datos son expresados en porcentaje de proliferación, tomando como 100% el control. No existe diferencia significativa con $P > 0.005$

La figura anterior indica que en las líneas tumorales C33 y ViBo, el $TGF\beta$ pierde también su capacidad de inhibir la proliferación celular, pero no es capaz de estimularla como en el caso de las células que son HPV positivas, lo que sugiere, que la presencia del HPV tipo 18 contribuye a que las células CaLo, InB1 y HeLa sean estimuladas a proliferar en presencia de 10 ng/ml de $TGF\beta$, alterando de algún modo, los mecanismos celulares normales por los que estas células regulan su proliferación.

Producción de TGF β por las líneas tumorales de CaCu

Es conocido que algunas células tumorales son capaces de secretar TGF β al medio de cultivo, sin embargo no se conoce si esta molécula es capaz de actuar como un factor mitogénico sobre la proliferación de las células que la producen. En el caso particular de las células tumorales CaLo, InBI y HeLa (las cuales incrementan su capacidad proliferativa en presencia de TGF β), y con la finalidad de determinar si éstas son capaces de producir y secretar su propio TGF β , se realizó un análisis de ELISA en los Medios Condicionados provenientes de cultivos celulares de las tres líneas tumorales (Figura 4).

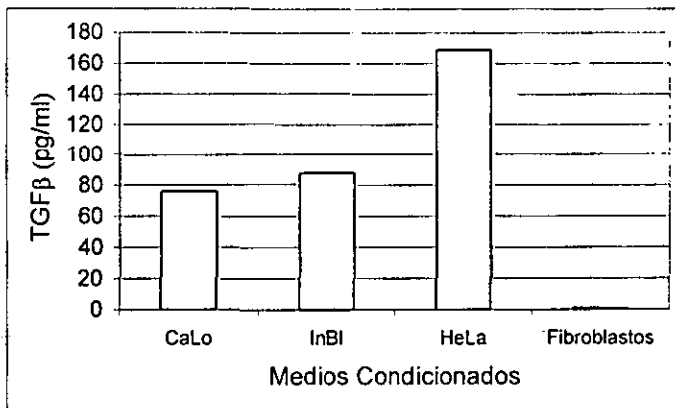


Figura 4. Detección de TGF β en los Medios Condicionados de las líneas tumorales CaLo, InBI y HeLa, así como en el Medio Condicionado de Fibroblastos de cérvix normal humano. 200 ng de proteína total proveniente de Medios Condicionados, fueron tratados con anticuerpo anti TGF β humano, y posteriormente con el conjugado anti IgG-Peroxidasa, para finalmente revelar la reacción de ELISA con OPD y Peróxido de Hidrógeno. La coloración obtenida fue correlacionada mediante regresión lineal con una curva patrón con concentraciones conocidas de TGF β , determinando así la concentración de TGF β presente en los Medios Condicionados.

El análisis de ELISA muestra que las células CaLo, InBl y HeLa son capaces de secretar TGF β en concentraciones de 76, 88 y 169 pg/ml respectivamente, lo que indica que esta secreción es mínima comparada con los 10 ng/ml de TGF β recombinante requerido para inducir proliferación celular en las líneas CaLo, InBl y HeLa. Sin embargo, cabe la posibilidad de pensar que esta molécula, aún en las concentraciones encontradas, tenga la suficiente actividad biológica como para inducir algún efecto. Por este motivo, se utilizó la línea celular Mv1Lu, la cual es inhibida por el TGF β , y se cultivo con diferentes concentraciones de proteína contenida en el Medio Condicionado Tumoral, así como con su control de TGF β recombinante (Figura 5).

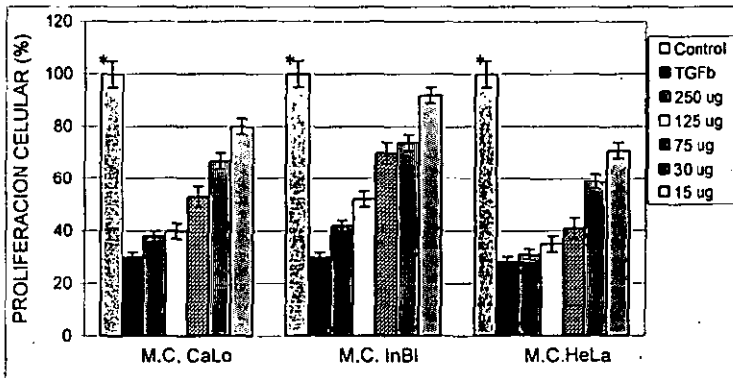


Figura 5. Evaluación de la actividad de TGF β presente en los Medios Condicionados de Células Tumorales. 2.5×10^3 células Mv1Lu en crecimiento exponencial fueron sembradas en placas de 96 pozos en RPMI al 10% de SFB, posteriormente las células se estimularon con 1ng/ml de TGF β , con 250, 125, 75, 30 y 15 μ g de proteína total proveniente de los Medios Condicionados de Células Tumorales, y sin estímulo alguno (control). Al cabo de 3 días la proliferación celular de la línea Mv1Lu fue evaluada mediante la incorporación de timidina tritiada, y se correlaciona a porcentaje, tomando como 100% el control. * Diferencia significativa entre el control y todos los tratamientos con $P < 0.005$.

El ensayo de actividad muestra, que el TGF β secretado por las diferentes líneas tumorales de CaCu, es biológicamente activo, ya que la línea Mv1Lu es inhibida en su proliferación de manera dependiente de la concentración por los

Medios Condicionados provenientes de las diferentes líneas celulares tumorales, implicando entonces que el TGF β secretado por éstas es funcional, de manera que se procedió a determinar si el TGF β producido por las células tumorales y contenido en el medio condicionado tumoral, está relacionado con el potencial proliferativo de las líneas CaLo, InBl y HeLa.

Para ello, se utilizaron células tumorales en crecimiento exponencial, y los medios condicionados de las mismas células tumorales a las que se aplicó o no anticuerpos neutralizantes para TGF β , con la finalidad de bloquear el efecto autócrino que tuviera el TGF β al ser secretado (Figura 6).

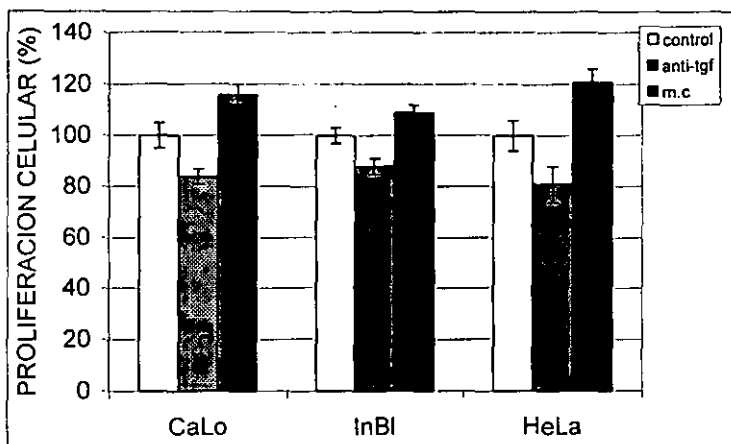


Figura 6. Efecto del TGF β secretado por las células tumorales en la proliferación de ellas mismas. 2.5×10^3 células tumorales en crecimiento exponencial fueron sembradas en RPMI al 10% de SFB (control) o en RPMI al 10% de SFB mas 20% de Medio Condicionado Tumoral tratado (anti-TGF) o no tratado (m.c) con $1 \mu\text{g/ml}$ de anti TGF β y $1 \mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada. El ensayo se evaluó a los 3 días mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada, y se correlacionaron los datos a porcentaje de proliferación, tomando como 100% el control. * Diferencia significativa con respecto al control con $P < 0.005$

El resultado demuestra que el TGF β secretado por las células tumorales está involucrado en su propia proliferación celular, ya que se observó que al tratar el medio condicionado con el anticuerpo, la proliferación de las células CaLo, InBl y HeLa disminuye en un 16, 12 y 19% respectivamente. Cabe hacer notar,

que este efecto es mayor en las células HeLa, quienes también secretan la mayor cantidad de TGF β . Sin embargo, el encontrar que el bloqueo del TGF β , no abatió totalmente el potencial proliferativo de las células tumorales, sugiere que pueden existir otros factores que intervienen en dicho potencial, evento que es confirmado al encontrar que los medios condicionados de las células tumorales sin tratamiento, confiere un estímulo mitogénico a la proliferación de las líneas CaLo, InBi y HeLa.

Los datos presentados hasta el momento, sugerían que el TGF β está directamente involucrado en la proliferación celular de las líneas CaLo, InBi y HeLa, lo que conduce a pensar que alguna de las moléculas involucradas en la señalización del TGF β se encuentra alterada, hecho que asociado a la presencia del HPV, pudiera explicar el diferente efecto del TGF β observado en células normales y tumorales del cérvix humano.

Con el fin de evaluar algunos de los componentes de la vía de señalización del TGF β en estas células, y con el antecedente que esta molécula ejerce su efecto en la fase G₁ del ciclo celular (Polyak, 1996), se hizo necesario determinar primero, el inicio de la fase G₁ del ciclo celular, en cada uno de los tipos celulares empleados en este trabajo.

Determinación del inicio de la fase de síntesis en las líneas tumorales y fibroblastos normales.

En la determinación de la fase G_1 , se usaron células en crecimiento exponencial que fueron sincronizadas por eliminación del suero en el cultivo por 12 hrs. para las células CaLo, InBl y HeLa y por 24 hrs. en el caso de fibroblastos normales. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron cultivadas en RPMI al 10% de SFB y pulsadas cada 3 horas con 3H-Timidina, dejando continuar el ciclo celular por 24 horas para las células tumorales y 60 horas para células fibroblásticas (Figura 7).

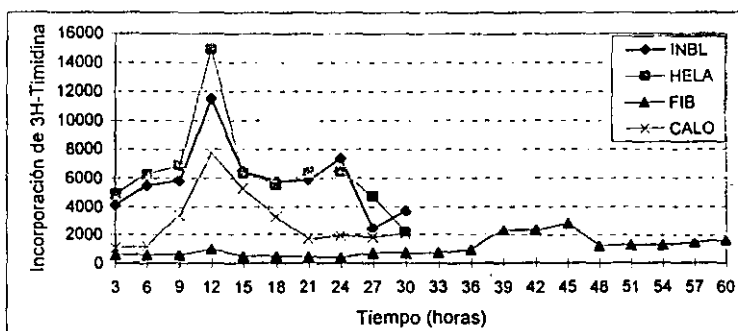


Figura 7. Determinación de la fase G_1 del ciclo celular en las líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa, así como en los fibroblastos de cérvix normal humano. 10×10^3 células tumorales y 12×10^3 células fibroblásticas sincrónicas se cultivaron en RPMI al 10% de SFB y se pulsaron con timidina trititada cada 3 horas hasta completar 24 y 60 horas para las células tumorales y fibroblásticas respectivamente. La entrada a la fase de síntesis de ADN se determinó mediante el inicio en la incorporación de timidina trititada, por lo que el tiempo anterior a este punto se consideró como fase G_0/G_1 del ciclo celular.

Los resultados indican, que las células tumorales CaLo, InBl y HeLa sincrónicas comienzan la fase de Síntesis de ADN a las 9 horas, y termina a las 15 horas. Con este resultado podemos afirmar que el tiempo transcurrido antes del inicio de la síntesis de ADN corresponde a la fase G_0/G_1 del ciclo celular de las líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa, con duración de 9 hrs., mientras que la fase

de síntesis de ADN tiene una duración de 6 horas. En cuanto a los fibroblastos de cérvix normal humano, se observa que la fase de síntesis de ADN comienza a las 36 horas y finaliza a las 48 horas, por lo que la fase G_1 tiene una duración de 36 horas, mientras que la fase de síntesis tiene una duración de 12 horas.

Modificación en la expresión de algunas proteínas involucradas en la vía de señalización del TGF β

Ya determinada la duración de la fase G_1 del ciclo celular en las diferentes líneas celulares y con el objeto de explicar el efecto mitogénico del TGF β observado para estas células, se procedió a evaluar si alguna de las proteínas implicadas en la vía de señalización del TGF β como inhibidor de la proliferación, presentan alguna modificación de acuerdo con lo establecido en la literatura

Conociendo que el TGF β es capaz de inhibir la proliferación mediante la expresión del CDK1 p27, se determinó la expresión de esta proteína en células tumorales y fibroblásticas en crecimiento exponencial, tratadas por 8 y 36 horas respectivamente con el TGF β , así como con su control de células sin tratamiento (Figura 8).

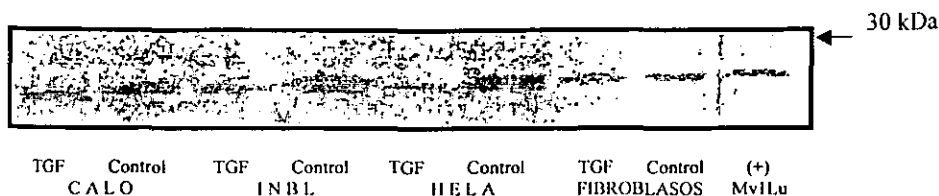


Figura 8. Efecto del TGF β en la expresión de la proteína p27. 150 μ g de proteína de lisado celular total de células tumorales y fibroblastos de cervix fueron separados en SDS-PAGE al 12.5% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. El blot fue cortado en el peso molecular de 30 kDa e incubado con anti-p27, para finalmente ser revelado mediante la técnica de fosfatasa alcalina.

El resultado demuestra que en las células tumorales tratadas con TGF β existe una disminución en la expresión de p27 comparadas con su control sin tratamiento, efecto que no se observa en fibroblastos normales en donde la expresión de p27 parece no modificarse aún en presencia de TGF β . Este hecho sugiere que en el mecanismo mediante el cual las células tumorales pierden su capacidad de responder al efecto inhibitor de la proliferación provocado por el TGF β , está involucrada la proteína p27, cuya disminución, podría darle al TGF β un papel mitogénico. En cuanto a las células fibroblásticas, el hecho de que el TGF β no estimule la expresión de p27 como se ha reportado para la línea celular Mv1Lu, cuya proliferación es inhibida en presencia de TGF β , sugiere que algún otro CDKI puede estar involucrado.

Aunado a esto, es conocido que p27, tiene la capacidad de asociarse con el complejo ciclina D-cdk4 para evitar la progresión en el ciclo celular y provocar con ello inhibición de la proliferación; por ello, la expresión de la proteína cdk4 (que es la subunidad catalítica del complejo) fue evaluada en células tratadas y no tratadas con TGF β (Figura 9).

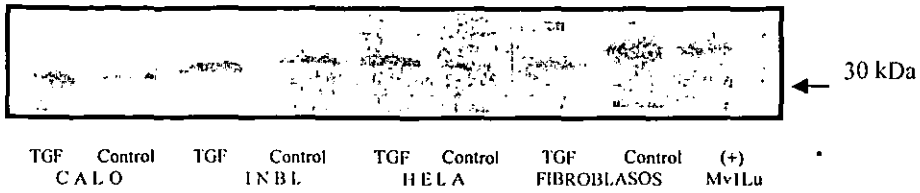
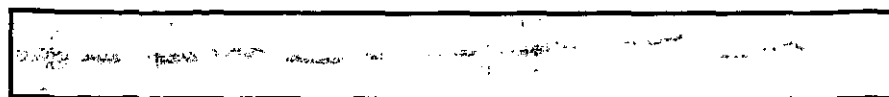


Figura 9. Efecto del TGF β en la expresión de la proteína cdk4. 150 μ g de proteína de lisado celular total de células tumorales y fibroblastos de cérvix fueron separados en SDS-PAGE al 12.5% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. El blot fue cortado entre el peso molecular de 30 y 43 kDa, e incubado con anti-cdk4, para finalmente ser revelado mediante la técnica de fosfatasa alcalina.

Como se observa en la figura anterior, la expresión de la proteína cdk4 se incrementa con respecto a su control en las células tumorales cuando éstas son tratadas con TGF β , sin embargo, en el caso de las células fibroblásticas, la expresión de cdk4 disminuye.

Por otro lado, se ha determinado que los complejos ciclina-cdk, regulan la transición de la fase G₁ del ciclo celular a través de la proteína Rb, por lo que es necesario determinar que sucede con la expresión de esta proteína en estas células al ser estimuladas con TGF β .

Para evaluar la expresión de la proteína Rb, se cultivaron células tumorales sincrónicas, las cuales fueron sometidas a tres diferentes tratamientos, en el primero las células se cultivaron en RPMI libre de SFB (células en G₀), en el segundo se cultivaron en RPMI al 10% de SFB (células en fase de síntesis), y en el tercero se estimularon con 10 ng/ml de TGF β durante 8 horas. Una vez realizados estos tratamientos las células se lisaron y se realizó un Western Blot en el que se evaluó el estado de fosforilación de la proteína Rb. (Figura 10)



(+)	CG0	TGF β	CS	CG0	TGF β	CS	CG0	CS	TGF β	CG0	CS	TGF β
Mv1LU	C A L O			I N B L			H E L A			FIBROBLASTOS		

Figura 10. Efecto del TGF β en la fosforilación de la proteína Rb. 150 μ g de proteína de lisado celular total de células tumorales y fibroblastos de cérvix cultivados en RPMI libre de SFB (CG0), sembrados en RPMI al 10% de SFB (CS) y sembrados con 10ng/ml de TGF β (TGF β), fueron separados en SDS-PAGE al 7.5% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. El blot fue cortado entre el peso molecular de 98 y 130 kDa, e incubado con anti-Rb, y finalmente se reveló mediante la técnica de fosfatasa alcalina.

Como se observa en la figura 10, las células tumorales que son cultivadas únicamente en presencia de RPMI (G_0) presentan una banda correspondiente a Rb en su forma hipofosforilada, mientras que en las células tratadas con RPMI más SFB (CS) la banda de Rb se observa ligeramente arriba de la banda antes descrita, lo que sugiere que se trata de Rb en estado hiperfosforilado. En el caso de las células tumorales tratadas con TGF β se observa que Rb permanece en su estado hiperfosforilado.

Por el contrario, en el caso de las células fibroblásticas normales, Rb se presenta hipofosforilada cuando las células se cultivaron sin SFB y cuando se sembraron en presencia de 10 ng/ml de TGF β , mientras que con SFB, Rb se detecta en su forma hiperfosforilada.

Este hecho aunado a la disminución de p27 y al incremento de cdk4, plantea la posibilidad de que en las células tumorales CaLo, InBl y HeLa, el efecto mitogénico observado para el TGF β sea debido a que no hay inducción de p27, y aunque no evita la formación del complejo ciclina cdk, el hecho de que cdk4 se incremente puede contribuir a mantener a la proteína Rb en estado hiperfosforilado y en consecuencia a las células en constante proliferación.

Por otra parte, es conocido que en células de origen epitelial, la inhibición de la proliferación causada por TGF β es dependiente de la presencia de la

proteína p53 (Ewen, 1995), la cual es un importante regulador de la progresión del ciclo celular y de su proliferación. Por este motivo se consideró importante evaluar si el TGF β provoca alguna modificación en la expresión de la proteína y el ARN mensajero para p53. (Figura 11A y 11B).

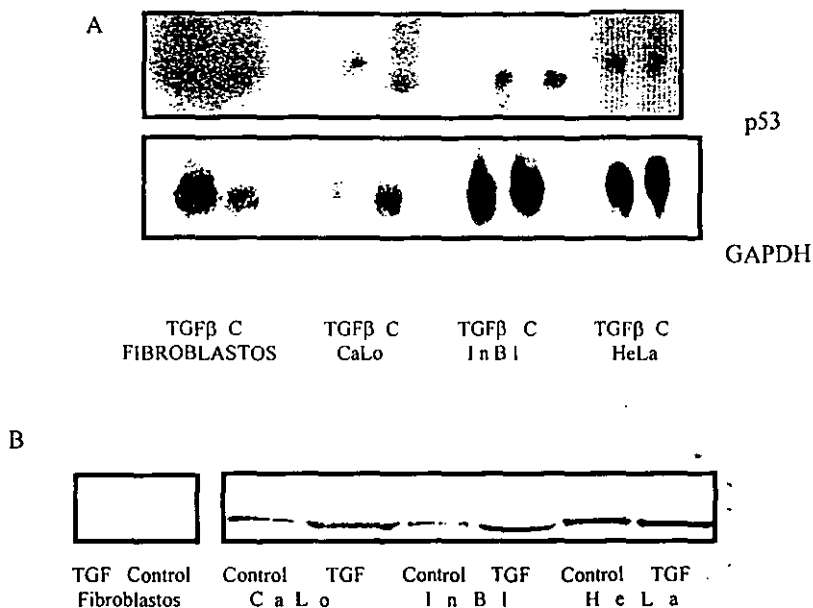


Figura 11. Efecto del TGF β en la expresión de la proteína y ARNm de p53. A) expresión de ARNm. Los ARN extraídos de células tumorales y fibroblásticas tratadas y no tratadas con TGF β fueron sometidos a Northern Blot, e incubados con un oligonucleotido de p53 marcado con 32 P, el cual fue analizado en un STORM. B) Expresión de proteína. 150 μ g de proteína de lisado celular total de células tumorales y fibroblastos de cervix fueron separados en SDS-PAGE al 12.5% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. El blot fue cortado entre el peso molecular de 43 y 68 kDa, e incubado con anti-p53, para finalmente ser revelado mediante la técnica de fosfatasa alcalina.

El resultado de la figura 11, demuestra que los fibroblastos de cérvix normal humano, así como las tres líneas tumorales presentan ARNm y proteína para p53, y que esta última se ve incrementada con la inducción de TGF β en células tumorales, contrario a lo que sucede en el caso de fibroblastos normales. Si p53 se activa durante la proliferación celular para verificar la estabilidad del genoma como se observa en los fibroblastos normales, en donde su expresión aumenta en las células control, y no en las que están inhibidas a proliferar por TGF β , suponemos entonces que en el caso de las células tumorales p53 se activa bajo el tratamiento del TGF β en respuesta al estímulo de proliferación. Cabe mencionar que el hecho de detectar ARN y proteína de p53 sugiere que esta molécula puede ser activada por diferentes estímulos en estas células, sin embargo se desconoce si realmente se trata de una molécula normal o mutada.

DISCUSION DE RESULTADOS

Las células como sistemas altamente organizados, presentan una complejidad funcional y estructural sorprendente, de tal manera que diversas funciones pueden ser realizadas o moduladas, por una sola molécula, como sucede con las citocinas o moduladores biológicos, que actúan en funciones tales como el control de la diferenciación celular, la apoptosis, la división celular, entre otras.

En el mecanismo que controla la división celular, el Factor de Crecimiento Transformante beta ($TGF\beta$) se ha destacado como un potente inhibidor de la proliferación de la mayoría de las células de mamífero en condiciones normales. Sin embargo, en condiciones patológicas como el cáncer o la transformación celular, el papel de inhibidor de la proliferación que ha presentado este factor aún no es muy claro, ya que en algunos tipos tumorales el $TGF\beta$ parece no afectar la proliferación celular.

En el caso particular del modelo empleado en este trabajo, se encontró que las células tumorales Calo, InBl y HeLa, son resistentes al efecto inhibidor de la proliferación provocado por el $TGF\beta$, sin embargo, en células normales —tanto fibroblásticas como epiteliales— el $TGF\beta$ mantiene sus características inhibitoras de la proliferación (Figura 1). Este resultado concuerda con trabajos realizados por Serra (1996), y Manning (1991), quienes mencionan que células procedentes de diferentes tumores (cabeza y cuello, cáncer de páncreas, fibrosarcoma, osteosarcomas y carcinomas gástricos), son resistentes al efecto inhibidor del $TGF\beta$. Además, se ha demostrado que en tumores procedentes de colon y recto, la transformación de células no tumorigénicas a tumorigénicas, se encuentra asociado con la reducida actividad inhibitora de $TGF\beta$ (Muto, 1975).

Estos resultados sugieren que las células tumorales son capaces de desarrollar una resistencia al efecto inhibidor del $TGF\beta$ y establecen también que dicha resistencia está dada por alguna modificación en la maquinaria de las

células tumorales. El hecho de encontrar que las células tumorales presenten resistencia al efecto del TGF β en concentraciones menores a 5ng/ml apoya la suposición anterior. Sin embargo, lo sorprendente es que estas células no sólo desarrollaron resistencia, sino que además, proliferan en presencia del TGF β , cuando es adicionado en concentraciones mayores a 10 ng/ml.

No obstante el haber obtenido respuesta mitogénica de las células tumorales a TGF β y el hecho de saber que estas células presentan HPV, generan la posibilidad de que la respuesta de estas células al TGF β esté determinada por este virus. Al respecto, el encontrar que las células negativas al HPV no se vieran afectadas en su proliferación por el TGF β (Fig.3), soportan la idea que la presencia de HPV se encuentra relacionada con el efecto mitogénico del TGF β , más no con el fenómeno de resistencia desarrollado por estas células. Este resultado es semejante a lo obtenido por Farley (2000), quien menciona que las líneas celulares CasKi y SiHa, las cuales presentan el Papiloma Virus Humano Tipo 16, son resistentes al efecto inhibitor del TGF β .

Aunado a lo anterior, nuestros resultados también establecen que las tres líneas tumorales son capaces de secretar TGF β en concentraciones de picogramos (Figuras 4). Resultados que concuerdan con el trabajo realizado por Santin (1997), quien menciona que células procedentes de adenocarcinomas cervicales, son capaces de producir TGF β en concentraciones de 207 a 282 pg / ml.

Además, se encontró que el TGF β secretado es una molécula biológicamente activa, como lo demuestra la figura 5. Cabe hacer notar que la línea Mv1Lu inhibe su proliferación a concentraciones de 1ng/ml de TGF β , por lo que consideramos que el TGF β secretado por las células tumorales tiene una fuerte actividad biológica, ya que aunque se detecta en concentraciones de picogramos, presenta una fuerte actividad inhibición de la proliferación en la línea Mv1Lu.

De manera similar, se observó que el TGF β secretado se encuentra relacionado con el potencial proliferativo de las células tumorales (Figura 6), ya que el tratamiento con anticuerpos neutralizantes contra el TGF β en el cultivo de las células tumorales, bloquea la actividad mitogénica producida por el TGF β endógeno. Sin embargo, el haber encontrado que el anticuerpo no abatió completamente la proliferación celular, sugiere la participación de otros factores.

A este respecto, se ha sugerido que elevados niveles de TGF β pueden contribuir al establecimiento de un tumor, ya sea por estimulación directa en las células tumorales, o por vías indirectas que involucren un incremento en la producción de matriz extracelular o proteínas de adhesión a la matriz extracelular que provean de un microambiente adecuado para el establecimiento y desarrollo tumoral (Gold, 1994; Farley, 2000). Al respecto, se ha encontrado que las células tumorales CaLo, InBl y HeLa, son capaces de secretar IL-1 y TNF, de las cuales se conoce que tienen actividad mitogénica en otros tipos celulares, por lo que sería interesante determinar si estas citocinas se involucran directamente con el potencial proliferativo de las células.

El haber encontrado que las células CaLo, InBl y HeLa son capaces de producir TGF β y utilizarlo como estimulador de la proliferación, sugiere que el mecanismo de señalización mediante el cual esta molécula ejerce su efecto se encuentra modificado.

Al respecto, encontramos que fibroblastos normales de cérvix tratados con 10ng/ml de TGF β , incrementan la expresión de p27, mientras que en las líneas tumorales, la expresión de p27 disminuye, confirmando que la vía de señalización utilizada por el TGF β se encuentra modificada. Además, sugiere que p27 está relacionado con el papel mitogénico del TGF β observado en estas células. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Florenes (1998), Tan (1997), y Esposito (1997) quienes mencionan que p27 se encuentra disminuida en melanoma maligno, cáncer colorectal, cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer pulmonar, ocasionando proliferación celular. Aunado a ello, en el caso particular

de células cervicales se ha reportado que el nivel de expresión de la proteína p27 se encuentra disminuido entre un 50 y 76% en carcinomas cervicales, evento que podría contribuir al desarrollo del tumor por la constante entrada de estas células a la fase de síntesis (Skomedal, 1999; Schimitz, 2000; Farley, 2000).

Sin embargo, aunque se ha determinado que p27 usa como principal blanco para inhibir la proliferación celular a la proteína cdk4, existen datos que mencionan que en algunas líneas tumorales esta molécula se encuentra disminuida (Ewen, 1995), aunque también existen datos que indican que esta molécula no sufre alteración en células tumorales (Kamesaki, 1998). De acuerdo a esto, nosotros encontramos que la expresión basal de dicha proteína se encuentra incrementada en las líneas tumorales, evento que correlaciona con el trabajo de Skomedal, (1999) quien menciona que en el 69% de los carcinomas cervicales, cdk4 se encuentra incrementado con respecto a las líneas normales.

Aunado a ello, cuando los fibroblastos normales fueron tratados con 10 ng/ml de TGF β , se detectó que cdk4 disminuye su expresión, mientras que en el caso de las células tumorales cdk4 se incrementa. Este resultado correlaciona con el trabajo de Ewen (1995), quien menciona que el TGF β disminuye la síntesis de cdk4 en células epiteliales normales y células epiteliales Mv1Lu, pero en células transformadas o que tienen mutada la proteína p53, cdk4 se incrementa después del tratamiento con TGF β .

Este evento sugiere que en células normales la expresión de cdk4 disminuye, y como consecuencia disminuye su actividad cinasa, evitando así la progresión en el ciclo celular; mientras que en el caso de células tumorales existe una incrementada actividad cinasa producida por cdk4, la cual asociada a la disminución de la proteína p27 contribuye al incremento en la proliferación celular y por lo tanto a la carcinogénesis.

Por otra parte, es conocido que el blanco principal de las proteínas p27 y cdk4 es la proteína Rb. Esta proteína se encuentra frecuentemente mutada o inactivada en tumores humanos (PoliK, 1996). Sin embargo nuestros resultados

demuestran que las diferentes líneas celulares (tanto tumorales como normales) empleadas en este trabajo, presentan esta proteína (Fig.10). Esta observación es semejante a la realizada por Skomedal (1999), quien detecta la expresión de Rb en el 100% de los casos de carcinoma cervical, no obstante que se ha reportado que la presencia del HPV altera su expresión, y pueda encontrarse de forma inactiva al formar un complejo con la proteína E7 del HPV.

En este sentido cuando las células CaLo, InBI y HeLa fueron tratados con TGF β , presentaron a la proteína Rb en estado hiperfosforilado, lo que correlaciona directamente con la proliferación celular observada. Sin embargo, esto no sucede en el caso de fibroblastos normales, en donde la proteína Rb se observa en estado hipofosforilado después del tratamiento con TGF β , lo que justifica la inhibición de la proliferación en estas células.

Por otro lado, y considerando que existen proteínas consideradas como supresores tumorales y dado que nuestro modelo experimental está constituido por células que están en constante proliferación, lo que implica una mayor probabilidad de daño al ADN, se consideró importante evaluar la expresión del supresor de tumor p53, el cual se activa en respuesta a daño en el material genético (Levine, 1991).

Nuestros resultados demuestran que las líneas tumorales, al igual que los fibroblastos normales presentan la proteína y el ARNm para p53, y que además la proteína se encuentra disminuida en fibroblastos después del tratamiento con TGF β , lo que no sucede en el caso de las células tumorales, en donde la expresión de proteína y ARN para p53 se incrementan. Esta observación sugiere que en fibroblastos p53 disminuye ya que las células se detienen en su proliferación, mientras que en el caso de las líneas tumorales p53 podría activarse y aumentar su expresión como consecuencia de la excesiva proliferación celular tumoral.

En este sentido es importante mencionar que aunque se detectó cambio en la expresión de p53, sería importante determinar el estado de dicha proteína,

ya que es conocido que se encuentra mutada en el 50% de los cánceres humanos, y que además en células que tienen p53 mutada TGF β pierde actividad inhibidora de la proliferación (Reiss, 1993).

Finalmente, es importante mencionar, que si bien el trabajo no se enfocó a la relación del HPV en la modificación de la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular, es conocido, que este virus o sus productos proteicos están involucrados con la regulación de proteínas implicadas en la vía de señalización del TGF β (Schefner, 1990., Davis, 1993).

En este sentido, los casos más ampliamente descritos involucran la participación de las oncoproteínas virales E6 y E7. La proteína E7 se une al gen supresor de tumor Rb y proteínas relacionadas, lo que conduce a la liberación de factores de transcripción que estimulan la proliferación celular (Davis, 1993). E6 por su parte utiliza como principal blanco a la proteína p53, y como consecuencia de esta interacción p53 es degradada por medio de ubiquitinación, evento que conduce a la inhibición de las funciones reguladoras de la proliferación de esta proteína (Schefner, 1990).

Esta información es de particular importancia en este trabajo, ya que aunque se encontró que TGF β induce modificación en la expresión de ambas proteínas (Rb y p53), es probable que en las células empleadas, ambas proteínas se encuentren mutadas. Sin embargo, se ha reportado que en el caso de la línea celular HeLa, se encuentran las dos proteínas en estado silvestre (Park, 1994), y por lo tanto podrían estar cumpliendo con sus funciones reguladoras de la proliferación .

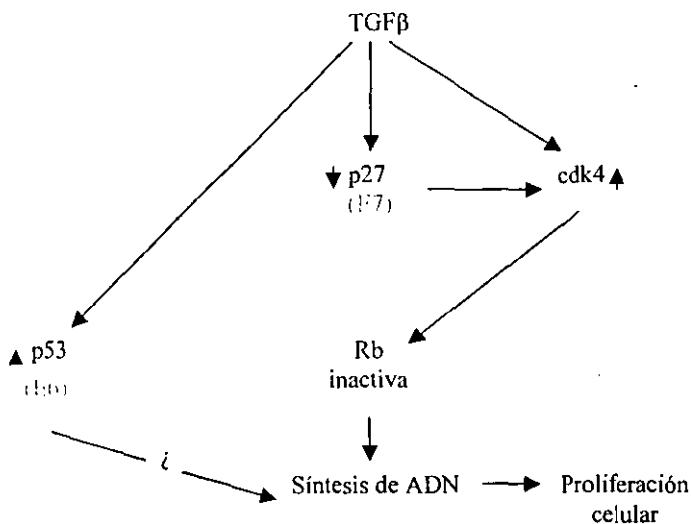
Por otra parte, es conocido que aunque la proteína E7, es capaz de inactivar a Rb, también tiene la característica de estabilizar a p53. Esta estabilización la realiza a través de la inducción de la proteína MDM2, quien a su vez induce la expresión de la proteína p53, y estabiliza al factor de transcripción E2F, que también tiene la capacidad de estabilizar p53 (Seavey, 1999). Aunado a este dato, se ha observado que la presencia de E7 en queratinocitos humanos,

conduce a una sobre-expresión del CDKI p21 (Jian, 1998), probablemente como consecuencia de la estabilización de p53 que se encarga de regularlo.

Otra molécula blanco de la oncoproteína E7 del HPV es p27, ya que se ha observado que E7 es capaz de disminuir la función del CDKI p27 y en consecuencia generar un elevado potencial de las células tumorales para mantener la proliferación celular (Zerfass, 1996).

Por último cabe mencionar que existen reportes que mencionan que la expresión del gen para TGF β puede ser modificado por la presencia de HPV, a través de la actividad de la proteína Rb (Datta, 1994). Además, Dey (1997) demostró que la actividad transcripcional del promotor para TGF β , así como la síntesis proteica del mismo es incrementada en fibroblastos NIH3T3 que han sido transfectados con la proteína E6 de HPV, en donde el TGF β tiene también actividad mitogénica.

Los datos mostrados en este trabajo sugieren que el mecanismo mediante el cual las células tumorales dejan de ser inhibidas por el TGF β , involucra proteínas reguladoras del ciclo celular, con lo cual se plantea el siguiente modelo para explicar la continua proliferación de las células tumorales.



El modelo anterior indica que en las líneas tumorales de CaCu, el TGFβ es capaz de incrementar la expresión de p53 y del cdk4, mientras que disminuye la expresión de p27. Estos eventos conducen a la inactivación de la proteína Rb, provocando con ello la excesiva proliferación celular.

CONCLUSIONES

- El TGF β induce la proliferación de las líneas celulares provenientes de CaCu CaLo, InBI y HeLa, e inhibe la proliferación de células epiteliales y fibroblásticas normales de cérvix.
- Las células CaLo, InBI y HeLa secretan TGF β , mismo que utilizan como estimulador autócrino de la proliferación celular.
- En las células tumorales CaLo, InBI y HeLa el TGF β incrementa la expresión de la proteína p53, mientras que disminuye la expresión de la proteína p27 y la proteína cdk4.
- En los fibroblastos normales de cérvix humano el TGF β disminuye la expresión de la proteína p53, mientras que se mantiene constante la expresión de la proteína p27.
- En las células tumorales CaLo, InBI y HeLa, el TGF β mantiene a la proteína Rb en estado hiperfosforilado, mientras que en fibroblastos normales Rb permanece hipofosforilado.

LITERATURA CITADA

- Amundson, S.A., Myers, T., and A. Fornace. (1998). **Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress.** *Oncogene*. 17: 3287-3299
- Baldwin, R., Friess, H., Yokoyama, M., López, M., Krobin, M., Büchler, M and M. Korc. (1996). **Attenuated ALK5 receptor expression in human pancreatic cancer: correlation with resistance to growth inhibition.** *Int. J. Cancer*, 67: 283-288.
- Bartkova, J., Lucas, J., Muller, H., Strauss, M., Guterson, B., and J. Bartek. (1995). **Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer.** *Cancer Res*. 55: 949-956.
- Bharat, B., and U. Jordan. (1992). **Human Cytokines.** Blackwell Scientific Publications. 408 pp.
- Boyd, F., and J. Massagué. (1989). **Transforming Growth Factor- β Inhibition of Epithelial Cell Proliferation Linked to the Expression of a 53-kDa Membrane Receptor.** *J. Biol Chem*. 264: 2271-2278.
- Bradford, M. (1976). **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** *Anal. Biochem*. 72: 248-254.
- 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.
- Chellappan, S., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J., and J. Nevins. (1991). **The E2F transcription factors in a cellular target for the Rb protein.** *Cell*. 65, 1053-1061.
- Coats, S., Flanagan, W., Nourse, J., and J. Roberts. (1996). **Requirement of p27 Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle.** *Science*. 272: 877-880.
- Coligan, E (Ed), Kruisbeek, A., Margulies, D., Shevach, E., and W.Strober. (1992). **Current Protocols in Immunology.** Wiley Interscience. 7.12.1.

- Cui, W., Fowles, D., Bryson, S., Duffi, E., Ireland, E., Balmain, A., and R. Akhurst. (1996). **TGF beta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice.** *Cell*. 86, 531-542.
- Damell, James; Lodish, Harvey; y David Baltimore. 1994. **Molecular Cell Biology.** (Second Edition). Scientific American Books. England.
- Datta, P., and S. Bagchi. (1994). **Repression of transforming growth factor beta 1 promoter by the adenovirus oncogene E1A. Identification of a unique GC-rich sequence as a target for E1A repression.** *J. Biol. Chem.* 269:25392-25399.
- Datto, M., Frederick, J., Pan, L., Borton, A., Zhuang, Y., and X. Wang. (1999). **Targeted Disruption of Smad3 Reveals an Essential Role in Transforming Growth Factor β -Mediated Signal Transduction** *Mol. Cell. Biol.* 19: 2494-2504.
- Datto, M., Li, Y., Panus, J., Howe, D., Xiong, Y., and F. Wang. (1995). **Transforming growth factor β induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 5545-5549
- Davis, R., Hicks, R., Crook, T., Morris, J., and K. Vousden. (1993). **Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation.** *J. Virol.* 67: 2521-2528.
- Dey, A., Atcha, I., and S. Bagchi. (1997). **HPV16 E6 Oncoprotein Stimulates the Transforming Growth Factor β 1 Promoter in Fibroblasts through a Specific GC-Rich Sequence.** *Virology.* 228: 190-199.
- Di Leonardo, A., Linke, S., Clarkin, K., and M. Wahl. (1994) **DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long term induction of Cip1 in normal human fibroblasts.** 8, 2540-2551.
- Donnellan, R., and C. Runjan. (1999). **Cyclin E in human cancers.** *FASEB J.* 13: 773-780.
- Dürst, M., Croce, C.M., Grissmann, L., Schwartz, E., and K. Huebner. (1987). **Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:* 80: 3812-3815.

- Eppert, K., Scherrer, H., Ozcelik, H., Pirone, P., Hoodless, H., Kim, H., Tsui, L., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I., Thomsen, G., Wrana, J., and L. Attisano. (1996). **MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma.** *Cell.* 86: 543-552.
- Esposito, V., Baldi, A., De Luca, A., Groger, A., Loda, M., Giordano, G., Caputi, M., Baldi, F., Pagano, M., and A. giordano. (1997). **Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer.** *Cancer. Res.* 57: 3381-3385.
- Ewen, M., Oliver, C., Sluss, H., Miller, S., and D. Peeper. (1995). **P53-Dependent repression of CDK4 translation in TGF- β -induced G₁ cell-cycle arrest.** *Genes. Dev.* 9:204-217.
- Ewen, M., Sluss, K., Whitehouse, L., and D. Livingston. (1993). **TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest.** *Cell.* 74, 1009-1020
- Farley, J., Gray, K., Nycum, L., Prentice, M., Birrer, M., and S. Jakowlew (2000). **Endocervical Cancer Is Associated with an Increase in the Ligands and Receptors for Transforming Growth Factor - β and a Contrasting Decrease in p27.** *Gynecologic Oncology.* 78: 113-122.
- Fearon, E., and B. Vogelstein. (1990). **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** *Cell.* 61: 759-767.
- Filmus, J., Zhao, J., and R. Buick. (1992). **Overexpression of H-ras oncogene induces resistance to the growth-inhibitory action of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1) and alter the number and type of TGF-beta 1 receptors in rat intestinal epithelial cell clones.** *Oncogene* 7: 521-526.
- Florenes, V., Maelandsmo, G., Kerbel, R., Slingerland, J., Nesland, J., and R. Holm. (1998). **Protein Expression of the Cell-Cycle Inhibitor p27^{Kip1} in Malignant Melanoma.** *Am. J. Pathol.* 153: 305-312.
- Franco E. (1991). **Viral etiology of cervical cancer. A critique of the evidence.** *Rev. Infect Dis.* 13: 1195.
- Franco E. (1993). **Human Papillomavirus and The Natural History of Cervical Cancer.** *Highligts from: Infections in Medicine.* 10.

- Freng, X. and R. Derynk. (1996). **Ligand-independent Activation of Transforming Growth Factor (TGF β) Signaling Pathways by Heteromeric Cytoplasmic Domains of TGF β Receptors.** J. Biol. Chem. 271: 13123-13129.
- Geng, Y. and A. Weinberg. (1993). **Transforming growth factor beta effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 10315-10319
- Gerwin, B., Spillare, E., Forrester, K., Lehman, T., Kispert, J., Welsh, A., Pfeifer, A., Lechner, J., Baker, S., and B. Vogelstein. (1992). **Mutant p53 an indece tumorigenic conversion of human bronxhial epithelial cells and reduce their responsiveness to a negative growth factor, transforming growth factor beta 1.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 2759-2763.
- Gilles, C., Polette, M., Piette, J., Munaut, C., Thompson, W., Birembaut, P., and J. Foidart. (1996). **High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells.** Int. J. Cancer. 65: 209-213.
- Gold, I., Saxena, B., Mitta, K., Marmor, M., Goswami, S., Nactigal, L., Kore, M., and R. I. Demoupoulos. (1994). **Inreased expression of transformin growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action.** Cancer. Res. 54: 2347-2358.
- Hatakeyama, M., Brill, J., Fink, G., and A. Weinberg. (1994). **Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein.** Genes Dev. 8: 1759-1771.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., and P. Djike. (1997). **TGF β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.** Nature. 390: 365-371.
- Hinds, P., Dowdy, S., Eaton, E., Arnold, A., and R. Weinberg. (1994). **Funtion of a human cyclin gene as a oncogene.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 709-713.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblat, M., Soussi, T., and C. Harris. (1994). **Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines.** Nucleic. Acids. Res. 22: 3551-3555.

- Horie, K., Yamashita, H., Mogi, A., Takenoshita, S., and K. Miyazono. (1998). **Lack of transforming Growth Factor- β Type II Receptor Expression in Human Retinoblastoma.** *Cells. J of Cell Physiol.* 175: 305-313.
- Huang, J., Yee, J., Shew, J., Chen, P., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E., and W. Lee. (1989). **Suppression of Neoplastic Phenotype by Replacement of the RB Gene in Human Cancer Cells.** *Science.* 242: 1563-1566.
- Hunter, T., and J. Pines. (1994). **Cyclins and cancer. II: Cyclins D and CDK inhibitors come of age.** *Cell.* 79: 573-582.
- Hurteau, J., Allison B., Sutton, G., Moore, D., Look, K., Jurd, W., and R. Bigsby. (1999). **Transforming Growth Factor- β Differentially Inhibits Epithelial Ovarian Carcinoma Cells from Primary and Metastatic Isolates without Up-Regulation of p21^{WAF1}.** *Cancer.* 85: 1810-1815.
- Iavarone, A. and J. Massagué. (1997). **Repression of the CDK activator Cdc25A and cell cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15.** *Nature.* 387: 417-422.
- Jayaraman, L., and C. Prives. (1999). **Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein.** *Cel. Mol. Life. Sci.* 55: 76-87
- Jian, Y., Schmidt-Grimminger, V., Chen, X., Wu, T., Broker, R. and T. Chow. (1998). **Post-transcriptional induction of p21^{cip1} protein by human papillomavirus E7 inhibits unscheduled DNA synthesis reactivated in differentiated keratinocytes.** *Oncogene.* 17:2027-2038.
- Jones D., and K. Münger. (1997). **Analysis of the p53-Mediated G₁ Growth Arrest Pathway in Cells Expressing the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein.** *J. Virol.* 71:2905-2912.
- Kamesaki, H., Nishizawa, K., Michaud, G., Cossman, J., and T. Kiyono. (1998). **TGF β_1 Induces the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27^{Kip1} mRNA and Protein in Murine B Cells.** *J. Immunol.* 160: 770-777.
- Keyomarsi, K., Conte, D., Toyofuki, W., and M. Fox. (1995) **Deregulation of cyclin E in breast cancer.** *Oncogene.* 11: 941-950

- Kleeff, J., Maruyama, H., Friess, H., Büchler, M., Falb, D., and M. Korc. (1999). **Smad6 Suppresses TGF- β -Induced Growth Inhibition in COLO-357 Pancreatic Cancer Cells and is Overexpressed in Pancreatic Cancer.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255: 268-273.
- Kloen, P., Gebhardt, M., Perez, A., Springfield, D., Gold, L., and H. Mankin. (1997). **Expression of Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Isoforms in Osteosarcomas.** *Cancer.* 12: 2230-2239.
- Koff, A., Masahiko, O., Poliak, K., Roberts, J., and J. Massagué. (1993). **Negative regulation of G1 mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta.** *Science.* 260: 536-539.
- Komiya, T., Hosoo, Y., Hirashima, T., Masuda, N., Yasumitsu, T., Nakagawa, K., Kikui, M., Ohno, A., Fukuoka, M., and I. Kawase. (1997). **p21 Expression as a Predictor for Favorable Prognosis in Squamous Cell Carcinoma of the Lung.** *Clin. Cancer. Res.* 3: 1831-1835.
- Korchynskiy, O., Landstrom, M., Stoika, R., Funai, K., Heldin, C., Duke, P., and S. Souchelnytskyi. (1999). **Expression of SMAD proteins in Human Colorectal Cancer.** *Int. J. Cancer.* 82: 197-202.
- Kovacs, E., and L. DiPietro. (1994). **Fibrogenic cytokines and connective tissue production.** *FASEB J.* 8: 954-860.
- Kretzschmar, M. and Massagué, J. (1998). **SMADs: mediators and regulators of TGF β signaling.** *Curr. Op. in Genet & Develop.* 8: 103-111.
- La Thangue, N. (1994). **DRTF1/E2F an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control.** *Trends Biochem. Sci.* 19: 108-114.
- Lagna, G. Hata, A. Hemmati, B and Massagué, J. (1996). **Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways.** *Nature* 383: 832-836.
- Laiho, M., De Carpio, J., and J. Massagué. (1990). **Growth Inhibition by TGF β Linked to Suppression of Retinoblastoma Protein Phosphorylation.** *Cell.* 62: 175-185.

- Landesman, Y., Bringol, F., Milne, D., and D. Week. (1997). **Modifications of p53 Protein and Accumulation of p21 and gadd45 mRNA in TGF β 1 Growth Inhibited Cells.** *Cell Signal.* 9: 291-298.
- Lee, M., Reynisdottir, Y., and J. Massagué. (1995). **Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution.** *Genes Dev* 9:639-649.
- Levine, A. (1992). **The p53 Tumour Suppressor Gene and Product.** *Cancer Surveys.* 12: 59-79
- Levine, A. (1997). **p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division.** *Cell.* 88: 323-331.
- Levine, A., Momand, J., and C. Finlay. (1991). **The p53 tumour suppressor gene.** *Nature.* 351: 453-456.
- Lewin, Benjamin. (1994). **Genes V.** Oxford University Pres and Cell Press. Oxford U.S.A.
- Lipinski, M., and J. Tyler. (1999). **The retinoblastoma gene family in differentiation and development.** *Oncogene.* 18: 7873-7882.
- López Casilla, F., Wrana,, J., and J. Massagué. (1993). **Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling recptor.** *Cell.* 73: 1435-1444.
- Lu, S., Kawabata, M., Imamura, T., Miyazono, K., and Y. Yuasa. (1999). **Two Divergent Signaling Pathways for TGF β Separated by a Mutation of Its Type II Receptor Gene.** *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 259: 385-390.
- Lu, Z., Friess, H., Graber, H., Guo, X., Schilling, M., Zimmermann, A., Dorc, M., and M.W. Buchler. (1997). **Presence of two signaling TGF-beta receptors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage.** *Dig. Dis. Sci.* 42: 2054-63.
- Luo, Y., Hurwitz, J., and J. Massagué. (1995). **Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1.** *Nature:* 375: 159-161.
- Lyons, R. and Mosses. H. (1990). **Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation.** *Eur. J. Biochem.* 187: 467-473.

- Maelandsmo, G., Holm, R., Fodstad, O., Kerbel, R., and V. Florenes. (1996). **Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 In malignant melanoma reduce expression in metastatic lesions.** *Am. J. Phatol.* 149: 1813-1822.
- Manning, A., Williams, A., Game, S., and C. Paraskeva (1991). *Oncogene.* 6: 1471-1476.
- Marhin, W., Hei, Y., Chen, S., Jiang, Z., Gallie, B., PhillipsR., and L.S. Penn, (1996). **Loss of Rb and Myc activation co-operate to supress cyclin D1 and contribute to transformation.** *Oncogene.* 12: 43-52.
- Marigo, V., Volpin, D., Vitale, G., and G. Bresan. (1994). **Identification of a TGF-beta responsive element in the human elastin promoter.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 1049-1056.
- Massagué, J. (1990). **The transforming growth factor-beta family.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597-641.
- Massagué, J. (1998). **TGF- β Signal Transduction.** *Ann. Rev. Biochem.* 67: 753-791.
- Matsushita, M., Matsuzaki, K., Date, M., Nakagawa, T., Amoh, Y., Takemoto, H., Kubota, Y., Seki, T., Sawamura, T., Okamura, A., and K. Inoue. (1999). **Down-regulation of TGF β receptors, in human colorectal cancer: implications for cancer development.** *Br. J Cancer:* 80: 194-205.
- Meager, A. (1991). **Cytokynes.** Ed. Prentice Hall. USA. 280. pp 1-8.
- Meek, D. (1998). **Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53.** *Cell Signal.* 10, 159-166
- Milner, J., Medcalf, E., and A. Cook. (1991). **Tumor supresor p53: análisis of wild type and mutant p53 complexes.** *Mol. Cell. Biol.* 11: 12-19.
- Mire-Sluis, A., and R. Torpe. (1998). **Cytokynes.** Ed. Academic Press. USA. Pp335-351.
- Miyazono, D., Ichijo, H., and C. Heldin. (1993). **Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors.** *Growth Factors.* 8: 11-22.
- Monroy, A., Rangel, R., Rocha, L., Trejo, C., Ramirez, J., Darío, R., and B.Weiss. (1992). **Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1.** *Oncología.* 7:69-76.

- Morgan, D. (1996). **The dynamics of cyclin dependent kinase structure.** *Curr Opin Cell Biol.* 8:767-772.
- Münger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J., and P. Howley. (1992). **Interactions of HPV E6 and E7 Oncoproteins with Tumour Suppressor Gene Products.** *Cancer Surveys.* 12: 197-217.
- Münger, K. (1995). **The Molecular Biology of Cervical Cancer.** *J of Cell Biochem. Suppl.* 23: 55-60.
- Muto, T., Bussey, H., and B. Morson. (1975). *Cáncer.* 36: 2251-2270.
- Nathan, C., and M. Sporn. **Cytokines in Context.** (1991). *J. Cell. Biol.* 113:981-986.
- Nevins J. R. (1998). **Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families.** *Cell Growth Differ.* 9: 585-593.
- Park, D., Wilczynski, S., Paquette, R., Miller, C., and P. Koeffler. (1994). **p53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma.** *Oncogene.* 9: 205-210.
- Peter, M., and I. Herskowitz. (1994). **Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle.** *Cell.* 79: 181-184.
- Pines, J., and T. Hunter. (1994). **Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age.** *Cell.* 79:573-582
- Polyak, K. (1996). **Negative regulation of cell growth by TGF β .** *Biochem. Biophys. Acta.* 1242: 185-199.
- Polyak, K., Kato, J, Solomon, M., Sherr, C., Massague. J., Roberts, J.M., and A. Koff. (1994). **p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest.** *Genes Dev.* 8: 9-22.
- 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.
- Rangel R., Ramirez J., Rocha L., Monroy.A., Martinez.R., and B.Weiss. S. (1993). **Establecimiento y caracterización de la línea celular CaLo y del Clon KaLo Obtenidos a partir de un carcinoma de cérvix y efecto de IL-2, IL-3, GM-CSF, M-CSF, TNF α e IFN γ sobre su proliferación.** *Rev. Inst Nal Cancerol (Mex).* 39:1861-1866.

- Reiss, M., and M Barcellos-Hoff. (1997). **Breast Cancer Res Treat. Transforming growth factor-beta in breas cancer: a workin hypotesis.** 45: 81-95.
- Reiss, M., Vellucci, V., and L. Zhou. (1993). **Mutant p53 Tumor Suppressor Gene Causes Resistance to Transforming Growth Factor β_1 in Murine Keratinocytes.** *Cancer Res.* 53: 899-904
- Reynisdóttir, I., and J. Massagué. (1997). **The subellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2.** *Genes Dev.* 11: 492-503
- Reynisdóttir, I., Polyak, K., Iavaronne, A; and J. Massague. (1995). **Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta.** *Genes. Dev.* 9: 1831-1845
- Riggins, G., Kinzler, K., Vogelstein, B., and S. Thiagalingam. (1997). **Frecuency of Smad gene mutations in human cancers.** *Cancer Res.* 57: 2578-2580.
- Sambrook, J., Fritsh, e., Maniatis, T. (1989). 2a ed. **Molecular Clóning. A Laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1. Cap.7.
- Santin, A.D., Hermonat, P.L,m Hiserodt, J.C., Fruehauf, J., SchranzV., Barclay, D., Percorelli, s., and G.P. Parham. (1997). **Differential transforming growth factor-beta secretion in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix.** *Gynecol Oncol.* 64: 477-480.
- Savage, C., Das, P.,, and A. Finelli; (1996). **Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 790-794.
- Scheffner, M., Werness, B., Huibregtse, J., Levine, A., and P. Howley. (1990). **The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.** *Cell.* 63: 1129-1136.
- Schmitz, M., Hendriks, D., Farley, J., Taylor, R., Geradts, J., Rose, S., and J. Birrer. (2000). **p27 and Cyclin D₁ Abnormalities in uterine Papillary Serous Carcinoma.** *Ginecol. Oncol.* 77: 439-445.
- Schneider, E., Montenarh, M., and P. Wagner. (1998). **Regulation of CAK kinase activity by p53.** *Oncogene.* 17: 2733-2741

- Seavey, S., Holubar, M., Saucedo, L., and E. Perry. (1999). **The E7 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Stabilizes p53 through a Mechanism Independent of p19^{ARF}**. *J. of Virol.* 73:7590-7598.
- Serra, R., and H. Moses. (1996). **Tumor suppressor genes in the TGF-beta signaling pathway?**. *Nature Med.* 2: 390-391.
- Sgambato, A., Zhang, Y., Ciaparrone, M., Soh, J., Cittadini, A., Santella, R., and B. Weinstein. (1998). **Overexpression of p27^{Kip1} Inhibits the Growth of Both Normal and Transformed Human mammary Epithelial Cells**. *Cancer Res.* 58: 3448-3454.
- Sherr, J. (1994). **G1 phase progression: cycling on cue**. *Cell.* 79: 551-554.
- Sia, R., Herald, A., and D. Lew. (1996). **Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast**. *Mol Biol Cell.* 7:1657-1666.
- Sionov, R., and Y. Haupt. (1999). **The cellular response to p53: the decision between life and death**. *Oncogene.* 18: 6145-6157.
- Skomedal, H., Krisensen, G., Kathrine, A., and R. Holm. (1999). **Aberrant Expression of the Cell Cycle Associated Proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, Cyclin D1, RB and EGFR in Cervical Carcinomas**. *Gynecol. Oncol.* 73: 223-228.
- Sporn, M.B., and A. Roberts. (1988). **Peptide growth factors are multifunctional**. *Nature.* 332:217-219.
- Stanley, M., and K. Parkinson. (1979). **Growth Requirements of Human Cervical Epithelial Cells in Culture**. 24: 407-414.
- Tan, P., Cady, B., Wanner, M., Worland, P., Cukor, B., Magi-Galluzzi, C., Lavin, P., Draetta, G., Pagano, M., and M. Loda. (1997). **The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a, b) invasive breast carcinomas**. *Cancer Res.* 57: 1259-1263.
- Toguchida, J., Ishizaki, K., Sasaki, M., Nakamura, K., Ikenaga, M., Katto, M., Sugimoto, M., Kotoura, Y., and T. Yamamoto. (1989). **Preferential mutation of paternally derived RB gene as the initial event in sporadic osteosarcoma**. *Nature.* 338:156-158.
- Toyoshima, H., and T. Hunter. (1994). **p27 a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21**. *Cell.* 78, 67-74.

- Whitaker, L., and Hanser. (1997). **Induction of apoptosis in Mv1Lu cells by expression of competitive RB mutants.** 15: 1069-1077.
- Wolf, D., Harris, N., and V. Rotter. (1984). **Reconstitution of p53 Expression in Nonproducer Ab-MuLV- Transformed Cell Line by Transfection of a Functional p53 Gene.** Cell. 38: 119-126.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and D. Beach. (1993). **p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.** Nature. 366, 701, 704. (A)
- Xiong, Y., Zhang, H., and D. Beach. (1993). **Subunit rearrangement of the cyclin-dependet kinases is associated with cellular transformation.** Genes Dev. 7: 1572-1583. (B).
- Zentella, A., Weiss, F., Ralph, D., Laiho, M., and J. Massagué. (1991). **Early responses to TGFb in cells lacking growth suppressive RB function.** Mol. Cell. Biol. 11: 4952-4958.
- Zerfass- Thome, K., Zwerschke, V., Mannhardt, b., Tindle, R., Botz, J., and P. Jansen-Durr. (1996). **Inactivation of the cdk inhibitor p27 KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein.** Oncogene. 13: 2313-2330.

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

APENDICE

1) Composición del RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. U.S.A).

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

2) Tripsina.

La enzima tripsina es utilizada para la disgregación enzimática, así como remover los fibroblastos y epitelios adheridos a las cajas 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.

3) 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 (Sigma Chemical Co. U.S.A).
Cloruro de sodio	8.00 g (Sigma Chemical Co. U.S.A).
Cloruro de potasio	0.40 g (Sigma Chemical Co. U.S.A).
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA)	0.40 g (Sigma Chemical Co. U.S.A).

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.

4. Determinación de desmogleina.

Con el propósito de determinar la presencia de Desmogleina (DG-1) en las células normales y con ello determinar su origen epitelial o fibroblástico, las diferentes biopsias de cérvix procedentes de resiembras 2 y 3 fueron cultivadas en placas de plástico, y fijadas con metanol-acetona en proporción 1:1, posteriormente las células fueron lavadas con PBS libre de calcio y magnesio. Una vez concluido este procedimiento, se adicionó a las células el anticuerpo monoclonal anti DG-1 acoplado a fluoresceína. La evaluación se realizó por observación al microscopio de fluorescencia (Monroy, 1992) y se determinó que los cultivos de fibroblastos solo presentaban tinción en un 2%, mientras que los de células epiteliales presentaban tinción en un 98%.

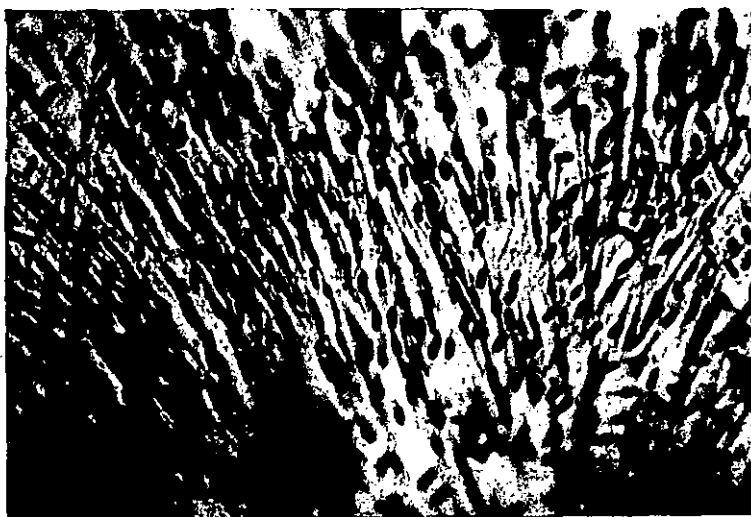


Figura que muestra cultivos de fibroblastos de cérvix en crecimiento exponencial.

5) Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Se usa para mantener las células en condiciones fisiológicas estables durante períodos 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	(Sigma Chemical Co. U.S.A).
Cloruro de calcio	0.1 g	(Sigma Chemical Co. U.S.A).
Cloruro de sodio	8.0 g	(Sigma Chemical Co. U.S.A).
Cloruro de potasio	0.2 g	(Sigma Chemical Co. U.S.A).
Fosfato monoácido de sodio	2.16 g	(Sigma Chemical Co. U.S.A).
Fosfato diácido de potasio	0.2 g	(Sigma Chemical Co. U.S.A).

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.

6 y 8) Solución Amortiguadora de Carbonatos y Solución Amortiguadora de Citratos.

Ambas soluciones son utilizadas para el ensayo de ELISA, la primera es utilizada para adherir el antígeno a la placa de ELISA, y la segunda se utiliza como sustrato para revelar la reacción.

La composición de los reactivos es la siguiente:

Solución Amortiguadora de Carbonatos:

Carbonato de Sodio	1.52g
Carbonato Acido de Sodio	2.93g

Nitrato de Sodio 0.20g

Los reactivos anteriores se utilizan para preparar un litro de solución a un pH de 9.5.

Solución Amortiguadora de Citratos:

Acido cítrico 2.1g

Fosfato ácido de sodio 7.96g

Los reactivos anteriores se utilizan para preparar 100ml de solución a pH de 5.6.

7) Solución de TBS

La solución se emplea para lavados tanto en el ensayo de ELISA como en el Western Blot, su composición es la siguiente:

Tris-base 20 mM (3 g)

NaCl 137 mM (8 g)

KCl (0.2 g)

Ajustar el pH a 8.0 con HCl 1M. Llevar a 1 litro con agua destilada.

9) Cuantificación des proteínas.

Para la cuantificación de proteínas es necesario realizar una curva patrón de albúmina, partiendo de una concentración de 1mg/ml, la cual se mezcla con agua de acuerdo con la siguiente proporción.

Albúmina (μl)	Agua (μl)	Concentración final de albúmina en 1ml de solución
0	1000	0 $\mu\text{g/ml}$ (Blanco)
2	998	2 $\mu\text{g/ml}$
5	995	5 $\mu\text{g/ml}$
10	990	10 $\mu\text{g/ml}$
15	985	15 $\mu\text{g/ml}$
20	980	20 $\mu\text{g/ml}$

Para el caso de las muestras se toman 4 μl de proteína extraída y se lleva a un volumen final de 1000 μl de agua.

A continuación a todas las mezclas se les extraen 200 μl de líquido y se sustituyen por 200 μl del reactivo de Bradford, y se mide la absorbancia de cada tubo a 590nm.

La concentración de proteínas de las muestras, se interpola en una regresión lineal mediante la ecuación de la recta de acuerdo con los datos obtenidos de la curva patrón (Bradford, 1976).

10) Solución Amortiguadora de Fosfatos (Buffer AP)

Se utiliza en la reacción de revelado del Wester Blot. La preparación para 100 ml de volumen final es la siguiente:

Tris 1M pH 9.5	10 ml
NaCl 5M	2 ml
Mg Cl 1M	0.5 ml

11) Reveladores NBT y BCIP

Se utilizan como sustratos en el momento de revelar el Western Blot. Su preparación es la siguiente:

NBT (Azul de Tetrazolium). Tóxico

Disolver 50 mg de NBT en una solución de dimetil-formamida al 70% en agua destilada. Posteriormente se hacen alícuotas de 100 μ l y el reactivo se almacena a -20°C .

BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato). Tóxico

Disolver 50 mg de BCIP en 1 ml de dimetil-formamida. Hacer alícuotas de 100 μ l y almacenar a -20°C .

12) Agua DEPC

El agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), se utiliza como agua de uso en los ensayos de extracción y evaluación de ARN, ya que el DPC elimina las RNAsas presentes en el agua. Para prepararla se miden 2 ml de DPC y se agregan a 998 ml de agua. La mezcla se mantiene en agitación durante toda la noche, y posteriormente se esteriliza.

13) Solución amortiguadora SSC

Disolver 175.3gr de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de agua. Ajustar el pH a 7.0.

Ajustar el volumen a 1 litro y esterilice por autoclave.

14) Solución de Denhardt.

Disolver 5 g de Ficoll (tipo 400), 5 de polivinilpirrolidona y 5 g de albúmina bovina en agua.

Ajustar a 500 ml y filtrar con membranas de 0.40 μ m y conservar a -20°C .

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
CaCu	Cáncer Cérvico-uterino
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclina
CDKI	Inhibidor de cinasa Dependiente de Ciclina
CSF	Factor Estimulante de Colonias
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
G ₀	Fase G ₀ del ciclo celular
G ₁	Fase G ₁ del ciclo celular
G ₂	Fase G ₂ del ciclo celular
HPV	Papiloma virus humano
IL-1	Interleucina 1
kDa	kilodaltones
LAP	Péptido Asociado a la Latencia
M	Fase de mitosis del ciclo celular
MC	Medio Condicionado
μg	micro-gramos
ng	nano-gramos
PCNA	Antígeno Nuclear de Células en Proliferación
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
pg	pico-gramos
Rb	Proteína del Retinoblastoma
RPMI	Medio de Cultivo
S	Fase de Síntesis de ADN.
SFB	Suero Fetal Bovino
TβRI	Receptor para TGFβ tipo I
TβRII	Receptor para TGFβ tipo II
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante tipo beta
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
μCi	micro-Curies