



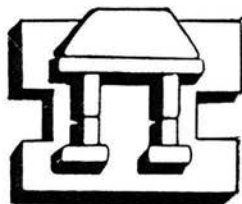
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**SOBRENADANTES PROVENIENTES DE CULTIVOS
DE CELULAS TUMORALES (CaLo, InBl y HeLa)
INDUCEN ADHERENCIA CELULAR *IN VITRO* Y SU
RELACION CON EL TNF α**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
CUAUHTEMOC ESPINOSA MANZO

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



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO,

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente estudio, se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM bajo la dirección del M. en C. Luis Sánchez Sánchez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Rafael Espinoza Madrigal y Maria Remedios Manzo Briseño. Por su guía, cariño y apoyo incondicional para este trabajo.

A mis hermanos: Rafael, Paty, Lalo, Susana, Gustavo, Blanca, Gerardo. Por estar siempre conmigo cuando los necesito.

A mis sobrinos: Cesar, Tobias, la Nena, el Casper, el Nene, la bola y Sergio, además a su hija Alejandra (el gato relamido), la nera, a Karina, a Erick a Nataly, a Linda (la cata) y a Miriam (la catarinita)

A mis cuñados: Ricardo, Gricelda, Marieta, a Max (el garfield), a Beatriz (la piry), a Pedro, al Quique (el confitón).

A mis los compañeros de laboratorio: Magali, Hugo, Vicente, Sara, sandra Vicki. Gisela, pero en especial a Fernando flores (el cucu), por la ayuda incondicional que me presta cuando lo necesito, y a Gerardo por instruir algunas técnicas de computación para la elaboración de este trabajo.

Al doctor Benny Weiss por ser pionero de este laboratorio

Al Maestro en Ciencias Luis Sánchez Sánchez, por su paciencia y por ser guía de este trabajo.

A la Doctora en Ciencias Rebeca López por su valiosa ayuda y por enseñarme un poquito de su conocimiento.

A Tony por sus enseñanzas.

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)	5
Características moleculares del TNF- α	5
Efectos del TNF- α sobre células fibroblásticas	6
Efectos del TNF- α sobre células endoteliales	8
Efectos del TNF- α sobre células tumorales	9
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACION	13
HIPOTESIS	14
OBJETIVOS GENERALES	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
MATERIAL Y METODOS	16
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS	38

ABREVIATURAS

Ab	anticuerpo
Ag	antígeno
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATCC	compañía American Type Culture Collection
[β - ³ H]dTTP	Desoxirribonucleótido de Timina marcado con el isótopo tritio de emisión de partículas beta (análogo de la pirimidina Timina)
Ca	cálcio
CaCu	Cáncer Cérvico-uterino
CAMs	Moléculas de adhesión célula- célula
Cpm	cuentas por minuto (unidad de lectura para el contador de centelleo)
ECAM	Molécula de adhesión extracelular
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
ELAM	Molécula de adhesión extracelular de leucocitos
ELISA	Inmunoensayo acoplado a una enzima
FEC-GM	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
g	gravidades
h	hora
HPV	Virus del Papiloma Humano
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN- γ	Interferón gama
IL-1 β	Interleucina uno beta
IgG	Inmunoglobulina de isotipo G (anticuerpo con cadena pesada γ)
KD	Kilo Daltones
LPS	Lipopolisacáridos
LTC	Linfocitos T Citotóxicos
mAb	anticuerpo monoclonal
MC	medio condicionado

MCC s/s	medio condicionado concentrado sin suero
Mg	magnesio
μg	microgramos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
μ L	microlitros
mL	mililitro
N	Normal
NFkappaB	Factor nuclear kappa beta
NK	Células asesinas naturales
nm	nanómetros (medida de longitud de onda)
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pmoles	picomoles
RL	Leucorregulina
RPMI-1640	Medio nutritivo 1640 (Roswell Park Memorial Institute)
rpm	revoluciones por minuto
SAMs	Moléculas de adhesión célula sustrato
SFB	Suero Fetal de Bovino
SSV	Solución Salina de Verseno
(v/v)	dilución porcentual volumen/volumen
(w/v)	dilución porcentual masa/volumen
TC	Células citotóxicas
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TH ³	timidina tritiada
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares

RESUMEN

La regulación de la división celular, es un mecanismo de suma importancia en el control de la progresión del ciclo celular en células normales. Tal regulación ocurre por la participación de citocinas o factores de crecimiento que inducen la progresión o detención del ciclo. La citocina proinflamatoria TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa) ha sido descrita como un fuerte inhibidor de la proliferación de células normales, así como de carcinomas humanos, sin embargo se han encontrado carcinomas que muestran resistencia a tal inhibición por esta citocina. En el caso del cáncer cervicouterino (CaCu) no es claro el papel que juega el TNF- α sobre la proliferación y adhesión celular. En este trabajo se encontró que las células tumorales provenientes del cérvix humano CaLo, InBI y HeLa, son capaces de secretar el factor de necrosis tumoral (TNF- α) de manera activa en cantidades de picogramos, que al ser bloqueado con anticuerpos neutralizantes se observó una disminución en el número celular, sugiriendo que dicho factor participa en el potencial proliferativo de dichas células. Por otro lado, se encontró que los sobrenadantes provenientes de cultivos de las células tumorales CaLo, InBI y HeLa inducen adherencia celular en cocultivos de células endoteliales provenientes de cordones umbilicales humanos y de la línea celular promielomonocítica U937, que al ser tratadas con anticuerpos neutralizantes contra TNF- α , tal adhesión celular se ve disminuida, indicando que el TNF- α secretado por las células de CaCu no sólo participan en el potencial proliferativo de tales células sino que además inducen adherencia celular que podrían estar utilizando dentro del mecanismo que promueve el desarrollo de tumores secundarios (metastasis). Tales resultados permiten proponer al TNF- α como uno de los factores en estudio para posibles aplicaciones terapéuticas contra la generación de una metástasis.

INTRODUCCION

En una célula eucarionte normal, el desarrollo del ciclo celular está regulado por un amplio espectro de factores de crecimiento o moduladores biológicos (Meager, 1991; López-Marure, 1997). Tales factores son secretados por múltiples tipos celulares, tanto normales como transformados (Lange *et al.*, 1992; Margni, 1996; Roitt, *et al.*, 1998). Entre la mayoría de los moduladores de la proliferación celular destacan las citocinas, factores que generalmente presentan una naturaleza glicoproteica y son fuertemente solubles (Meager, 1991; Janeway-Travers, 1997; Roitt *et al.*, 1998). Tales moduladores ejercen su actividad de manera autócrina, parácrina o endócrina, intervienen en una fase determinada del ciclo celular, son capaces de regular la diferenciación, la activación y la proliferación de varios tipos celulares y comúnmente presentan actividad pleiotrópica (diferentes citocinas son capaces de inducir el mismo efecto biológico), circulan por los fluidos corporales, actúan a concentraciones extremadamente bajas (en niveles de picogramos), tienen un tiempo de vida media muy corta y ejercen su efecto en determinadas células blanco al interactuar con receptores de membrana específicos (Carl-Henrik, & Bengt, 1989; Meager, 1991; Bendzten, 1994; Abbas, 1996; Alberts, 1996; Chávez, 1997; Regueiro & López, 1998).

Se ha reportado la existencia de una cantidad significativa de citocinas o factores que regulan de manera negativa la división celular, sin embargo sólo algunas han sido purificadas y estudiadas a nivel molecular, estas son: la Interleucina-1 Beta (IL-1 β), el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), el Interferón gama (INF γ), la interleucina 2 (IL-2), y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), éste último es uno de los factores que ha sido objeto de un gran interés ya que es un mediador pleiotrópico con actividad proinflamatoria e inmunorreguladora, importante para la defensa del organismo ya que está presente en el suero de animales con infecciones sistémicas con actividad antitumoral (Carswell *et al.*, 1975). El TNF- α es un mediador primario endógeno responsable de la patogénesis de la infección, daño e inflamación; por ejemplo, es un mediador crucial en el choque séptico o endotóxico (Beutler, 1992). Paradójicamente también participa en procesos benéficos de la

defensa del organismo y en el mantenimiento de la homeostasis del tejido (Tracey et al, 1989).

Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α).

A principios de siglo, se descubrió que ciertos agentes infecciosos y sus productos presentaban efectos anticancerosos en animales; en particular, se demostró que la inyección de pequeñas cantidades de bacterias gram-negativas, vivas o muertas, podía provocar la necrosis hemorrágica de tumores de ratones: los tumores se desangraban, se oscurecían y se secaban. Posteriormente, en 1970 se identificó y se purificó el componente activo de las bacterias gram-negativas y se estableció que se trataba de un complejo de lípidos y azúcares: los lipopolisacáridos (LPS) constituyentes de la pared celular el cual estimulaba la liberación de un factor antitumoral, causante de la destrucción del cáncer. Ante los efectos que dicha citocina producía sobre los tumores, se le llamó Factor de Necrosis Tumoral o TNF por sus siglas en inglés (Lloyd, 1988).

Características moleculares del TNF α

El TNF está constituido por dos especies moleculares, el TNF- α y el TNF- β (Abbas *et al.*, 1996) sólo que el TNF- α es producido por macrófagos activados y el TNF- β por linfocitos activados (Aiyer y Aggapwal., 1988). En la actualidad se sabe que el TNF- α es la principal citocina elaborada en respuesta contra infecciones bacterianas y por agentes gram-negativos (Margni *et al.*, 1996).

El TNF- α humano es un polipéptido constituido por 157 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 17 KD, que fue aislado a homogeneidad como una glicoproteína a partir del medio condicionado de la línea celular promielocítica HL-60, la cual había sido previamente tratada con ésteres de forbol. Su estructura primaria fue determinada a partir de la proteína pura y la secuencia obtenida es idéntica a la que predice la secuencia de nucleótidos del ARNm. En su forma activa el TNF- α es un

homotrimeros unidos no covalentemente que tiene aproximadamente 45 KD y cada subunidad tiene un peso de 17 KD. Estudios cristalográficos han corroborado su naturaleza trimérica la cual resulta de un arreglo de cadenas en dos láminas β -plegadas antiparalelas. El TNF- α es muy sensible a la actividad de proteasas, perdiendo su funcionalidad biológica rápidamente, lo que sugiere una estructura terciaria poco compacta (Ibarra, 1997). El TNF- α se origina de una proteína precursora de 25 KD con un dominio hidrofóbico y otro hidrofílico, se inserta en la membrana celular y luego es modificada para originar la forma soluble de 17 KD a nivel extracelular (Abbas *et al.*, 1996; Margni *et al.*, 1996). El gen del TNF- α se sitúa en el complejo mayor de histocompatibilidad, en el brazo corto del cromosoma 6 (Chávez, 1997).

La fuente celular principal del TNF- α son las células asesinas naturales (NK), los linfocitos T, las células linfoblastoides B, los fibroblastos, las células tumorales de mama, las células tumorales de ovario y las células epidermales. El TNF- α posee actividad pro-inflamatoria e inmunorreguladora, además de inducir una gran variedad de respuestas celulares: promueve o inhibe la proliferación, induce citotoxicidad, e induce o previene la diferenciación celular. (Donato *et al.*, 1989; Marino *et al.*, 1989). *In Vitro*, estimula el crecimiento de fibroblastos normales; sin embargo, en líneas celulares transformadas inhibe la proliferación e induce citotoxicidad (Abbas *et al.*, 1996; Margni *et al.*, 1996; López Marure, 1997).

Efectos del TNF- α sobre células fibroblásticas

Se ha observado que el TNF- α induce la proliferación de fibroblastos primarios de prepucio humano (Kwon *et al.*, 1998). En las líneas celulares fibroblásticas de pulmón MRC-5 y carcinoma de mama MCF-7, han mostrado sensibilidad, resistencia a la apoptosis e inhibición de la proliferación al ser estimuladas con el TNF- α (Gerritsen *et al.*, 1998). En células endoteliales y en epitelios de traquea de rata, el TNF- α inhibe el crecimiento; no obstante en epitelios glomerulares de rata, proliferan en cultivo (Freitag *et al.*, 1996; López Marure, 1997; Yanagisawa *et al.*, 1994).

El TNF- α es una citocina que tiene un papel clave en la respuesta inflamatoria, puesto que induce un amplio espectro de actividades proinflamatorias, y ha sido implicado en varias enfermedades, entre las que destacan los procesos reumatoides (Sherry y Cerami, 1988). Un importante tejido blanco del TNF es el endotelio vascular, que por su localización estratégica en la interfase entre la sangre y los tejidos, participa en los procesos inflamatorios, incluyendo los procesos inducidos por TNF y otras citocinas.

La generación de una respuesta inmune efectiva depende de la secreción de citocinas específicas que recluten y activen células inmunes en el sitio de la infección. Los linfocitos humanos secretan constitutivamente muchas citocinas en cultivos celulares. Una de esas linfocinas es la interleucina 1 (IL-1), la cual induce una amplia variedad de reacciones inflamatorias e inmunológicas, tal como la producción de la IL-2 por las células citotóxicas (TC). Los mismos leucocitos son auto estimulados por la IL-1 para proliferar, sintetizar y secretar otras linfocinas incluyendo IL-6, la IL-8, el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (FEC-GM), y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). Cada una de estas moléculas promueve reacciones inflamatorias o inmunológicas por mecanismos específicos. El TNF- α y la IL-1 ejercen, además, una acción antiviral por medio de la represión de la expresión de los genes virales. (Berumen 1997).

Una vez activados los linfocitos T citotóxicos (LTC) proliferan, se diferencian y participan en la lisis de las células blanco por tres caminos diferentes: a) secretan perforinas y otras proteínas que perforan la membrana celular, b) liberan sustancias que inducen la muerte celular programada (apoptosis), y c) liberan citocinas como el interferón gama (IFN- γ), el TNF y la leucorregulina (RL) que limitan la actividad viral dentro de las células y atraen macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la célula. El IFN- γ y la RL inhiben la expresión de los genes virales y estimulan la expresión de las moléculas de clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad humana en los queratinocitos humanos, lo que permite una mejor presentación de los antígenos virales y con ello una respuesta inmune aumentada. La RL también aumenta

la transcripción de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la sensibilidad de las células epiteliales cervicales inmortalizadas con el virus del papiloma humano 16 (HPV16) para ser destruidas por las células asesinas naturales (NK) activadas por linfocinas (Berumen 1997).

El TNF es conocido como un inductor de moléculas de adhesión para células endoteliales; induce la expresión de las Moléculas de adhesión extracelular (ECAM) en ratones desnudos comparada con el tipo silvestre. La reconstitución con células T resta la inducción del TNF- α para la inducción de las Moléculas de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) en ratones desnudos, estos resultados indican que los linfocitos circulantes son moduladores del incremento de la expresión de ECAM facilitada por el TNF- α .

Las citocinas proinflamatorias tales como el INF- γ y el TNF- α inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y promueven la trans migración de leucocitos a las células endoteliales, sin embargo, cuando se administran juntas paradójicamente, la trans migración de leucocitos disminuye.

Efectos del TNF- α sobre células endoteliales

La célula endotelial juega un importante papel en la regulación de la permeabilidad e integridad de los vasos sanguíneos, consecuentemente una alteración en la función de estas células modifica las características morfológicas y funcionales de la vasculatura (Bevilac et al, 1986). Se han realizado análisis por citometría de flujo que demuestran que las células endoteliales presentan los dos tipos de receptores para el TNF (Slovin et al, 1998), por lo que se supone que este factor puede mediar sus efectos sobre la célula endotelial. El TNF- α produce efectos que pueden ser importantes en el proceso proinflamatorio y de neo-vascularización (Haliday et al, 1991). Además de que induce la expresión de moléculas de adhesión celular.

Las células endoteliales forman una capa continua que recubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos. La membrana basal sobre la cual se localizan consiste principalmente de laminina, colágena tipo IV y sulfato de heparina. Estas

células controlan el intercambio de metabolitos entre el torrente sanguíneo y los tejidos, y participan en ciertas respuestas biológicas. Durante la reacción inflamatoria e inmune, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 beta (IL-1- β) y el interferón gama (IFN- γ), alteran la función de las células endoteliales provocando cambios morfológicos y bioquímicos llamados "activación" (Pober, 1988), y por lo tanto representan un modelo útil para estudiar este fenómeno en las células endoteliales.

En un adulto normal las células endoteliales están en un estado latente con una actividad metabólica muy baja (Risau, 1995), a estas células se les identifica como tejido constitutivo; sin embargo, éste fenotipo no es permanente ya que se puede perder cuando las células son sacadas de su microambiente. Fisiológicamente las células endoteliales salen de su estado latente cuando son activadas por diversos estímulos. Esta activación está asociada a diversos cambios fenotípicos que les permiten adaptarse a las funciones locales requeridas. Uno de estos estados de activación es inducido por endotoxinas bacterianas y citocinas como el TNF- α ó la IL-1, durante el proceso de inflamación, fenómeno que lleva a una secuencia de sucesos caracterizados por la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular, como la selectina-E o Molécula de adhesión extracelular de leucocitos (ELAM-1), ICAM-1 y VCAM-1. Estas moléculas de adhesión permiten la adhesión laxa entre leucocitos y células endoteliales facilitando la migración sobre la superficie endotelial, proceso denominado "rolling", al cual sigue la adhesión firme y la migración de leucocitos a través de la monocapa endotelial (Augustine, 1994). Se piensa que las células cancerosas podrían utilizar el mismo mecanismo para invadir otros órganos.

Efectos del TNF- α sobre células tumorales

IZT.

Se ha reportado que el TNF- α es capaz de inhibir el crecimiento de células epiteliales en cultivo, derivados de cérvix normal humano. En contraste, esta citocina estimula la proliferación de cinco líneas celulares cervicales transfectadas con ADN del HPV 16 o 18 y a siete líneas derivadas de carcinomas cervicales. La estimulación del crecimiento con el TNF- α se ve acompañado por un incremento de 6 a 10 veces de



ARNm que codifica un receptor ligando al factor de crecimiento Epidermal (EGF). (Woodworth *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha observado que el TNF- α junto con el IFN- γ (sinergismo) reduce la expresión del gene c-myc en células HeLa deteniendo la proliferación en la fase G₁ del ciclo celular (Yarden *et al.*, 1986).

El Cáncer se desarrolla cuando una célula acumula mutaciones de varios de los genes que controlan el crecimiento y supervivencia de las células. Si una mutación es irreparable, la célula afectada suele autodestruirse antes de volverse potencialmente peligrosa, pero si la célula no muere, ella o sus descendientes pueden vivir lo suficiente como para acumular mutaciones que lleven a dividirse sin control. Durante el desarrollo del cáncer cervicouterino se inducen mecanismos para evadir el sistema inmune, como son la disminución de moléculas de antígeno en el MHC 1 y la secreción de citocinas por las células tumorales. Como consecuencia de ello, la estimulación de linfocitos T citotóxicos (LTC), y cooperadores (TC), de células asesinas naturales (NK) y macrófagos es muy deficiente. Para inducir una respuesta inmune efectiva, se requiere la estimulación simultánea de múltiples componentes del sistema inmune: por vía sistémica la estimulación de LTC y TC contra epitopos del virus del papiloma humano, y en un nivel local, la inducción de la secreción de citocinas por el tumor, para aumentar el procesamiento y la presentación de blancos tumorales, así como la estimulación de los linfocitos y macrófagos que infiltran el tumor (Berumen y Villegas, 1997). Las metástasis le dan mayor propiedad a una neoplasia como maligna que cualquier otro de los atributos neoplásicos. No todos los cánceres tienen capacidad de generar metástasis. Para que las células cancerosas que se desprendieron del tumor original invadan a otros órganos sanos, es necesaria la presencia de moléculas de adhesión, que según sus capacidades se pueden agrupar en dos clases, 1) Las que permiten la unión célula-célula (CAMs), y son usualmente glicoproteínas de la membrana. 2) La adhesión célula-sustrato, es mediada por la interacción de proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos, conocidas como moléculas de adhesión célula-sustrato ó SAMs, también conocidas como integrinas (Stevenson 1992). Hasta ahora se ha demostrado que cuatro distintas familias de proteínas de membrana median la

adherencia de una célula a otra. 1) Selectinas; 2) Ciertos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF); 3) Ciertos miembros de la superfamilia de las integrinas, y 4) Cadherinas.

La mayor parte de los tumores cancerosos serian fáciles de curar mediante extirpación quirúrgica del tejido enfermo, sin embargo, la metástasis es la razón de que el cáncer sea una enfermedad tan devastadora; por eso se puede afirmar que las moléculas para adherencia desempeñan uno de los papeles más importantes de la enfermedad maligna. Es sabido que el Factor de Necrosis Tumoral alfa ($TNF-\alpha$) induce la expresión de la Selectina E, VCAM1, é ICAM; conocidas moléculas de adhesión en cultivos de células endoteliales de vena umbilical (Nakada 1998). Otro autor menciona que el $TNF-\alpha$ induce la expresión de NFkappaB; así promueve la expresión de ICAM1, VCAM1 y ELAM1 y además promueve la adhesión de monocitos en células endoteliales (Berumen 1997).

Durante el desarrollo del cáncer cervicouterino se inducen mecanismos para evadir el sistema inmune, como son la disminución de la expresión de moléculas de antígeno mayor de histocompatibilidad y la secreción de citocinas por las células tumorales (Berumen 1997).

El cáncer del cuello uterino es una enfermedad asociada a muchos factores etiológicos, pero quizá los más importantes son el virus del papiloma humano (HPV) y la acumulación de múltiples defectos del sistema inmune en el sitio del tumor (Berumen 1997).

Durante la evolución del tumor, las células tumorales adquieren nuevas lesiones genéticas que les confieren ventajas selectivas, para evadir cada vez un mayor número de mecanismos de control del sistema inmune, hasta que éste se hace ineficiente para combatir el tumor. (Berumen 1997).

Las citocinas proinflamatorias tales como el $TNF-\alpha$ y el $IFN-\gamma$ incrementan la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM y VCAM en células endoteliales y promueven la migración transendotelial de leucocitos; así mismo cuando esas citocinas se administran juntas, hay un decremento en la migración transendotelial.

Este fenómeno fue acompañado por la desaparición de la molécula de adhesión (ICAM-1) de las uniones intracelulares (Berumen 1997).

ANTECEDENTES

Actualmente, se sabe que el cáncer cervicouterino invasor inicia como una enfermedad de transmisión sexual a través del papiloma virus, el cual produce lesiones en los epitelios del aparato urogenital, tanto del hombre como de la mujer, que evolucionan lenta y progresivamente hacia el cáncer, en caso de no recibir tratamiento.

Los tumores cervicales se han constituido como la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer en el mundo (Woodworth *et al.*, 1995; Gradilone *et al.*, 1996). En nuestro país esta enfermedad ocupa el primer lugar de muerte por cáncer en la mujer y se ha estimado que fallecen por cáncer cérvico-uterino una paciente cada hora y media (Alonso, 1999; Berumen & Villegas 1997). Tal padecimiento surge generalmente en mujeres de edades entre los 25 a 65 años y una vez que lo han presentado, se estima que la sobrevivencia de una mujer con cáncer cervical es de aproximadamente 5 años (Elkas & Farias-Eisner, 1998; Gariglio *et al.*, 1998). Además del registro en el incremento gradual de esta neoplasia, al mismo tiempo ha disminuido la edad en la adquisición de dicha enfermedad, debido a que un mayor número de mujeres más jóvenes lo contraen (Hernández-Avila, *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998; Slagle *et al.*, 1998). En México se calcula que existen unos 25 millones de mujeres afectadas de alguna manera por lesiones precursoras de cáncer cervicouterino, aproximadamente el 2 por ciento de mujeres son portadoras de cáncer cervicouterino invasor y de 25 a 30 por ciento son afectadas de alguna manera con infecciones por virus del papiloma Humano (VHP), ya sea latente o activo, y el 5 por ciento por lesiones displásicas. (Alonso, 1999).

JUSTIFICACION

Pese a los resultados obtenidos hasta el momento en los estudios sobre el cáncer, la investigación básica sobre esta neoplasia ha tratado de plantear terapias alternativas, basadas en la aplicación de factores moduladores o inhibidores biológicos. Sin embargo, se ha documentado que las células tumorales no sólo se caracterizan por su división indiscriminada, sino también por la capacidad que tienen de responder a las citocinas presentes en su microambiente o inclusive a su capacidad de secretar sus propios factores de crecimiento. Hasta el momento, se han planteado algunas vías o estrategias que pretenden explicar cómo las células son capaces de obtener un estado transformado o neoplásico, el de evadir el ataque de las células inmunológicas o la capacidad de generar metástasis. Sin embargo, no es claro cuántas y cuáles citocinas son secretadas por las células tumorales, ni cuál es la función que desempeñan o su relación con el estado transformante de tales células. Por lo tanto, en el presente estudio se pretende evaluar si los MC provenientes de cultivos de células tumorales de CaCu inducen adherencia celular y si dicha se encuentra relacionada con el TNF- α . De igual manera se pretende determinar si las células tumorales de CaCu son capaces de secretar el TNF- α y si tal citocina esta relacionada con el potencial proliferativo de las células tumorales.

HIPOTESIS

Es conocido que el TNF- α se caracteriza por ejercer múltiples actividades biológicas tales como la inducción o la inhibición de la proliferación celular, la inducción de la diferenciación e incluso puede estimular acción mitogénica. Tales funciones son ejercidas dependiendo del tipo celular en el que actúa y de las condiciones microambientales existentes. Dado que las células normales y tumorales son capaces de regular su división a través de factores de crecimiento como lo es el TNF- α , es posible que las células tumorales provenientes de CaCu, CaLo, InBI y HeLa secreten esta citocina de manera activa para participar en su potencial proliferativo, así como para inducir adherencia celular como parte de su mecanismo que le permite generar una metastasis.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar si en los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales (CaLo, InBI y HeLa) se encuentra presente el TNF- α y si este factor está implicado en el potencial proliferativo de las células tumorales.

Determinar si el TNF- α endógeno induce adherencia celular en co-cultivos de células endoteliales provenientes de cordones umbilicales humanos y células U937.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar a través de la técnica de ELISA, si en los MCs provenientes de cultivos de las líneas celulares CaLo, InBI y HeLa está presente el TNF- α .

2.- Evaluar a través de la prueba de citotoxicidad realizada en la línea celular L929 si el TNF- α presente en los MC provenientes de cultivos de las células tumorales se encuentra activo

3.- Determinar mediante ensayos de proliferación si el TNF- α endógeno participa en la capacidad proliferativa de las líneas tumorales.

4.- Determinar mediante ensayos de neutralización con anticuerpos anti-TNF- α , si el TNF- α endógeno participa en el potencial proliferativo de las líneas tumorales.

5.- Evaluar si los sobrenadantes provenientes de células tumorales inducen adherencia celular y si el TNF- α endógeno está relacionado con la inducción de la adhesión celular mediante co-cultivos de células endoteliales y células U937.

MATERIAL Y METODOS

Las líneas celulares tumorales CaLo (estadio IIB) e InBI (IVB), provenientes de dos biopsias diferentes de pacientes con cáncer cérvico-uterino (CaCu), fueron gentilmente donadas por el Dr. Alberto Monroy (L324 Laboratorio de biología celular y molecular del cáncer FES Zaragoza).

La línea tumoral HeLa y la línea celular de fibrosarcoma de ratón L929 se adquirieron del ATCC (compañía American Type Culture Collection), y son mantenidas en el laboratorio en criopreservación hasta su uso, tales células son mantenidas en condiciones de cultivo similares al de las células epiteliales y se utilizan para ensayos de actividad biológica cuando se encuentran en una fase de proliferación exponencial.

Las líneas celulares CaLo e InBI se obtuvieron en 1991 a partir de un carcinoma epidermoide de células Humanas. La primera línea se logró de una paciente de 55 años de edad con estadio clínico IIB, y la segunda de una paciente de 45 años con estadio clínico IVB.

Obtención de medios condicionados

Para la obtención de los medios condicionados (MC), las tres líneas tumorales CaLo, InBI y HeLa fueron cultivadas (1.5×10^7 células /483 cm² con 150 ml de RPMI-1640 suplementado con 5%(v/v) de SFB) en botellas Falcón de tres niveles. Cuando llegaron al 80-90% de confluencia se lavaron cinco veces con 100 ml de PBS, para dejarlas con RPMI-1640 únicamente. A las 48 horas, se colectó el medio condicionado (MC sin suero). El MC se centrifugó a 1000 g por 5 min. para eliminar el detrito celular y se almacenó a -20°C.

Liofilización de los MC

Para concentrar el MC, un litro de medio de cultivo se liofilizó en un liofilizador Speed-Vac (Automatic Enviromental, modelo AES2000, Savant). El liofilizado fue reconstituido con 3 ml de PBS.

Diálisis

Con el propósito de eliminar las sales en los MC liofilizados, éstos se sometieron a diálisis en bolsas para diálisis con un tamaño de poro de 1Kda. La bolsa de diálisis con el liofilizado fue puesta en un recipiente con PBS 0.25X por 48 hrs. con cambios cada 8 hrs., posteriormente se dejó en PBS 1X por 24 hrs. más. El dializado fue centrifugado a 14,000 rpm durante 15 min en una centrifuga refrigerada (Centrifuga 5402 Eppendorf). El sobrenadante fue esterilizado utilizando membranas de filtración con un tamaño de poro de 0.22 micras. El filtrado fue alicuotado y almacenado a 4°C hasta su uso.

Cuantificación de proteína en los MCC por el método de Bradford.

La concentración de proteína total de los MCC, se determinó a través del método de Bradford (1976). Se realizó una curva patrón de una proteína conocida, (Albúmina de huevo de pollo; SIGMA, USA), utilizando 1, 2, 4, 6, 8, 16, 32, y 64 µg de albúmina / ml de PBS en tubos Eppendorf. A cada tubo se le extrajo 200 µL de líquido que se sustituyeron por 200 µl de reactivo de Bradford (BioRad). Paralelamente, se realiza el mismo procedimiento para las muestras (MCC). Los tubos se agitan vigorosamente y el contenido se vierte en celdas de plástico de un ml c/u y la absorbancia fue determinada con un espectrofotómetro a 590 nm (ELx800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC). El blanco consiste de 800 µL de agua grado HPLC con 200 µL de reactivo de Bradford.

Se graficó una curva de calibración (densidad óptica vs concentración de albúmina), y a través de una regresión lineal y por medio de la ecuación de la línea recta se determinó la concentración de las muestras problema (MCC).

Detección del TNF- α a través del Inmunoanálisis enzimático de ELISA

1 μg de proteína total de los (MCC/pozo) medios condicionados concentrados por pozo fueron colocados en una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNCLON, Denmark) y se dejaron adsorbiendo a 37 °C por 4 horas y luego estabilizándose a 4 °C durante 24 horas. Al término de este tiempo, la placa fue lavada 3 veces con agua destilada y se adicionó amortiguador de bloqueo, dejándose en éste durante 30 minutos a 37°C. Luego se lavó cuatro veces con PBS al 0.1% (v/v) de Tween20 e inmediatamente se agregó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo primario (mAb) (anti-TNF- α SIGMA Co., USA) y la placa fue incubada a 37°C durante 1.5 horas, cumplido este tiempo, se lavó tres veces con PBS al 0.1% (v/v) de Tween20. Posteriormente se adicionó amortiguador de bloqueo y la placa se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se lavó tres veces con PBS al 0.1% (v/v) de Tween20. Después se adicionaron 100 μL /pozo del anticuerpo secundario (Ab) conejo IgG (isotipo de inmunoglobulina G) conjugado con peroxidasa (SIGMA Co., USA) y se incubó una hora a 37°C. Se repitieron tres lavados con PBS al 0.1% (v/v) de Tween20 y se añadió el sustrato; de esta preparación se adicionaron 100 μL sustrato/pozo. Se dejó en oscuridad durante 5-10 minutos y la reacción fue detenida con 25 μL /pozo de ácido sulfúrico 2.5 N. Inmediatamente se procedió a evaluar la coloración formada en un lector de placas a 490 nm de absorbancia (Elx800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC).

Se construyó una curva de calibración del TNF- α con una dilución seriada iniciada de 500 pmoles/ml y finalizada con 4 pmoles/ml. Esta curva fue considerada como control positivo. Así mismo, se emplearon controles negativos: a un pozo sin Ag (antígeno) se le dirigió el mAb y el Ab secundario; a otro pozo también sin Ag se le envió solo el Ab conjugado; en ambas condiciones se bloqueo previamente con amortiguador de bloqueo. Esto se efectuó con la finalidad de eliminar los posibles errores originados por alguna unión específica de los mAb y de los Ab conjugados.

Evaluación de la bioactividad del TNF- α en las células L-929.

El TNF- α es citotóxico sobre la línea celular L929, de tal forma que una unidad (1U) de TNF- α se define como la cantidad TNF- α requerida para matar el 50% de dichas células. Esta citotoxicidad del TNF- α se potencializa con un adyuvante, la actinomicina D (Bharat & Jordan, 1992). Se evaluaron los MCC s/s de las tres líneas tumorales CaLo, InBI y HeLa para determinar si el TNF- α secretado presenta actividad biológica. Se sembraron 4×10^4 células L-929 en 0.1 ml de RPMI-1640 al 10% (v/v) de SFB por pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNCLON, Denmark) y se mantuvieron en cultivo durante toda la noche. Después de ese tiempo, se añadió una dilución seriada iniciada con 400 $\mu\text{g/ml}$ de proteína total proveniente de los MCC conteniendo 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D (SIGMA Co. USA). Se dejó en condiciones de cultivo 16 h a 37°C y se evaluó el índice de sobrevivencia con la técnica de cristal violeta. El colorante cristal violeta posee características alcalinas, que le permite incorporarse a los núcleos celulares. El número de núcleos teñidos aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida. Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1%(v/v) en PBS (solución amortiguadora de fosfatos) por 10 minutos manteniéndose en agitación. Posteriormente se lavaron con agua bidestilada y se secaron al aire. Se agregó una solución de cristal violeta al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6 manteniéndose en agitación durante 20 minutos. Inmediatamente, las placas de cultivo se lavaron 5 veces con agua desionizada, se secaron al aire y a temperatura ambiente. A las cajas de cultivo se les añadió ácido acético al 10% (v/v), dejándose en agitación durante 20 minutos, para finalmente leer la absorbancia a 590 nm (color azul) en un espectrofotómetro (Eix800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC). Los cultivos sin tratamiento (controles) representaron el 100%.

Ensayo de proliferación con incorporación de timidina tritiada

Esta evaluación consistió en la asimilación de un nucleótido análogo de la timina marcado con tritio (timidina) al ADN de las células en cultivo, de manera que cuando las células se encuentran en fase de síntesis incorporan la timidina marcada (Coon & Stumpf, 1984., Bulbulian, 1987; Karp, 1996). En estas evaluaciones se utilizaron cultivos celulares sincrónicos para obtener una mayor representatividad. La población celular se sincronizó mediante la eliminación del SFB de los cultivos por 36 horas previas a la estimulación del TNF- α 10 ng/mL y el marcado de 1 micro curie por mililitro de timidina tritiada. Con el estímulo se dejó a los cultivos durante 48 horas y al término de este lapso se lavaron con PBS y se fijaron con metanol al 95% (v/v) en PBS durante 20 min. Nuevamente se lavaron las células con PBS y se les añadió NaOH 200mM con el fin de lisar las células y liberar el ADN marcado. Transcurridas 24 horas el lisado se depositó en viales con 2 mL de líquido de centelleo (Beckman, USA). La radiación fue evaluada en un contador de centelleo de emisión β (Beckman, USA, modelo LS-6500) y las lecturas en cpm (cuentas por minuto) fueron convertidas a porcentaje de proliferación, en donde los cultivos sin tratamiento (controles) representaron el 100%.

Obtención de células endoteliales

Las células endoteliales fueron obtenidas a partir de cordones umbilicales humanos provenientes de partos eutócicos y cesáreas de acuerdo a Grimbrone, 1976. Los cordones se colectaron en solución salina de Hepes (Sigma), se limpiaron con gasas estériles y se les canuló la vena umbilical con la finalidad de lavarla para eliminar residuos sanguíneos. La vena fue sometida a disgregación enzimática con una solución de colagenasa tipo 1 (Worthington, USA) a una concentración de 1 mg/ml en Hepes o tripsina (SIGMA, USA) al 0.075 % preparada en una solución de verseno, durante 15 minutos a una temperatura de 37°C. El disgregado fue colectado en tubos y centrifugado a 1500 rpm. Durante 10 min. El botón celular obtenido de 3-12 cordones fue sembrado de acuerdo a las condiciones de cultivo celular.

Condiciones de cultivo celular

Las células endoteliales fueron mantenidas en medio de cultivo M199 (GIBCO, USA) suplementado con glutamina al 1% (GIBCO, BRL), 20 µg/ml de factor de crecimiento endotelial (Biomedical Technologies Inc.), 100 µg/ml de heparina (Sigma, USA), antimicótico al 1% (GIBCO BRL) y 10% de suero fetal de bovino (SFB) (in Vitro, México). Una vez sembradas, las células fueron mantenidas a 37°C con una humedad a punto de rocío y una atmósfera de 5% de CO₂. Las células fueron utilizadas para los ensayos experimentales entre los pasajes 1 y 2 y se sembraron a una densidad de 10000 células/cm².

Caracterización de células endoteliales.

Las células fueron identificadas como endotelio por su morfología típica en confluencia y por inmunofluorescencia. Se sembraron sobre cubre objetos de vidrio, se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 min. y se incubaron con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor von Willebrand (DAKO, USA), que actúa como un acarreador del factor VIII de coagulación en células endoteliales. Una IgG acoplada con rodamina (anticuerpo secundario) fue utilizada para revelar la presencia del anticuerpo primario. Ambos anticuerpos se incubaron con las células durante 30 min. a 37°C o a temperatura ambiente. Por último, todos los núcleos celulares fueron teñidos con colorante Hoechst (Molecular probes, USA), y el porcentaje de células con rodamina entre el porcentaje de células teñidas con Hoechst proporcionó el porcentaje de células endoteliales obtenidas en los cultivos primarios, el cual fue del 99%.

Obtención de fibroblastos y epitelios normales

Los fibroblastos se obtuvieron de biopsias de tejido de cérvix humano, de pacientes sometidas a histerectomía por presentar miomatosis uterina. Obtenida la pieza quirúrgica, se transportó en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 15%

de SFB (Suero Fetal de Bovino) (GIBCO, BRL) manteniéndose a 4 °C, y se procesó durante las siguientes 2-3 hrs.

El tejido se fragmentó en trozos pequeños (5mm.) y se depositó en un matraz con 15 mL de tripsina al 0.05% (v/v) (Sigma Co., USA) en SSV (Solución Salina de Verseno) y se mantuvo a 37°C en agitación constante por 15 min. Después, el sobrenadante se decantó en un embudo con malla y se colectó en un tubo cónico con 0.5 mL de SFB. Inmediatamente al tejido remanente se le adicionaron otros 15 mL de tripsina al 0.05%(v/v) en SSV y se mantuvo a 37 °C en agitación constante durante 15 min. Al término de ese tiempo, la suspensión celular contenida en el sobrenadante se filtró a través de un embudo con malla y se colectó en un tubo cónico que contenía 1mL de SFB.

Los tubos se centrifugaron a 500 g (gravidades) durante 5 min. Se retiró el sobrenadante mediante decantación y el botón celular restante se resuspendió en 5 mL de RPMI suplementado al 10% de SFB. La suspensión celular se sembró en cajas de cultivo (COSTAR) a una densidad aproximada de 100 células/mm² y se mantuvieron en una incubadora Scientific al 95% de aire/5% de Co₂ y a una atmósfera de humedad a punto de rocío. A las 24 h. Se realizó un cambio de medio por uno nuevo, de manera que solo permanecieron en cultivo las células adheridas. Después de 5 a 7 días se obtuvieron cultivos celulares de fibroblastos llegando a una densidad de 2,500 células/mm² (Griffths,1998; Freshney,1994).

Los epitelios se obtuvieron mediante el mismo método, sólo que éstos fueron cultivados en medios adicionados con 0.5mg/mL de insulina (SIGMA, USA) y 10 µg/mL de hidrocortisona (SIGMA, USA).

Obtención de células U937

Las células promielocíticas humanas de la línea U937 se adquirieron en la compañía American Type Culture Collection (ATCC). Estas células se mantuvieron en RPMI (GIBCO, USA) suplementado con suero fetal bovino al 10%, sustituyendo el 50 % del volumen total por medio fresco cada 48 hrs.

Marcado de la línea U937

La timidina marcada con tritio radiactivo es un analogo de el nucleótido timina, este es incorporado al ADN cuando la célula está en división. 5×10^6 células U937 se marcaron con timidina tritiada .1 micro curie por mililitro durante 48 horas, después de lavarlas 4 veces con PBS se pusieron en contacto con las células endoteliales.

Cocultivo de las células endoteliales y la línea U937

Las células endoteliales fueron sembradas en placas de 24 pozos hasta formar una monocapa, posteriormente se estimularon con 50 microgramos de proteína total proveniente de los MCC durante tres horas. Una vez pasado el tiempo, las células fueron lavadas cuatro veces con PBS. Inmediatamente se adicionaron 500,000 células por pozo de la línea celular U937 previamente marcada, dejandolas por tres hrs. mas, para tener un tiempo total de seis horas. Posteriormente los pozos fueron lavados tres veces con PBS con el propósito de retirar a las células que no se adhirieron. A continuación, se añadió NaOH 200 mM con el fin de lisar las células y liberar el ADN marcado. El lisado fue vertido a viales de centelleo conteniendo 2 ml de líquido de centelleo (BECKMAN), y la radiación emitida fue evaluada en un contador de Centelleo de emisión β . (Beckman USA, modelo LS-6500) y las cpm (cuentas por minuto) fueron expresadas como porcentaje de adherencia celular.

Análisis estadístico

Los resultados provenientes de datos promediados de almenos tres experimentos independientes, fueron sometidos a dos pruebas estadísticas, una denominada ANDEVA ó análisis de varianza, que establece un valor medio denominado Gran Media, con una distribución de los datos de una manera normal y nos dice que tan alejados están los valores promedio de las muestras de los ensayos con respecto a la Gran Media, lo que determina si la muestra presenta un

comportamiento de distribución normal; La segunda prueba denominada Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher, se realiza para saber si existe diferencia significativa entre dos o más pares de medias.

RESULTADOS

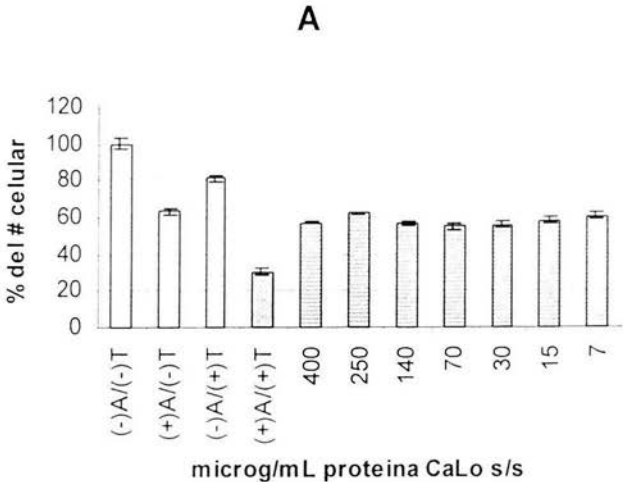
Es conocido que las células tumorales son capaces de sobrevivir en condiciones de menor suministro de nutrientes así como de menores concentraciones de factores de crecimiento. También se sabe que estas células tumorales son capaces de crear su propio microambiente a través de la secreción de citocinas que favorecen su crecimiento. En el caso específico de las células tumorales provenientes de cáncer cérvico-uterino (CaCu), no se sabe cuáles ni cuantas citocinas secretan y cual es su papel en la célula tumoral. Por otro lado, se ha citado que el TNF- α es secretado por células tumorales, sin embargo no es claro cuál es su papel en relación al potencial proliferativo de estas, dado que mientras algunas líneas de células tumorales son inhibidas por el TNF- α , otras son resistentes al efecto inhibitor de dicho factor. Con el propósito de saber si las células CaLo, InBI y HeLa son capaces de secretar TNF- α , se cultivaron 5×10^5 células en cajas petri de 100 mm en un volumen total de 10 ml de RPMI al 10% de suero fetal bovino y se incubaron por 20 hrs. con el objetivo de adherirse. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS cinco veces y las células fueron dejadas en RPMI únicamente e incubadas por 48 hrs. (ver metodología), con el objeto de que al término del tiempo de incubación el sobrenadante fue colectado, centrifugado y concentrado para ser utilizado en la detección de TNF- α a través de la técnica de ELISA.

(Tabla 1).

Medio condicionado	Concentración
HeLa s/s	36 pg.
CaLo s/s	682 pg.
InBI s/s	463 pg.

Tabla 1. Identificación en picogramos del TNF- α en los sobrenadantes (MCC) provenientes de las células tumorales CaLo, InBI y HeLa cultivadas sin SFB después de 48 horas de cultivo, a través del inmunoanálisis enzimático de ELISA.

El inmunoanálisis de ELISA confirma que estas tres líneas tumorales son capaces de secretar el TNF- α en concentraciones de picogramos/200 μ g de proteína total. Sin embargo, también deja ver que la concentración de TNF- α en cada una de las líneas es variable, indicando que la cantidad de TNF- α es específica de la línea celular. El hecho de que los sobrenadantes tengan TNF- α no implica necesariamente que tengan TNF- α bioactivo, ya que Fahey, et al (1996) han descrito la secreción de citocinas en células tumorales de manera latente (inactiva), por lo que es obligado el determinar si el TNF- α endógeno es activo. Al respecto se utilizó la línea celular L929, la cual es utilizada para determinar la actividad citotóxica del TNF- α en presencia del adyuvante actinomisina-D. La línea L929 fue tratada con los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales CaLo, InBl y HeLa en presencia de actinomicina D con el fin de determinar si el TNF- α presente en los sobrenadantes de estas células es activo (Fig. 1)



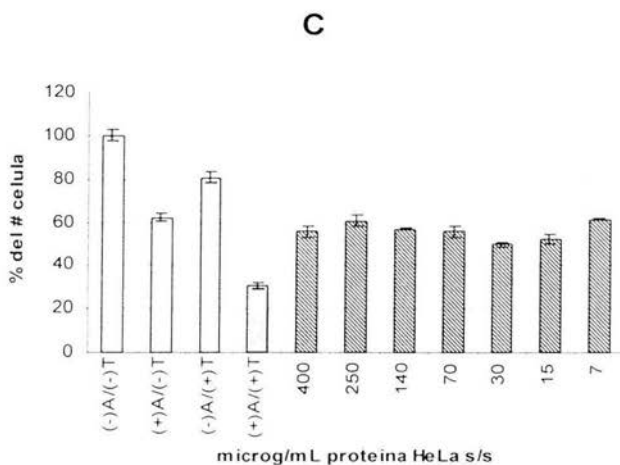
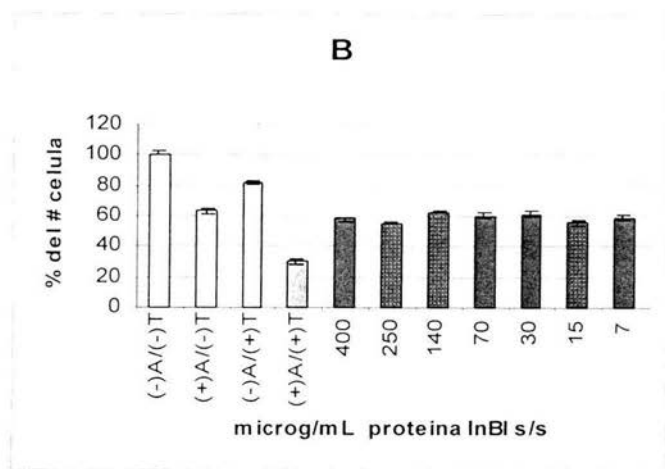
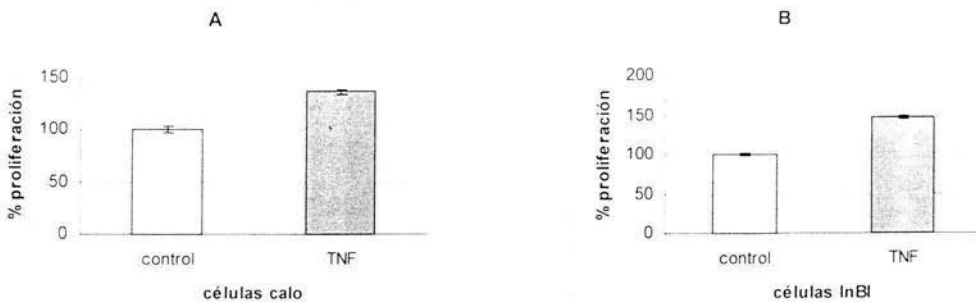


Fig. 1. Determinación de la bioactividad del TNF- α proveniente de los MCC sin SFB (MCC s/s) de CaLo (A), InBI (B) y HeLa (C) sobre la línea L929. El TNF- α es citotóxico en L929; Tal actividad se potenció con 0.5 microgramos/ml de actinomicina D. (-) = ausencia; (+) = presencia; A = actinomicina-D; T = a 5 ng/ml TNF- α . Se sembraron 4×10^4 células L929/ pozo en RPMI- 1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB en una placa de 96 pozos y fueron mantenidas así toda la noche. Se añadió las concentraciones de proteína total procedentes de los MCC y a las 16 h se evaluó el número celular con la técnica de cristal violeta ($P > 0.05$).

Los resultados indican que el TNF- α endógeno presente en los sobrenadantes de las células tumorales es activo y que dicha actividad representa el 57.14 % con respecto al TNF- α exógeno. Dado que la actividad citotóxica del TNF- α endógeno es similar para todas las concentraciones en las tres líneas celulares, sugiere que la actividad citotóxica no es dependiente de la concentración, lo que explica que pese a que existe una diferencia en las concentraciones de TNF- α en los sobrenadantes, la actividad se mantiene de manera similar. (Fig. 1)

El determinar que las células tumorales CaLo, InBI y HeLa son capaces de secretar TNF- α activo abre la interrogativa de saber para que sirve el TNF- α endógeno a las células tumorales. Se ha reportado que el TNF- α es un factor inhibidor de la proliferación, sin embargo el hecho de que las células tumorales mantengan su potencial proliferativo en presencia de este factor de manera endógena sugiere que el TNF- α no lo están utilizando para inhibir su proliferación, por lo que se consideró conveniente estimular a las células tumorales con 10 ng/ml de TNF- α recombinante y determinar si afecta su potencial proliferativo. (Fig. 2)



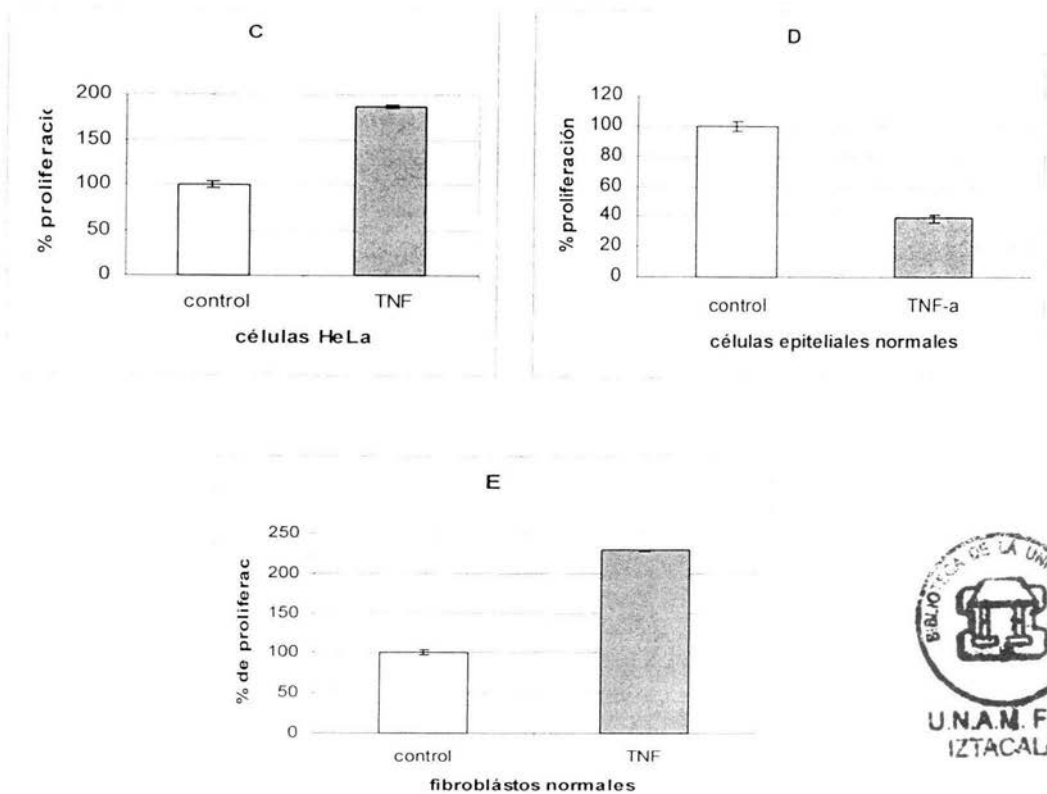


Figura 2. Efecto del $TNF-\alpha$ en las líneas tumorales CaLo (A), InBI (B) y HeLa (C) provenientes de CaCu y en células epiteliales (D) y fibroblásticas (E) normales, provenientes de cerviz humano. 2.5×10^3 células/pozo fueron sembradas en placas de 96 pozos en RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB y con 1 microcurie por mililitro de $\{B-^3H\}$ dTTP. C = células sin tratamiento; $TNF-\alpha$ = células con 10ng/mL de rh $TNF-\alpha$. Ensayo evaluado a las 48 horas de cultivo. La incorporación de $\{B-^3H\}$ dTTP fue cuantificada en un contador de centelleo (BECKMAN) y los resultados fueron convertidos a porcentaje. Resultados promediados de tres experimentos independientes. ($p > 0.05$).

IZT

Los resultados establecen que las células tumorales son capaces de proliferar hasta en un 96% cuando son tratadas con $TNF-\alpha$ exógeno, así como para los fibroblastos normales, no obstante para las células epiteliales provenientes del cérvix humano, las cuales son inhibidas en su proliferación en presencia de $TNF-\alpha$, sugiriendo que las células tumorales están utilizando al $TNF-\alpha$ endógeno como un

mitógeno. Sin embargo, los resultados no implican que la participación del TNF- α sea directa o indirecta, por lo que es necesario definir si el TNF- α endógeno participa de forma directa en la capacidad proliferativa de las líneas tumorales. Al respecto se adicionó un anticuerpo monoclonal neutralizante dirigido contra el TNF- α a los cultivos de las células tumorales y el número celular fue evaluado a las 48 h en condiciones de cultivo a través de la técnica de incorporación del colorante cristal-violeta (Fig. 3).

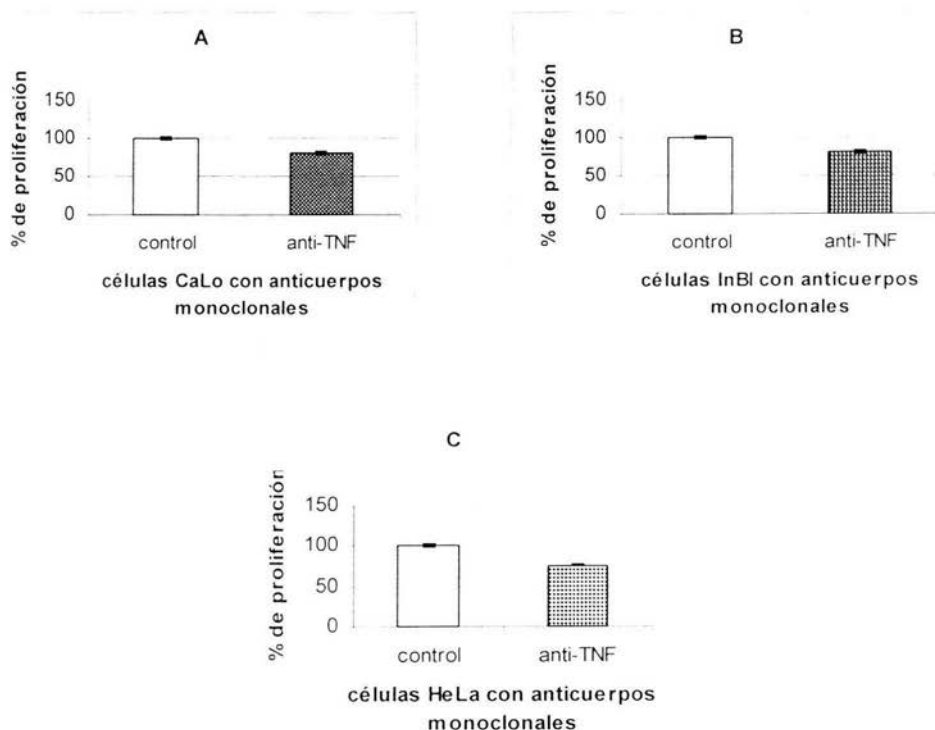


Fig. 3 El anticuerpo monoclonal anti-TNF- α inhibe la proliferación de las células tumorales CaLo (A), InBI (B) y HeLa (C) al bloquear el TNF- α endógeno 5×10^3 células / pozo en RPMI-1640 suplementado con 10 % (v / v) de SFB fueron cultivadas en una placa de 96 pozos y a las 4 h se añadió 0.18 microgramos / ml de mAb anti-TNF- α . Evaluación a las 48 h de cultivo con la técnica de cristal-violeta ($P > 0.05$).

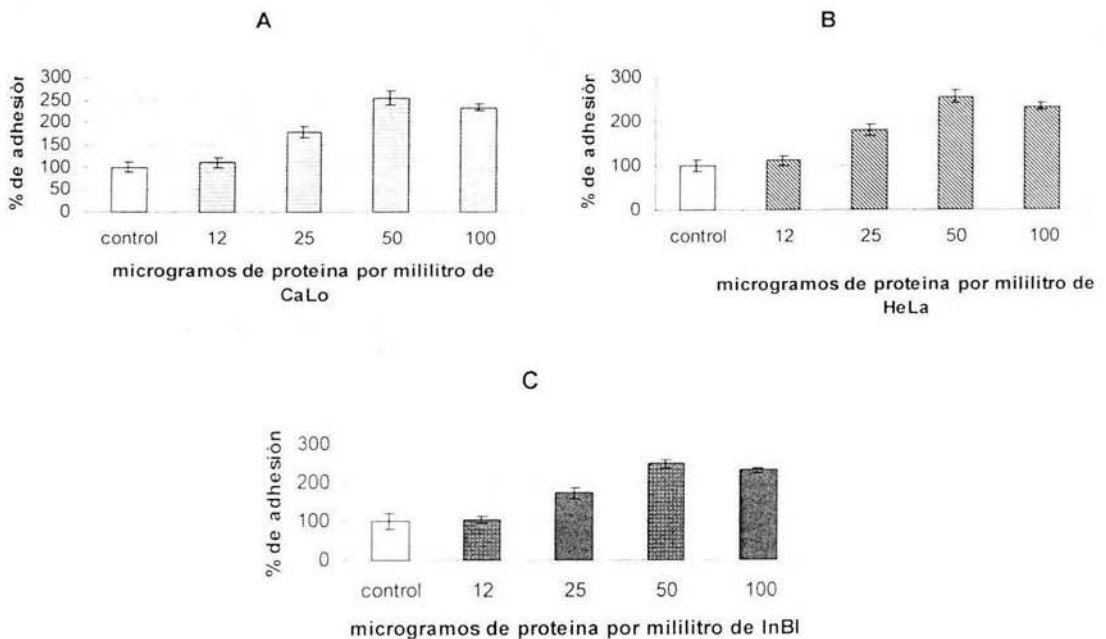
La Figura 3 demuestra que el TNF- α participa en la capacidad proliferativa de las células tumorales, ya que al neutralizar al TNF- α endógeno el potencial proliferativo de las células tumorales decreció hasta en un 25%. Sin embargo, el hecho de no abatir por completo el potencial proliferativo de las células tumorales, sugiere la participación de otros factores en el mismo proceso de proliferación.

Por otro lado, es sabido que el TNF- α induce una gran variedad de respuestas celulares, entre las que destacan son la inducción de adherencia celular y el efecto citotóxico. Dado que las células tumorales secretan TNF- α activo, se consideró adecuado evaluar si los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales son capaces de inducir adherencia celular. Para ello, se utilizó como modelo de adhesión celular al co-cultivo de la línea celular promielomonocítica procedente de médula ósea U937 y células endoteliales provenientes de cordones umbilicales humanos (Ahmed et al., 2001). Para realizar este ensayo, se requiere primeramente de la obtención de una cantidad adecuada de sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales. Con este fin, las células tumorales fueron cultivadas en cajas petri a una densidad inicial de 200 000 células con un volumen total de 10 ml de RPMI al 1% de SFB durante 20hrs. con el propósito de que todas las células se encuentren adheridas al término de ese tiempo. Posteriormente el cultivo fue lavado con PBS dos veces y posteriormente el cultivo fue dejado únicamente con RPMI durante 48 hrs. a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ con una humedad a punto de rocío. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados y centrifugados a 3 000 rpm con el objetivo de retirar el detrito celular. Los sobrenadantes fueron concentrados por liofilización en un aparato SPEEDVAC y liofilizados contra PBS utilizando una membrana con corte de 1000 daltons. Los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración con la ayuda de una membrana de nitrocelulosa con un poro de 22 micras de diámetro y se almacenaron a una temperatura de -70°C hasta su uso.

Para determinar la adherencia celular, primeramente debe de establecerse la monocapa de células endoteliales, el número de células U937 marcadas con timidina

tritiada y la concentración de proteína total proveniente de los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales capaz de inducir adherencia celular.

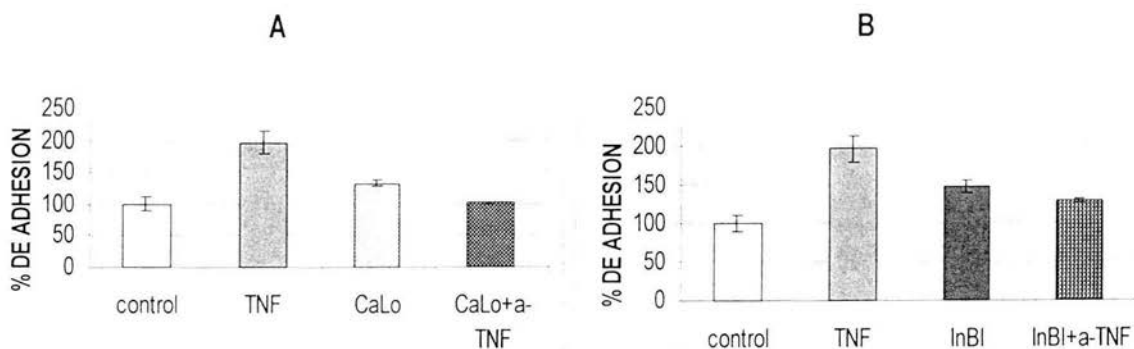
La concentración de proteína total contenida en los sobrenadantes fue determinada por el método de Bradford y diferentes concentraciones fueron aplicadas en los cultivos de células endoteliales durante tres horas. Posteriormente, los cultivos fueron lavados con PBS y se les adicionó 250,000 células U937/pozo, en cajas de 24 pozos marcadas con timidina tritiada durante tres horas más para hacer un tiempo total de seis horas, con la finalidad de conocer la concentración óptima para inducir adherencia celular. Al término de las seis horas, los cultivos fueron lavados con PBS cinco veces, posteriormente se les añadió 50 μ l de una solución de hidróxido de sodio 200 mM con la finalidad de liberar la marca contenida en el DNA (Fig. 4).



(Fig. 4) Curva de proteína total 25×10^4 células U937/pozo, en cajas de 24 pozos marcadas con tritio radiactivo, se pusieron en contacto con una monocapa de células endoteliales proveniente de cordón umbilical humano previamente estimuladas con proteína procedente del medio condicionado concentrado de la líneas tumorales de CaLo (a); HeLa (b); InBI (c) durante 6 horas de tratamiento.

El resultado anterior no sólo nos muestra la capacidad que tienen los sobrenadantes para inducir adherencia celular, sino que además nos establece que la cantidad óptima para inducir la adhesión es de 50 microgramos por mililitro.

El hecho de haber encontrado actividad inductora de adherencia celular en los sobrenadantes de las células tumorales, obliga a cuestionarnos si el $\text{TNF-}\alpha$ esta implicado en esta actividad. Por ello, 50 μg de proteína total de los sobrenadantes fue tratada con un anticuerpo neutralizante para $\text{TNF-}\alpha$ a una concentración recomendada por el fabricante para bloquear 100 ng de $\text{TNF-}\alpha$. Los sobrenadantes tratados y no tratados con el anticuerpo fueron aplicados a monocapas de células endoteliales cultivadas en placas de 48 pozos. El estímulo fue mantenido por 3hrs y posteriormente los cultivos fueron lavados cinco veces con PBS con Ca y Mg. Una vez lavados, se co-cultivaron con células U937 previamente marcadas con timidina tritiada (TH^3) durante 3 hrs. más. Al término de este tiempo, los cultivos fueron nuevamente lavados con PBS cinco veces y las células adheridas del co-cultivo fueron lisadas con NaOH 200 mM con el propósito de liberar el ADN marcado. El lisado de cada pozo fue transferido a viales con 2ml de líquido de centelleo para evaluar la radioactividad emitida en cpm en un contador de centelleo (BECKMAN). Las cpm registradas se interpretan como el porcentaje de adherencia celular (Figura 5).



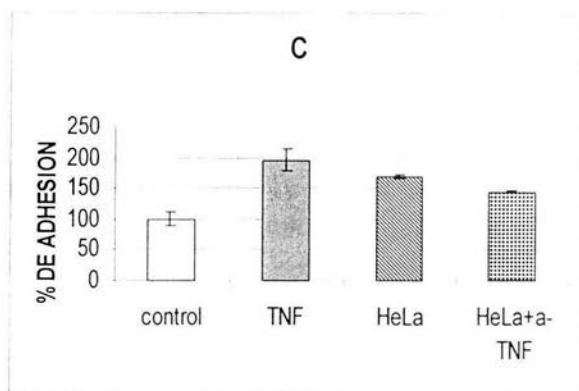


Fig. 5. . Determinación del efecto inductor de adherencia celular presente en los sobrenadantes de cultivos celulares de las líneas CaLo, InBl y HeLa . Cajas de . 24 pozos de endotelios fueron tratados con 50 μ g/ml de proteína total de los sobrenadantes libres de suero de las líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa y con anti- TNF- α a las 3 horas se le adicionaron las células U937 previamente marcadas con timidina tritiada y se dejaron otras tres horas en cocultivo, después fueron leídas con un contador de centelleo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las metástasis confieren a una neoplasia como un atributo de mayor malignidad que cualquier otro de los atributos neoplásicos. Sin embargo, no todos los cánceres tienen capacidad de generar metástasis. Para que las células cancerosas que se desprendieron del tumor original invadan a otros órganos sanos, es necesaria la presencia de moléculas de adhesión.

La mayor parte de los tumores son fáciles de curar mediante la extirpación quirúrgica, sin embargo, la metástasis es la razón de que el cáncer sea una enfermedad tan devastadora, por eso se puede afirmar que los moduladores que regulan el mecanismo de la división celular y la expresión de moléculas de adhesión desempeñan uno de los papeles más importantes de esta enfermedad, por ello el estudio de la participación de moduladores biológicos es de suma importancia para comprender el mecanismo del control de la mitosis y de la adherencia celular.

Es conocido que la inhibición del crecimiento, es crucial en el control de la división de células normales (Cipriano y Yong, 1998), sin embargo, en el caso de las

células tumorales provenientes de CaCu (CaLo, HeLa e InBI), no se conoce de manera clara el papel que desempeñan las citocinas que ellas mismas secretan, en cuanto a la regulación de la división celular.

En este estudio se caracterizó la capacidad del TNF- α para inducir los cambios moleculares funcionales en relación con la proliferación de las células tumorales CaLo, HeLa e InBI y en relación con la adhesión de promielomonocitos U937 a cultivos primarios de células endoteliales provenientes de cordones umbilicales humanos.

El estudio de la participación de factores de crecimiento es crucial para comprender el mecanismo del control de la división celular.

En este trabajo, se demostró que el TNF- α exógeno estimula de manera significativa la proliferación celular de las células tumorales CaLo, HeLa e InBI (figura 1 A, B y C) y que además está de manera activa en los sobrenadantes de éstas. Este descubrimiento es importante ya que los reportes existentes sobre esta citocina revelan que las células tumorales pueden ser inhibidas por ella, aunque hay tumores que son resistentes a tal efecto inhibitor o citotóxico (Azuma et al., 1999; Matsushita et al., 1999; Viegas et al., 1999). Recientemente Wodworth et al (1995) han descrito algunos tumores cervicales capaces de proliferar con 1.7 μ g/ml de TNF- α exógeno, sin que tales células lo produzcan. Por el contrario en las células epiteliales normales el TNF- α exógeno inhibió la proliferación (figura 1D). Esto nos sugiere que el TNF- α endógeno puede estar relacionado con el estado transformante de las células tumorales o que los receptores de membrana están mutados, e inclusive estén participando receptores distintos, como es el caso para el receptor del EGF (Factor de Crecimiento Epidermal, el cuál puede enlazar a otras citocinas (como el IFN- γ , y el TNF- α) para inducir la proliferación en carcinomas (Woodworth et al., 1995).

En relación a las células fibroblásticas normales, los resultados son similares con los establecidos por Kwon et al (1998) quienes mencionan que el TNF- α es un factor inductor de la proliferación de fibroblastos de piel y de prepucio humano.

La acción de anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra esta citocina indican que el TNF- α está involucrado directamente con la capacidad

proliferativa de estas células tumorales. Sin embargo, tales anticuerpos neutralizantes no abaten completamente la capacidad proliferativa de estas células, indicando que otros factores estén participando en dicha capacidad proliferativa.

Se plantea la posibilidad que el TNF- α secretado por las células CaLo, InBI y HeLa estimule la producción de otros factores de crecimiento, como lo demuestran Woodworth et al (1995), quienes cultivando células tumorales tratadas con TNF- α favorecen la secreción de anfirregulina (factor de crecimiento polipeptídico) la cual induce su proliferación.

Por otro lado durante los procesos inflamatorios los leucocitos se adhieren al endotelio utilizando moléculas de adhesión expresadas en ambos tipos celulares. Se ha reportado que este mecanismo es utilizado también por células tumorales con capacidad metastásica para adherirse al endotelio y posteriormente invadir otros tejidos, ya que los ganglios linfáticos son sitios frecuentemente invadidos por tumores metastáticos, se ha postulado que el TNF- α presente en estos ganglios puede mediar activación endotelial y promover la invasión metastásica. Aquí la importancia de estudiar si la adhesión de un promielomonocito humano puede ser mediada por la expresión de moléculas de adhesión en la superficie del endotelio en respuesta al TNF- α .

En este trabajo se encontró que el mismo TNF α endógeno está involucrado directamente en el mecanismo de adhesión a células endoteliales debido a que en los resultados de este estudio se ve favorecida la adhesión de las células U937 a los endotelios cuando estos son estimulados con los 50 μ g/mL de proteína de los sobrenadantes de las células tumorales CaLo, HeLa e InBI y con el TNF α exógeno.

Los resultados obtenidos nos indican que los sobrenadantes provenientes de los cultivos de las células tumorales CaLo, InBI y HeLa son capaces de inducir adherencia celular y que el hecho de que el anticuerpo neutralizante no revierta en su totalidad la adherencia inducida sugiere por un lado que la cantidad de anticuerpo neutralizante que utilizado no fue suficiente para bloquear la actividad registrada en los sobrenadantes o, por otro lado, que existen otros factores que participan en la misma actividad inductora de adhesión celular. Sin embargo, el hecho de observar que la

Falta página

N° 37

REFERENCIAS

- Abbas, A.K.; Andrew H. L. Jordan S.P. (1996) *Inmunología Celular y Molecular*. Ed. Interamericana. Madrid. pp. 276-281.
- Ahmed M, Dusanter-Fourt I, Dugray A, Dubrez L, Novault S, Bonnet ML, Gisselbrecht S, Varet B, Solary E, Vainchenker W, Turhan AG. (2001) *BCR-ABL fails to inhibit apoptosis in U937 myelomonocytic cells expressing a carboxyl-terminal truncated STAT5*. *Leuk Lymphoma* 42(3):445-5.
- Aiyer R. A., Aggaewal BB (1988). **Tumor Necrosis Factor**. In: *CRC handbook on cytotoxic lymphocytes and Complement: Effectors of the Immune System*. Ed. Podak E.R. England. pp.105-132.
- Alberts B. (1996). **La Célula**. Ed. Interamerica. Madrid. pp. 301
- Alonso, A. (1999). *El cáncer cervicouterino y acciones para tratarlo*. Investigación y desarrollo. México. No. 74, pp.10.
- Augustine, H. G. Kozian, D. H. y Johnson: R. C. (1994) "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes". *BioEssays* 16(12):901-906.
- Azuma M, Motegi K, Aota K, Yamashita T, Yoshida H, Sato M. (1999). *TGF-beta1 inhibits NF-kappaB activity through induction of IkappaB-alpha expression in human salivary gland cells: a possible mechanism of growth suppression by TGF-beta1*. *Exp. Cell Res*, Jul10;250(1):213-22.
- Bendtzen, K.(1994) *Cytokines and natural regulators of cytokines*. *Immunology Letters* 43:111-23
- Berumen J, Villegas N. (1997). *Recombinant therapeutic vaccines against invasive cervical cancer*. *Salud Pública Méx*, 39:288-297.
- Beutler B. & Ceram A. (1989). *The biology of cachetin /TNF: a primary mediator of host response* *Annu Rev Immu*. USA; 7: 625.
- Bevilacqua, M. P. , Pober, J. S. y Majeau, G. R. 1986. *Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: Characterization and comparison with the actions of interleukin 1* *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 9238-9242.

- Bulbulian, S. (1987). **La Radiactividad**. La Ciencia desde México. No. 42. Ed. Fondo de Cultura Económica. 120 pp.
- Carl-Henrik H. & Bengt W. (1989). **Growth factors as transforming proteins**. *J. Biochem*, 184, 487-496.
- Carswell, E.A. Old L.J.; Kassel R.L. Green S. Fiore N. Williamson B. (1975). **An endotoxin-induced Serum factor that causes necrosis of tumor**. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 72: pp. 3666-3620.
- Chávez, G.M.A. (1997). **Purificación del factor Inhibidor de la proliferación (FIP) y Evaluación de su Efecto en el Ciclo Celular de Fibroblastos de Cérnix Humano**. Tesis Licenciatura, UNAM; México, D.F.; 65 pp.
- Cipriano S.C.; & Yong, Q.C (1998). **Insensitivity to growth inhibition by TGF- 1 correlates with a lack of inhibition of the CDK2 activity in prostate carcinoma cells**. *Oncogene*. 17, 1549-1556.
- Conn & Stumpf. (1984). **Bioquímica Fundamental**. 3ª edición. México. pp.132.
- Donato, N., Gallick, G. E., Steck, P. A. y Roseblum, M. G. (1989). **Tumor necrosis factor modulates epidermal growth factor receptor phosphorylation and kinase activity in human tumor cells**. *J Biol Chem* 264: 20474- 20481
- Elkas J; Farias-Eisner R (1998). **Cancer of the uterine cervix**. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 10(1):47-50.
- Fahey MS; Paterson IC; Stone A; Collier AJ; Heung YL; Davies M; Patel V; Parkinson EK; Prime SS (1996) **Dysregulation of autocrine TGF-beta isoform production and ligand responses in human tumour-derived and Ha-ras-transfected keratinocytes and fibroblasts**. *Br J Cancer (ENGLAND)*, Oct, 74(7):1074-80.
- Freitag A; Reimann A; Wessler I; Racke K. (1996). **Effects of bacterial lipopolysaccharides (LPS) and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) on rat tracheal epithelial cells in culture: morphology, proliferation and induction of nitric oxide (NO) synthase**. *Pulm Pharmacol*, 9(3):149-56.

- Gariglio, P.; Benitez-Bribiesca L.; Berumen J.; Alcocer J.; Tamez R.; Madrid, V. (1998). **Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans**. *Archives of Medical Research*, 29(4): 279-84.
- Gradilone, A.; Vercillo R.; Napolitano M.; Cardinali G.; Gazzanigga P.; Silvestri I.; Gandini O.; Tomao S.; Galiano A.M. (1996). **Prevalence of Human Papillomavirus, Cytomegalovirus, and Epstein-Barr Virus in the Cervix of Healthy Woman**. *Journal of Medical Virology*, 50: 1-4.
- Gerritsen ME; Shen CP; Perry CA.(1998). **Synovial fibroblasts and the sphingomyelinase pathway: sphingomyelin turnover and ceramide generation are not signaling mechanisms for the actions of tumor necrosis factor-alpha**. *Am J Pathol*, 152(2):505-12.
- Haliday, E. M. , Ramesha, C. S. y Ringold, G. (1991) **TNF induces via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to a lipoxigenase metabolite**. *EMBO J*, 10: 109-115.
- Hernández-Ávila, M.; Lazcano-Ponce, E.; Berumen-Campos, J.; Cruz-Valdéz A.; DeRuiz P.; González Lira G. (1997). **Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: A case-control study**. *Archives of Medical Research*, 28(2): 265-71.
- Ibarra S.M.J (1997). **La ceramida como segundo mensajero del efecto citotóxico del factor de necrosis tumoral: posible participación de una proteína fosfatasa 2A activada por ceramida y sensible al ácido okadaico"** Tesis de Maestría. México, D.F. UNAM. pp 5-11.
- Janeway-Travers (1997).**Immunobiology, the immune system in health and disease**. Third edition. Garland Publishing. New York and London. 980 pp.
- Karp G. (1996). *Biología Celular y Molecular*. Ed. MacGraw-Hill. México. pp 671-692.
- Kwon BS; Wang S; Udagawa N; Haridas V; Lee ZH; Kim KK; Oh KO; Greene J; Li Y; Su J; Gentz R;Lertchirakarn V; Birner R; Messer HH.(1998). **Effects of interleukin-1 beta on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis**. *J Endod*, 24(6):409-13.
- Lange, W.Brugger, F.M. Rosenthal, L. Kanz, A. Lindermann (1992) **The Role of Cytokines in Oncology**. *Clinical and Experimental Hematology*, pp. 13-19.

- López-Marure, R. (1997), **Caracterización de la Respuesta Antiproliferativa de células endoteliales humanas al Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- α)** Tesis Doctoral. UNAM, México D.F. 122 pp.
- Lloid J. Old. (1988). **El Factor de Necrosis Tumoral**. Investigación y Ciencia. Madrid. Julio, número 142. pp. 29-37.
- Margni (1996). *Inmunología Clínica*. Ed. Medica-Panamericana. México. 680 pp.
- Marino, M. W., Pteffer, L. M., Guidon, P. T. y Donner, D. (1989). **Tumor necrosis factor induce phosphorylation of a 28 Kda Mrna cap-binding protein in human cervical carcinoma cells**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:8417-8421
- Matsushita, M Matsuzaky, K., Date, M., Nakagawa, T., Amoh, Y., Takemoto, H., Kubota, Y., Seky, T., Sawamura, T., Okamura, A., and K. Inoue. (1999). **Down-regulated of TGFbeta receptors in human colorectal cancer: implications for cancer: implications development**. *Br J cancer*, 80(1/2):194-205.
- Meager, A. (1991). **Cytokines**. Ed. Prentice Hall. USA. 280 pp 1-8.
- Nakada MT; Tam SH; Woulfe DS; Casper KA; Swerlick RA; Ghrayeb J (1998) Neutralization of TNF by the antibody cA2 reveals differential regulation of adhesion molecule expression on TNF-activated endothelial cells. *Cell Adhes Commun (SWITZERLAND)*, Sep, 5(6):491-503
- Pober JS. (1998). **Citokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology** *Am J Pathol*, 133: 426-433
- Regueiro J.L. Carlos L.L. (1998). **Inmunología, biología y patología del sistema inmune** 2a Edición. Ed. Panamericana. México. pp. 104, 122.
- Risau, W. (1995.) **Differentiation of endothelium**. *FASEB J*. 9, 926-933
- Roitt, Ivan. (1998) **Essential Immunology**. Ninth edition. Blackell Science. pp. 371-372
- Sato S; Matsunaga G; Konno R; Yajima (1998). **A Mass screening for cancer of the uterine cervix in Miyagi Prefecture, Japan. Effects and problems**. *Acta Cytol (UNITED STATES)*, 1998 Mar-Apr, 42(2):299-304.

- Sherry B, Cerami A. (1998). **Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses.** *J Cell Biol*, 107: 1269-1277.
- Slagle B.L., Kauffman R.H., Revees W.C. Icenogle J.P. (1998). **Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia.** *Cancer*, 83:1401-8.
- Slovin SF; Scher HI; Divgi CR; Reuter V; Sgouros G; Moore M; Weingard K; Pettengall R; Imbriaco M; El-Shirbiny A; Finn R; Bronstein J; Brett C; Milenic D; Dnistrian A; Shapiro L; Schlom J; Larson SM (1998).
- Sugarman, B. J. Aggarwal, B.B., Has, P. E., Figari, Y., Palladino, M., y Shepard, H.M. (1985). **Recombinant tumor necrosis factor alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro.** *Nature*, 230: 943-945.
- Tracey, K.J., Vlassara,H. y erami, A. (1989). **Peptide regulatory factors: cachectin/tumor necrosis factor.** *Lancet*. 1122-1126.
- Viegas MH; Salatino M, Goin M, Peters G, Labriola L, Costa CJ, Lanari C, Charreau EH, Elizalde PV. (1999). **Differential Expression of and Responsiveness to Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) isoforms in Hormone-dependent and independent lines of mouse mammary tumors.** *Cancer Detect Prev*, Sep 3;23(5):375-386.
- Woodworth CD; McMullin E; Iglesias M; Plowman GD. (1995). **Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervicalepithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*, Volume 92 2840-4.
- Yanagisawa M, Imai H; Fukushima Y; Yasuda T; Miura AB; Nakamoto Y. (1994). **Effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta on the proliferation of cultured glomerular epithelial cells.** *Virchows Arch*, 424(6):581-6
- Yarden, A; Kimchi, A. (1986). **Tumor necrosis factor reduces c-myc expression and cooperates with interferon- gamma in HeLa cells.** *Science (Washington) [SCIENCE (WASH.)]*, vol. 234, no. 4782, pp 1419-1421.