



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR  
Y MOLECULAR DEL CÁNCER

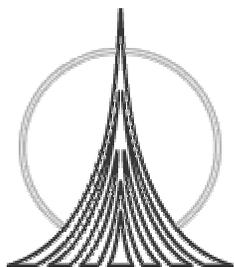
“SOBRENADANTES PROVENIENTES DE CULTIVOS DE  
CÉLULAS TUMORALES DE CaCu INHIBEN LA  
PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :  
MAGALI MARTÍNEZ LUNA

DIRECTOR DE TESIS  
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2005





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

### A mis padres **María Elena y Guillermo:**

Por todo el amor que me han dado, por creer en mi, porque sé que siempre cuento con ustedes. Gracias por todo lo nos han enseñado a mis hermanos y a mi.....espero nunca defraudarlos.

### A mis hermanos **Guillermo y Gonzalo:**

Porque no imagino mi vida... sin ustedes junto a mi.

### A **Efraín:**

Por tu apoyo para la realización de este trabajo y tu paciencia.

### A toda **mi familia:**

Abuelitos, Chela, Rosa, Lety, Mundo, Víctor, Javier, Pepe, Francisco, Roxana, Diana, Víctor Jr, Benjamín, Gabriel, Ángel Gabriel y Karla...por ser la familia que somos, con mas cosas buenas que malas.

### A mis **amigos:**

Adriana, Arlet, Carolina, Catalina, Claudia, Daniel, Edna, Eva, Gris, Gustavo, Hugo, Imelda, Isabel, José, Leonel, Perla, Rocio, Sandra, Víctor, Xochitl, Yolanda's y en especial a Luz, por haber estado a mi lado durante las clases y porque a pesar del tiempo todavía siguen estando conmigo.

### A mis **amigos del Laboratorio:**

Brenda, Carlos, Cinthia, Edgar, Fernando, Hugo E, Laura, Luisa, Lulu, Norma, Vicente y Vicky, por hacer de mi estancia en el laboratorio un lugar más agradable.

### A los **profesores:**

Edelmiro Santiago, Alberto Monroy, Jorge Hernández, Rebeca López-Marure y Lourdes Mora, por su valioso apoyo durante el desarrollo de este trabajo.  
En especial al profesor Luis Sánchez Sánchez por todo su apoyo y sus consejos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis **M. en C. Luis Sánchez Sánchez** por su apoyo para la realización de este trabajo, su paciencia, su confianza y sus enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio.

A los profesores:

**M. en B.S.H. Angélica Flores Ramírez**

**Dr. Edelmiro Santiago Osorio**

**Dra. Elia Roldan Reyes**

**M. en C. Jorge Hernández Montes**

Por enriquecer este trabajo con sus aportaciones y sus comentarios.

# INDICE

<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>4</b>
-Cáncer	8
-Cáncer de cérvix	10
-Mecanismos reguladores de la proliferación celular	13
-TGF $\beta$	13
-TNF- $\alpha$	15
-IFN- $\gamma$	17
-IL-1	18
Respuesta inmune	18
Linfocitos T y B	20
Ciclo celular	24
<b>Justificación</b>	<b>26</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>27</b>
<b>Objetivos</b>	<b>28</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>29</b>
<b>Resultados</b>	<b>33</b>
<b>Discusión</b>	<b>42</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>45</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>46</b>
<b>Apéndice</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

Es conocido que la aparición de un tumor implica que las células tumorales han generado una estrategia para evadir la vigilancia inmunológica. Sin embargo, aún no es claro cuales y cuantas citocinas o factores de crecimiento están implicadas en este proceso. En este trabajo se evaluó, el efecto de los sobrenadantes de cultivos de células tumorales HeLa y CaLo sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana. Al respecto se encontró que los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales CaLo y HeLa, libres de suero, presentan una Actividad Inhibidora de la Proliferación Celular de Linfocitos Humanos (AIPCLH), apoyando la hipótesis que establece que las células tumorales son capaces de secretar factores solubles como parte de su estrategia para evadir la vigilancia inmunológica. También se encontró que la AIPCLH es de naturaleza proteica, con un peso molecular mayor a los 50kDa. Un factor de crecimiento que presenta actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas es el TGF beta, el cual se presenta como un dímero de 25 Kda en su forma activa. El uso de anticuerpos neutralizantes contra el Factor Transformante del crecimiento beta (TGF $\beta$ 1), detectó la presencia de TGF beta y además bloqueó la actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas presente en los sobrenadantes de cultivos de las células tumorales, indicando que el TGF $\beta$ 1 es el responsable directo de dicha actividad. Sin embargo, aunque es conocido que el TGF $\beta$  detiene a las células en la fase G1 del ciclo celular, en este caso en particular, el TGF $\beta$  no detuvo a las células linfocíticas en ninguna de sus fases, sino que aparentemente, las células fueron inducidas a entrar en apoptosis.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de tejidos sólidos, es una enfermedad neoplásica constituida por una masa anormal de células cuyo crecimiento lo hace sin coordinación con respecto a las células normales, persistiendo de forma excesiva, luego de cesar el agente que desencadenó su transformación. Tales células tumorales son producto de la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por algún agente físico, químico, o biológico (Yokota, 2000; Keleg y col, 2003).

Estos agentes pueden ocasionar tumores de origen monoclonal / policlonal y conforme avanza el proceso de transformación celular, hacia estados oncológicos más avanzados debido a alteraciones genéticas adicionales, se va generando una población heterogénea de células con características genotípicas y fenotípicas distintas (Baserga y De-Vita; 1993, Ames y col, 1995; Yocota, 2000; Keleg y col, 2003; Gibbs,2003). La producción de múltiples subpoblaciones de células tumorales con diversidad genética, metabólica, bioquímica e inmunológica, les proporciona diferentes propiedades angiogénicas, invasivas y metastásicas (De-Vita, 1997; Gershenwald y Fidler, 2002). Tales tumores, gozan de relativo grado de autonomía debido a que crecen de manera independiente del microambiente local y del estado nutricional del huésped (Weinberg, 1996). De los principales cánceres de tejidos sólidos descritos, las neoplasias epiteliales (carcinomas) son de los más comunes y potencialmente capaces de generar tumores primarios o secundarios (Stanley y Vinay 1989; Thiery y Chopin, 1999; Edwards, 1999).

## MARCO TEÓRICO

Los individuos están formados por células organizadas formando tejidos, órganos y sistemas. El crecimiento celular es un proceso cuidadosamente regulado que responde a las necesidades específicas del cuerpo. La división celular, regulada por moléculas que pueden inducir la proliferación celular, efectos mitogénicos o un estado de quiescencia, mantiene el equilibrio que existe entre las células que se pierden y las que se producen en un organismo. En un animal joven, la multiplicación celular predomina sobre la muerte celular, de manera que el animal aumenta de tamaño; en el adulto, el proceso de división celular y el de muerte celular se encuentran en equilibrio, dando lugar a un estado estacionario. Para algunos tipos celulares adultos, la renovación es rápida: las células intestinales tienen una vida media de pocos días antes de morir y ser reemplazadas; ciertos glóbulos blancos también son rápidamente sustituidos. En cambio, los glóbulos rojos humanos tienen una vida media de 100 días aproximadamente, las células de un hígado sano raramente mueren y, en adultos, se produce una pérdida lenta de células cerebrales con una renovación escasa o nula (Darnell y Baltimore, 1995).

En los animales la proliferación de la mayoría de las células depende de una combinación específica de factores de crecimiento. De este modo un número pequeño de factores de crecimiento pueden servir, en combinaciones diferentes, para regular selectivamente la proliferación de cada una de las diferentes clases de células de un animal superior.

Aunque algunos factores están presentes en la circulación, la mayoría de ellos se originan en células vecinas de la célula afectada y actúan de mediadores locales. Además de los factores de crecimiento que estimulan la división celular, existen factores, como los pertenecientes a la familia de factores de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ), que en algunas células estimulan la proliferación celular y en otras las inhiben. La mayoría de los factores de crecimiento efectúan muchas otras acciones además de la regulación del crecimiento y la división

celular: pueden controlar la proliferación, la supervivencia, la migración o el funcionamiento de las células, dependiendo de las circunstancias. En seguida se enlistan algunos factores de crecimiento (Tabla 1)(Alberts y col, 2002).

Tabla 1. Factores de crecimiento y sus funciones.

Factor	Actividades representativas
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Estimula la proliferación de células del tejido conjuntivo y de algunas células neurogliales.
Factor de crecimiento epidérmico(EGF)	Estimula la proliferación de muchos tipos celulares; actúa como señal inductora durante el desarrollo embrionario.
Factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1)	Estimula la supervivencia celular; estimula el metabolismo celular; colabora con otros factores de crecimiento estimulando la proliferación celular.
Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )	Potencia o inhibe la respuesta de la mayoría de las células a otros factores de crecimiento, dependiendo del tipo celular; regula la diferenciación de algunos tipos celulares; actúa como señal inductora durante el desarrollo embrionario.
Factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF)	Estimula la proliferación de muchos tipos celulares; inhibe la diferenciación de varios tipos de células madre; actúa como señal inductora durante el desarrollo del embrión.
Interleucina-2 (IL-2)	Estimula la proliferación de los linfocitos T activados
Factor de crecimiento neuronal (NGF)	Estimula la supervivencia y los procesos de prolongación de las ramificaciones nerviosas de algunas clases específicas de neuronas.
Eritropoyetina	Estimula la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de precursores de los glóbulos rojos de la sangre.
Interleucina-3 (IL-3)	Estimula la proliferación y la supervivencia de varios tipos precursores celulares sanguíneos.

Cuando una célula termina su ciclo de vida llega a la muerte, la cual puede presentarse de diferentes formas como son: necrosis o apoptosis. La apoptosis es un tipo particular de muerte celular, la cual puede ser distinguida por un patrón característico de cambios morfológicos y moleculares. Debido a una deshidratación rápida, las células originalmente esféricas llegan a presentar una forma elongada o

convolucionada y disminuyen su tamaño. La condensación y pérdida de la estructura distintiva de la cromatina se presentan al mismo tiempo de la contracción celular, inicia en la periferia del núcleo y es seguida por la fragmentación nuclear. Los fragmentos nucleares junto con los constituyentes del citoplasma, incluyendo organelos intactos son empacados en los llamados cuerpos apoptóticos, los cuales, envueltos en la membrana plasmática, se separan de la célula muerta. En vivo estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas sin provocar una respuesta inmune.

El incremento en la concentración de calcio citoplasmático y la activación de las proteasas, así como endonucleasas, las cuales degradan el ADN en las secciones internucleosomales, son también eventos característicos de la apoptosis. También es típica la activación de algunos genes que se sugiere, sus productos son requeridos para que la apoptosis se presente. Cuando los estados de la apoptosis avanzan, la integridad estructural y funcional de la membrana celular, la mitocondria y lisosomas es preservada. Considerando todos los cambios que ocurren en la célula que experimentan apoptosis la característica más común de éste proceso es la participación activa de la célula en su muerte. La célula activa una cascada de eventos moleculares que resultan en una degradación ordenada de los constituyentes celulares con un impacto mínimo en las células vecinas (Studzinski, 1995).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es definida frecuentemente como un fenómeno pasivo y degenerativo como consecuencia de un trauma ambiental. El evento primario en la necrosis es un hinchamiento de la mitocondria seguida de la ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático. Involucra cambios en la membrana plasmática conduciendo a una pérdida en el balance de los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Na}^+$ , que presentan un influjo al tiempo que se presenta una pérdida de  $\text{K}^+$ , seguido por una acidosis, un trauma osmótico, condensación de cromatina y los patrones característicos de picnosis nuclear. El cambio inicial resulta en la dilatación del retículo endoplásmico y un incremento

del volumen celular. Las células alteran su forma y pueden formar un abultamiento en la superficie probablemente como un resultado de cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  afectando los componentes del citoesqueleto. En éste estado la mitocondria pierde la matriz granulosa llegando a presentar una apariencia densa y la membrana interna se contrae alejándose de la membrana externa. Hay un agrupamiento de la cromatina nuclear característica de picnosis y un declive de la síntesis de proteínas. Esta fase reversible de hinchamiento hídrico es seguida por un rápido cambio irreversible que involucra un hinchamiento de alta amplitud de la mitocondria. Tanto los compartimentos interno como externo de la mitocondria llegan a estar muy distendidos y aparecen deposiciones de lipoproteínas de la matriz. La activación de fosfolipasas unidas a membrana por el calcio es probablemente la principal causa de perturbación celular durante la fase final de muerte celular necrótica (Studzinski, 1995) debido a una pérdida precipitada de fosforilación oxidativa y un descenso en la producción de ATP con la consecuente pérdida de la capacidad sintética y homeostática. Una sobrecarga de calcio conduce a la disfunción de la membrana mitocondrial guiando finalmente a un estado de daño irreversible. La autólisis secundaria sigue involucrando hinchamiento de los lisosomas, dilatación y vesiculación del retículo endoplásmico, una pérdida de enzimas y proteínas y una pérdida resultante de compartimentalización celular (Bowen y Bowen, 1990).

La necrosis se presenta generalmente en respuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos como hipoxia, hipertermia, hipotermia, infecciones virales líticas y venenos, observándose que ciertos tipos celulares responden a concentraciones farmacológicas de algunos medicamentos. Tal estímulo letal incrementa generalmente la permeabilidad de la membrana plasmática con cambios estructurales que afectan los poros y canales de la membrana o por inhibición de las bombas de iones de la membrana. Mientras que una participación activa de la célula afectada involucra la síntesis de proteínas de *novo*, característica esencial, en la apoptosis, la necrosis es un fenómeno degenerativo, cuya consecuencia final

es la liberación del contenido citoplasmático hacia el exterior, con la consecuente respuesta inflamatoria (Bowen y Bowen, 1990).

Por otro lado, ocasionalmente, los controles que regulan la multiplicación celular no funcionan adecuadamente y una célula empieza a crecer y a dividirse, aunque el cuerpo no necesite más células de ese tipo. Cuando las descendientes de esta célula heredan la tendencia a crecer sin responder a regulación alguna, el resultado es un clon celular capaz de expandirse indefinidamente. Finalmente ese clon de células no deseadas puede formar una masa llamada tumor. Dado que los tumores pueden tener efectos devastadores en los individuos que los padecen, muchos estudios están dirigidos a comprender cómo se forman.

## **Cáncer**

Cuando la estructura y función de un tejido u órgano son modificadas, los cambios se pueden deber a alteraciones a nivel celular. Tales cambios en la célula son provocados por la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos, o biológicos (Yocota, 2000), tales como radiación ultravioleta, emisiones radiactivas e infección recurrente con organismos patógenos, así como la exposición a compuestos químicos carcinogénicos (Weinberg, 1996). El desarrollo de una célula con crecimiento y características anormales puede generar un tumor, el cual derivará a partir de una célula que presenta alteraciones que han sido seleccionadas y transmitidas y que provocan un descontrol en el ritmo de la división celular, así como una mejor adaptación a condiciones de bajas concentraciones en nutrientes y cambios en las características morfológicas debidas a una perturbación de los procesos de diferenciación, alterando con ello, la homeostasis del organismo (Alberts, y col, 2002).

Las células de los tumores malignos presentan dos características que las distinguen de las normales: se reproducen de manera descontrolada y son capaces de invadir y colonizar tejidos y órganos distantes.

Los tumores se clasifican generalmente según el origen de las células de donde surgen y se agrupan en: 1)carcinoma, aquellos cuyo origen son las células epiteliales; 2)sarcomas, cuyo origen son las células del tejido conectivo y las células musculares, y 3)aquellos que no se ajustan a ninguna de las dos categorías anteriores y que incluyen la leucemia y los tumores del sistema nervioso.

Aun cuando un individuo presenta un cáncer diseminado y con múltiples metástasis, en la mayoría de las ocasiones su origen puede ser trazado a un tejido y a un tipo histológico precisos, a partir de donde se originaron y se diseminaron todas y cada una de las células tumorales hacia los distintos lugares que ahora colonizan. Es decir, todas las células del tumor y su metástasis se originan, en la mayoría de las ocasiones, a partir de una sola célula aberrante o anormal (Jiménez y Merchant, 2003).

Para diseminarse ampliamente por el cuerpo, las células de un tumor sólido típico han de ser capaces de disminuir su adhesión, escapar del tejido de origen, atravesar otros tejidos hasta llegar a un vaso sanguíneo o linfático, cruzar la lámina basal y el revestimiento endotelial del vaso para entrar a la circulación, salir de la circulación en otra parte del cuerpo y sobrevivir y proliferar en el nuevo entorno en el que se encuentre, siguiendo un proceso similar al que sufrieron en el tumor primario, en el que varios factores de crecimiento juegan un papel importante (Alberts y col, 2002). La interrupción en cualquiera de los pasos de la cascada de eventos para llegar a la metástasis puede prevenir clínicamente el desarrollo evidente de la misma. De hecho, la diseminación de la metástasis es un proceso muy ineficaz. Se ha demostrado que aunque pueden soltarse varios millones de células tumorales en el sistema vascular, sólo una proporción pequeña de éstos (menos de 0.01%) podrá formar tumores secundarios con éxito (Fidler y

col, 1999, Liotta, 2001). En humanos muchos de los carcinomas y otros tumores sólidos no se diagnostican hasta un estadio relativamente tardío. Los cánceres de cérvix uterino (CaCu) proporcionan un ejemplo de esto.

## **Cáncer de Cérvix**

Este tipo de cáncer deriva del epitelio cervical multilaminar, que tiene una organización similar a la de la epidermis de la piel. Normalmente la proliferación se produce solo en la capa basal, generando células que entonces se desplazan hacia la superficie exterior, diferenciándose a lo largo de este desplazamiento de células aplanadas ricas en queratina, que no se dividen y que finalmente se descaman de la superficie. Sin embargo, cuando se examinan muchas muestras de este epitelio, obtenidas de diferentes mujeres, no es raro encontrar placas de displasia, en las que las células en división no están confinadas en la capa basal, y además se presenta algún desorden en el proceso de diferenciación.

El CaCu es considerado la neoplasia con mayor índice de mortalidad en el Mundo, así como en nuestro país, y afecta a un gran número de mujeres en edad reproductiva (Meneses y Cos-A, 1994; Muños y Bosh, 1997). Esta enfermedad es transmitida sexualmente, por lo que, la edad de inicio de las relaciones sexuales y el número de parejas sexuales constituyen los dos factores de riesgo más importantes. Además, existen otros factores que influyen en la susceptibilidad para desarrollar el cáncer cervical: nutrición, competencia inmunológica, metabolismo hormonal, regímenes hormonales, entre otros (Muñoz y Bosch, 1997).

Desde la década de los 60's, se detectó la relación de infecciones virales con algunos tipos de tumores, como lo son el herpes y el citomegalovirus, lo que llevó a pensar en que existía una etiología viral para el cáncer cervicouterino (Werness, 1995). Los papilomavirus, por ejemplo, son la causa de las verrugas en los seres humanos y también están implicados en carcinomas del cuello uterino. Son parientes lejanos de la familia de poliomavirus que incluye al SV40, y el

cáncer que causan en humanos requiere que algunos genes de replicación del virus se integren en el cromosoma huésped.

A pesar de los avances en los métodos de detección y tratamiento de lesiones precancerosas en el cáncer cervical, en los numerosos estudios epidemiológicos el alto riesgo de desarrollar cáncer cervical está asociado a varios parámetros del comportamiento sexual y a un agente infeccioso transmitido sexualmente, implicado en la etiología de este cáncer. Este agente es el papilomavirus humano (HPV), el cual infecta el tracto genital de hombres y mujeres con alta frecuencia, dando pie a diversas lesiones morfológicas.

Muchas líneas celulares provenientes de carcinomas cervicales presentan HPV tipo 16, 18 o secuencias virales relacionadas a estos dos tipos (Braun y col, 1990). Los HPV tipo 16 y 18 están asociados con un alto riesgo de convertirse en tumor maligno, mientras que los tipos 6 y 11 siempre están asociados con una proliferación benigna de células epiteliales (Demers y col, 1996).

En todos los cánceres cabe esperar que participe una alteración de las restricciones normales sobre la proliferación celular; para cada tipo celular existe un número finito de mecanismos por los que se puede producir esta alteración. De hecho, parece que en el cáncer los responsables de la mayor parte de la desregulación de la división celular son algunos cambios en un grupo relativamente pequeño de genes. La identificación y caracterización de muchos de estos genes ha sido uno de los grandes triunfos de la biología molecular.

La proliferación celular puede estar regulada directamente a través del mecanismo que determina si una célula pasa el punto de restricción o inicio del ciclo de división celular, o indirectamente, por ejemplo, a través de la regulación del mecanismo que somete la célula a diferenciación celular o muerte celular programada. En cualquier caso, los genes reguladores normales pueden clasificarse, de forma laxa, en aquellos cuyos productos ayudan a estimular la proliferación celular y aquellos cuyos productos ayudan a inhibirla. Por lo tanto

existen dos caminos de mutación hacia la proliferación celular incontrolada y la invasividad que son características del cáncer.

Los genes implicados en la carcinogénesis se dividen en dos amplias categorías: genes supresores de tumor y los oncogenes. Los genes supresores de tumor codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y evitan que las células se malignicen, es decir consiste en inactivar un gen inhibidor: este tipo de mutación tiene un efecto recesivo –para que la célula quede libre de la inhibición es necesario que las copias del gen en la célula estén inactivadas o delecionadas.

Entre los genes supresores de tumor se encuentran Rb y p53; Rb participa en el desarrollo de muchos tipos de cánceres, no solo de los que son dependientes de virus y el otro gen supresor de tumores que las proteínas víricas inactivan, se denomina p53 (por su masa molecular de 53 kilodaltons). Los oncogenes, promueven la pérdida de control del crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno, es decir consiste en conseguir que un gen que induce a que la célula prolifere en respuesta a un estímulo, se vuelva hiperactivo, sobreexpresándose, dando como consecuencia una división celular descontrolada. Este tipo de transformación tiene un efecto dominante, donde es suficiente con que el cambio afecte a una de las dos copias del gen en la célula; el gen alterado se denomina un oncogén (siendo el alelo normal un proto-oncogén; del griego onkos, tumor).

Los oncogenes pueden identificarse directamente tomando DNA procedente de células tumorales y buscando fragmentos que cuando se introducen en células normales les hagan comportarse como células tumorales. A finales del año 1970 se diseñaron técnicas que permitieron alcanzar este propósito, estos se desarrollaron después de estudiar algunos procesos similares que ocurren de manera natural, cuando los virus trasladan su material genético desde una célula a otra. (Alberts y col, 2002; Gerald,1998).

## **Mecanismos reguladores de la proliferación celular.**

La proliferación celular está gobernada por la influencia de factores activadores e inhibidores. Ambos factores interactúan con receptores localizados en la superficie celular para influir sobre el metabolismo y la decisión final de las células para dividirse o no (Johnson, 1994). Entre los factores inhibidores destacan el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), los interferones (IFNs) y la interleucina 1 (IL-1). La regulación negativa de la proliferación celular no está restringida a la familia de las citocinas, pero hasta ahora éstos son los que ofrecen los mejores modelos para estudiar este fenómeno. Se ha postulado que el resultado final entre proliferación o detener el ciclo celular, es una consecuencia de una interacción compleja entre los procesos estimuladores e inhibidores activados por estos factores (Weinberg, 1989). Estos factores se han agrupado en 3 categorías: los factores de competencia, que sacan a las células de su estado de reposo G<sub>0</sub>; factores de progresión, que arrancan el ciclo celular permitiendo el paso de G<sub>1</sub> a S; factores antiproliferativos que aún en presencia de factores de competencia y de progresión, son capaces de interrumpir el paso de G<sub>1</sub> a S (López-Marure, 1997).

### **TGF- $\beta$**

Los factores de crecimiento- $\beta$  transformantes (TGF- $\beta$ , del inglés Transforming Growth Factors - $\beta$ ) constituyen una familia de mediadores locales que regulan la proliferación y otras funciones de la mayoría de los tipos celulares de los vertebrados. Los cinco miembros de la familia (TGF- $\beta$ 1 al  $\beta$ 5) son proteínas de estructura y función similar.

La proteína activa del TGF- $\beta$ , es un dímero constituido por dos cadenas de 112 aminoácidos unidas a través de un puente disulfuro; constituyendo así, una

masa molecular aparente de 25 kDa (Meager, 1991;Karp, 1996; Margi, 1996). El TGF- $\beta$  tiene acciones diversas y efectos opuestos dependiendo del tipo celular y condiciones microambientales; es capaz de controlar la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la producción y degradación de la matriz extracelular (Moses y col, 1990; Chávez, 1997; Kretschmar y Massagué, 1998). Actúa sobre los monocitos/macrófagos y los precursores hematopoyéticos (Margni, 1996). El TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento y la actividad de las células NK y puede disminuir la función de las células B al inhibir su crecimiento y la secreción de IgM (anticuerpo de la respuesta primaria) e IgG (anticuerpo de la respuesta secundaria). Además se ha demostrado que las células mononucleares de sangre periférica provenientes de individuos infectados con el HIV (virus de la inmunodeficiencia humana), son capaces de sobre-expresar el TGF- $\beta$  (Richards y col, 1998).

### **Efectos del TGF- $\beta$ en células tumorales**

Se ha comprobado que las varias isoformas del TGF- $\beta$  entre ellas el TGF- $\beta$ 1, son potentes inhibidores del crecimiento en células epiteliales normales (Landesman y col, 1997; Azuma y col, 1999; Lee y col, 1999). Esta inhibición en el crecimiento se demuestra en epitelios normales de mama de rata (1-10 ng/mL), en cultivos de epitelios de traquea de rata (1-50 pM), en epitelios de mama de ratón y en epitelios normales de próstata humana (líneas PN1 y PN2) (Arteaga y col, 1996; Antoshina y Ostrowski, 1997; Cipriano y Yong, 1998; Viegas y col, 1999; Wikstrom y col, 1999). Las varias isoformas del TGF- $\beta$  se han documentado como potentes inhibidores del crecimiento de células epiteliales tumorales (Landesman y col, 1997; Kimura y col, 1999; Azuma y col, 1999). El TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento de carcinomas de tiroides, queratinocitos orales humanos (línea HaCaT), células de carcinoma gástrico (líneas SNU-16 y SNU-620), células de carcinoma de mama (líneas MCF-7 y ZR-751), células epiteliales intestinales de rata (líneas RIE-1 y IEC-6) y a las líneas de epitelio de visón Mv1Lu y CCL64 (Longstreet y col, 1992; McGee y col, 1995; Mark y col, 1995; Danforth y Sgagias, 1996; Wu y col, 1996; Ko y col, 1998; Kang y col, 1999; Kimura y col,

1999). Asimismo, en la línea ectocervical humana ECE 16-1 inmortalizada con el HPV-16, con concentraciones de 10-100pm/mL-48 h con TGF- $\beta$ 1 suprime su crecimiento y a concentraciones mayores de 100 pm/mL, la lleva a la muerte por apoptosis (Rorke y Jacobberger, 1995). Además inhibe el crecimiento e induce la apoptosis en epitelios inmortalizados de esófago humano (línea HET-1 transfectada) (Okamoto y col, 1994).

## **TNF- $\alpha$**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pertenece al grupo de las citocinas. El TNF- $\alpha$ , además de las propiedades típicas de una citocina, es una proteína con actividad reguladora de la proliferación celular, cuya actividad está determinada por el tipo celular al que se liga y a la presencia de otras proteínas reguladoras . Puede ser un importante mediador inflamatorio, regulando la actividad de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T y B y modulando las propiedades del endotelio vascular (Aggarwal, 1992).

El TNF- $\alpha$  presenta actividad biológica cuando se presenta como un trímero con subunidades de 17 kDa, pero éste, es primeramente producido en la célula como un propéptido de 26 kDa que se encuentra en la membrana celular donde es biológicamente activo. La estructura de esta proteína es parecida a la de algunas otras citocinas, que son cortadas para dar la forma de 17kDa (Kriegler y col 1988).

El TNF- $\alpha$  puede estimular la proliferación de varias líneas fibroblásticas diploides humanas y algunas líneas celulares tumorales, (Balkwill, 1988). Esta acción es sinérgica con el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Insulina (Vilcek y col, 1988).

Paradójicamente el TNF- $\alpha$ , puede tener una fuerte acción inhibidora en algunos tipos celulares cuando éstas han sido metabólicamente comprometidas

por inhibidores de ARN o de síntesis de proteínas o virus. Es también tóxico para algunas células transformadas y podría suprimir la formación de colonias de algunas células hematopoyéticas normales, tanto de humano como de ratón *in vitro*, (Fiers y col, 1987). Algunas líneas celulares epiteliales humanas son resistentes a la acción citotóxica del TNF. La capacidad del TNF- $\alpha$  para ser mitogénico, citostático o citotóxico, es además dependiente de una serie compleja de eventos extracelulares e intracelulares (Sugarman y col, 1987).

Existen dos tipos de TNF, la molécula alfa y la beta (TNF- $\alpha,\beta$ ). Ambas tienen propiedades y funciones muy similares, sólo que el TNF- $\alpha$  es producido por macrófagos y el TNF- $\beta$  por linfocitos activados.

El TNF- $\alpha$  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. Paradójicamente también participa en procesos benéficos de la defensa del organismo y el mantenimiento de la homeostasis del tejido. Induce una gran variedad de respuestas celulares: promueve o inhibe la proliferación, induce citotoxicidad, e induce o previene la diferenciación celular. In Vitro, estimula el crecimiento de fibroblastos diploides normales: sin embargo, en líneas celulares transformadas inhibe la proliferación e induce citotoxicidad.

### **Efecto del TNF- $\alpha$ en células tumorales**

El TNF- $\alpha$  ha sido descrito como un poderoso inductor de muerte por necrosis en varios tumores malignos y benignos, e inclusive puede matarlos por apoptosis (Giora y col, 1991; Bogin y col, 1998). Se ha demostrado, que con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  se reduce la expresión del gene c-myc en células HeLa y las detiene en la fase G1 del ciclo celular (Yarden y Kimchi 1986). Las líneas de carcinoma de pulmón MRC-5 y de mama MCF-7, han demostrado resistencia a la inhibición de la proliferación al ser tratadas con el TNF- $\alpha$  . (Jian y Porter, 1998).

Sin embargo, Gerritsen y col, (1998) han encontrado que el TNF- $\alpha$  es capaz de inhibir el crecimiento de las células MCF-7. La inhibición del crecimiento en las células tumorales inducido por el TNF- $\alpha$  se observa en cáncer de páncreas humano (Tsutomu y col, 1998)

## **IFN- $\gamma$**

El interferón- $\gamma$  fue descubierto por los virólogos y los inmunólogos como una proteína antiviral derivada de la célula T, y como un activador de las funciones de los macrófagos inducida por la célula T<sub>H1</sub> (subpoblación de linfocitos T cooperadores) (Abbas y col, 2002). El nombre de interferón se le atribuye a que en 1930 se descubrió que ejercía un fenómeno de interferencia viral. Desde entonces, se han catalogado tres clases: el interferón de leucocitos (IFN- $\alpha$ ), el interferón de fibroblastos (IFN $\beta$ ) y el interferón inmune (IFN- $\gamma$ ) (Mire-Sluis y Thorpe, 1998).

El IFN- $\gamma$ , es una glucoproteína homodimérica de 21-24 kDa (Abbas y col, 2002). Los interferones son elaborados por las células en respuesta a virus, antígenos o mitógenos pero también se les han atribuido otras funciones como factores inmunomoduladores, supresores de proliferación y diferenciadores (Kurzrock y col 1991); el efecto antiproliferativo del IFN- $\gamma$  en células tumorales parece estar mediado por linfoquinas, aunque se piensa que sus mecanismos de inhibición pueden ser desencadenados a través de inducción de enzimas antivirales, inducción de genes supresores pero de función y estructura desconocidos. Este factor modula la producción de oncogenes, regula la expresión de genes de factores de crecimiento, ejerce una acción directa sobre oncogenes y aumenta las defensas del huésped (Kurzrock y col 1991; Foxwell y col, 1992).

## **IL-1**

La interleucina-1 se definió en primer lugar como un polipéptido derivado de los fagocitos mononucleares que aumenta las respuestas de los timocitos a los activadores policlonales, es decir, como un coestimulador de la activación de la célula T. Aunque, la IL-1 se descubrió como un co-estimulador de las células T, ahora se sabe que la principal función de la IL-1, es como mediadora de la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad natural. La principal fuente celular de IL-1, es el fagocito mononuclear activado (Abbas y col, 2002)

La interleucina  $1\beta$  (IL $1\beta$ ) por su parte, estimula la proliferación de fibroblastos, células musculares, queratinocitos, células gliales, linfocitos T y B, así como precursores hematopoyéticos, induce actividad procoagulante y adhesividad de células endoteliales entre otras funciones (Dower y col, 1992); ha mostrado detener la proliferación de miocitos y fibroblastos cardiacos, además de su efecto inhibitor en células transformadas de músculo liso y astrocitos (Palmer y col, 1995), también se ha reportado que inhibe la proliferación de células tumorales provenientes de cáncer ovárico ( Kilian y col, 1991).

## **Respuesta inmune**

El organismo debe protegerse constantemente frente a una gran variedad de microorganismos vivos u de otros cuerpos extraños, que pueden acceder a su interior a través de la piel, el intestino, el aparato respiratorio y otras vías. En el organismo existen tres mecanismos de protección: la protección de superficie, las reacciones agudas y la respuesta inmunitaria.

Los encargados de la protección de superficie del organismo son la queratina de la piel, el moco de los aparatos respiratorio y digestivo y el medio ácido de la vagina. Estos mecanismos son inespecíficos.

La inflamación aguda es una respuesta organizada de los tejidos frente a cuerpos extraños de cualquier naturaleza, que son destruidos o neutralizados por neutrófilos que migran hacia los tejidos desde los vasos sanguíneos locales. Es inespecífica y evoluciona siempre de la misma manera, independientemente de cual sea el factor que la haya desencadenado.

La respuesta inmunitaria, a diferencia de la protección de superficie y de inflamación aguda, es específica y esta dirigida a grupos químicos que se encuentran en la composición de los agentes invasores o extraños.

Los tejidos y las células especializadas encargados de desarrollar la respuesta inmunitaria son los componentes del sistema inmune. Este sistema depende para su funcionamiento de que el organismo reconozca como extraños los materiales exógenos. Cualquier sustancia extraña reconocida de este modo se denomina antígeno.

Este proceso de reconocimiento activa, posteriormente, el sistema inmune, para neutralizar o destruir el antígeno, siendo los linfocitos las células que desempeñan el papel central de esta respuesta inmunitaria.

Si bien la respuesta inmune se puede desarrollar en cualquier tejido del organismo, el crecimiento, el mantenimiento y la programación de las células inmunitarias se llevan a cabo sobre todo en los ganglios linfáticos, el bazo, el timo y la médula ósea, que son los órganos del sistema inmunitario las células que desempeñan el papel central de esta respuesta inmunitaria (Stevens y Lowe, 1995).

El sistema inmune está formado por dos grupos fundamentales de células. Por un lado macrófagos y células similares que actuando en forma inespecífica participan en la captación del antígeno, su procesamiento y

presentación para el reconocimiento por los linfocitos, células con actividad específica. Algunas estirpes de estas células sólo son capaces de reconocer el antígeno por contacto directo, cuando les es presentado por el macrófago en forma adecuada; otras secretan moléculas denominadas anticuerpos, poseedoras de estructuras especiales, que pueden unirse al antígeno específicamente y neutralizar su efecto agresor. A las células capaces de interactuar específicamente con el antígeno o de secretar moléculas que puedan hacerlo se les denomina *inmunocompetentes*, y a las que participan en otras etapas de la respuesta inmune *células accesorias*.

Las células del sistema inmune se originan durante la hematopoyesis, proceso por el cual a partir de células indiferenciadas multipotentes o “Stem cells” y en función del microambiente que las rodea, estas células pueden diferenciarse en distintas líneas celulares: mieloide, linfoide, eritoblastoide, monocitoide, megacariocitoide. Aquellas células de la serie linfoide originadas durante este proceso constituyen el componente celular específico del sistema inmune.

Durante el desarrollo óseo de la células mesenquimales surgen por un lado los osteoblastos y osteoclastos y por el otro las células indiferenciadas o “*stem cells*” pluripotentes.

## **Linfocitos**

A partir de las células seminales hematopoyéticas se derivan las distintas estirpes de linfocitos o células inmunológicamente competentes. En los mamíferos, entre el 0.5% y 10% de las células producidas diariamente son linfocitos, muchos de los cuales mueren en pocos días, mientras que algunos se mantienen como células de larga vida (células con memoria).

Existen poblaciones de linfocitos funcionalmente distintas, hecho relacionado con el órgano linfoide primario en el que han adquirido competencia

inmunológica. Entre estas células los linfocitos B (LB) son los productores de anticuerpos o inmunoglobulinas; los linfocitos T (LT), en cambio carecen de esa propiedad. Los LT *efectores* como los LT citotóxicos (Tc) o citolíticos (CTL) que matan y destruyen aquellas células *blanco* que expresan epitopes extraños en su superficie, o *reguladores* como los linfocitos T cooperadores o helper (Th) que ayudan a los LB y Tc a cumplir su función eficientemente.

Los linfocitos T y B no son diferenciables morfológica ni histoquímicamente, pero puede hacerse a través de la detección, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos, que reconocen los marcadores de membrana propios, que cada uno de ellos expresa. Si una célula indiferenciada, inmunológicamente incompetente, adquiere competencia inmunológica en el ambiente de la bursa de Fabricius (aves) u otros órganos linfoides primarios de otros vertebrados (médula ósea, placas de Peyer, amígdalas, apéndice cecal), la célula resultante será un linfocito B. Si lo hace en el ambiente del timo, el producto de diferenciación será un linfocito T.

## **Linfocitos B**

Durante el proceso de diferenciación los linfocitos B evolucionan, a partir de células seminales hematopoyéticas, en célula Pro-B o precursor B inmaduro, célula Pre-B, linfocito B inmaduro y linfocito B maduro, el que a su vez puede diferenciarse en célula plasmática.

Los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad llamados HLA-DR son moléculas que se expresan en los linfocitos B desde los comienzos de su diferenciación y perduran durante todo el linaje de las células B, dejando de hacerlo en los plasmocitos.

Los linfocitos B maduros se localizan en diferentes órganos linfoides secundarios, pasando a formar parte de la población de linfocitos B recirculantes, los que están en condiciones de responder a un estímulo antigénico. El 20 % de

estas células se encuentran en sangre periférica; el 70%, repartido aproximadamente en partes iguales, en el bazo, zona folicular de los ganglios linfáticos y conducto torácico; el resto en médula ósea y amígdalas.

## **Linfocitos T**

Las células indiferenciadas que migran al timo encuentran el microambiente para su diferenciación en linfocitos T. Estas células pueden participar en ciertos mecanismos inmunológicos como el rechazo de injertos, reacciones de hipersensibilidad retardada, reacciones de injerto contra huésped, defensa contra virus y células tumorales, o en procesos de regulación de la respuesta inmune.

La etapa de maduración tiene lugar en la zona medular del timo (timocito común), y en su inicio incorporan nuevos antígenos y marcadores de membrana: CD1, CD4 y CD8. La denominación de timocito común proviene de que estas células expresan ambos marcadores CD4 y CD8, en una etapa posterior de diferenciación se diferencian en dos grupos: el que expresa CD4 y el que expresa CD8 (Roitt y Delves, 2003).

CD4 y CD8 son proteínas de la célula T que se unen a las moléculas del Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y que transducen señales que, junto con señales transmitidas a través del complejo RCT (receptor de la célula T), inician la activación de la célula T. Las células T maduras expresan CD4 o CD8 pero no ambas. Estas dos proteínas interaccionan con moléculas del MHC en el momento en el que los receptores del antígeno de las células T reconocen específicamente complejos peptido-molécula del MHC presentes en las células presentadoras de antígenos (CPA). La principal función de CD4 y CD8 es la transducción de señales en el momento del reconocimiento del antígeno; también pueden reforzar la unión de las células T a las CPA. Debido a que ambas

proteínas actúan junto con el RCT de moléculas del MHC y en la activación de las células T, a menudo reciben el nombre de correceptores. Aproximadamente el 65% de las células T  $\alpha\beta$ -positivas maduras expresa CD4 y el 35% expresa CD8.

La unión selectiva de CD4 a las moléculas de clase II del MHC y de CD8 a las moléculas de clase I del MHC garantiza que las células T CD4+ reconozcan y respondan a los antígenos peptídicos asociados a moléculas de clase II y que las células T CD8+ respondan a péptidos asociados a moléculas de clase I. (Abbas y col, 2002)

De la población total de células que se diferencian en el timo, solo el 5% sobrevive y pasa a circulación como linfocitos T maduros. A aquellos linfocitos que han madurado pero que no han sido impactados por el antígeno se los identifica como células vírgenes. Cuando un antígeno interacciona con un linfocito no estimulado (vírgenes) éste se diferencia a células efectoras/reguladoras, parte de las cuales perdurarán como células con memoria.

### **TGF- $\beta$ y linfocitos**

El TGF- $\beta$  es un factor supresor de la activación, la proliferación y la diferenciación de células T, B y NK (Buggins y col, 2001; Gorelik y Flavell, 2002). También se ha observado que la secreción del TGF- $\beta$  por parte de las células tumorales interfiere con la habilidad de generar linfocitos T citotóxicos (CTL) (Nagy y Vánky, 1998). De esta manera, el TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento y la actividad de las células NK (células asesinas naturales) y puede disminuir la función de las células B al detenerlas en la fase G1 del ciclo celular inhibiendo genes como c-myc, necesario para transitar hacia la fase S; e inclusive llevarlas hacia la apoptosis. Con ello, evita que una parte de la población de células B se diferencien hacia el linaje plasmático, y por lo tanto, abate la secreción de IgM (anticuerpo de la respuesta inmune humoral primaria) e IgG (anticuerpo de la respuesta inmune humoral secundaria) (Stavnezer, 1995; Manz y col, 2002).

También, el TGF- $\beta$  está involucrado en la regulación del desarrollo de células T en el timo (Stavnezer, 1995); a las células TCD4+ específicos a su antígeno las conduce hacia la apoptosis (Chang y col, 2003).

## **Ciclo celular**

El ciclo celular es un proceso altamente ordenado que termina con la duplicación y transmisión de la información genética de una generación celular a otra. Este está dividido en fases discretas: G1 es el periodo que sigue a la mitosis y la separa de la fase S; en ella especialmente al principio, ocurre una activa síntesis de ARN y proteínas además de otros componentes celulares por lo que la célula crece. S es un periodo que transcurre con síntesis de ADN, que se duplica, dado que se forma una copia exacta del mismo; la replicación del ADN no modifica el aspecto del núcleo celular. G2 es el periodo que sigue a la fase S y la separa de la mitosis, en este estadio tiene lugar un crecimiento ulterior, pero además actúa como periodo de seguridad durante el cual la célula controla y verifica que todo el ADN se haya duplicado en forma correcta antes de comenzar la mitosis. M es la fase que sigue a G2 y designa a la mitosis, que se divide en una serie de estadios parciales; profase, metafase, anafase y telofase. G0 se refiere a las células que se encuentran temporalmente o permanentemente fuera de ciclo. (De Robertis, 2000)

Durante el ciclo celular se deben completar los eventos de cada fase antes de pasar a la siguiente, por lo que existen puntos que monitorean la integridad del ADN y se encuentran en puntos estratégicos del ciclo: en G1 tardía y en la interfase G2/M para prevenir la propagación de células dañadas o mutadas.

Las células normales dependen de estímulos externos (mitogénicos o factores de crecimiento) para salir de G0 a G1, respondiendo con una cascada de fosforilaciones intracelulares en donde las ciclinas y las cinasas dependientes de

las ciclinas (CDKs) adquieren un papel fundamental. Los complejos ciclina/CDK fosforilan sustratos proteicos específicos, moviendo a la célula a través del ciclo con una activación de síntesis de ADN y formación de componentes estructurales específicos asociados a la mitosis. (Israels e Israels, 2000)

El ciclo avanza por G1 con un incremento en la expresión de las ciclinas D, que se asocian con CDK4 y CDK6, resultando en su fosforilación y activación; éstos ya activados, fosforilan a la proteína RB (retinoblastoma) que tiene un papel crítico en la regulación de la progresión del punto de restricción de G1. Los miembros de la familia RB son proteínas que secuestran a las proteínas de transcripción E2F, evitando que formen complejos con el ADN. En estado hipofosforilado, RB puede capturar a E2F evitando su actividad transcripcional.

Cuando RB es fosforilado por CDK4/6 se disocia de E2F y el ciclo continúa. Cuando la célula avanza por G1 tardía, hay también un aumento en la expresión de la ciclina E que es requerida acompañada con CDK2 para la transición de G1 a S, en esta transición, aumenta la expresión de la ciclina A y persiste durante S. La ciclina A es capturada por CDK2 y procede a la síntesis del ADN (Peralta y col, 1997 )

En el punto de control G2 se monitorea que el ADN se haya copiado correctamente y que esté completo, de no ser así, el ciclo es detenido hasta que el daño sea reparado, en caso de que el daño exceda la capacidad de la célula para repararlo el ciclo es abortado.

## JUSTIFICACIÓN

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 generar estrategias que les permiten evadir el ataque de las células inmunológicas o la capacidad de generar metástasis, procesos en que las citocinas juegan un papel determinante. 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. En el caso específico de las células tumorales provenientes del cérvix (Cáncer cervicouterino CaCu), poco se conoce sobre el papel que juegan las citocinas en el proceso de transformación celular, sin embargo, en nuestro laboratorio, se tienen evidencias de que estas células son capaces de secretar al medio un factor o factores con actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana, por lo que en este estudio se pretende aportar información sobre la naturaleza química del factor con actividad inhibidora de la proliferación presente en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales de CaCu, así como el de comparar su efecto con citocinas conocidas que presentan un efecto similar, con el propósito de poder descartar o adjudicar el efecto a citocinas como el TGF $\beta$  o el TNF $\alpha$ .

## HIPÓTESIS

Es conocido que las células tumorales son capaces de secretar moléculas o factores solubles que les permiten favorecer su supervivencia y división. Entre los factores reportados está el TGF $\beta$ , el TNF $\alpha$ , la IL-1, entre otras. En el caso particular del cáncer cérvico-uterino, donde se sabe que es un cáncer metastático y por lo tanto sugiere que dichas células tumorales han generado una estrategia para evadir la vigilancia inmunológica del hospedero, es posible que en dicha estrategia participe un factor o factores cuya acción directa o indirecta bloquee la acción de las células del sistema inmune, permitiendo su supervivencia y proliferación.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Evaluar el efecto de los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales HeLa y CaLo sobre cultivos de linfocitos humanos y determinar su naturaleza química, así como su efecto en la fase G1 del ciclo celular.

### Objetivos específicos:

- a) Establecer Cultivos de células tumorales HeLa y CaLo , así como de linfocitos de sangre periférica humana.
- b) Generar medio condicionado libre de suero proveniente de cultivos de células tumorales HeLa y CaLo.
- c) Determinar si los medios condicionados inhiben la proliferación de linfocitos humanos.
- d) Determinar sí la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos es de naturaleza proteica.
- e) Determinar el rango de peso molecular de la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos.
- f) Determinar si anticuerpos neutralizantes contra  $TGF\beta$  bloquean la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos humanos, presente en los medios condicionados.
- g) Determinar si la inhibición de la proliferación de linfocitos humanos presente en los medios condicionados detiene a las células linfocíticas en la fase G1 del ciclo celular.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Líneas Celulares**

El carcinoma CaLo (estadio IIB) proveniente de la biopsia de una paciente con cáncer cérvico-uterino (CaCu), fue gentilmente donada por el Dr. Monroy (FES Zaragoza-UNAM, México)(Monroy, 1991; Rangel y col, 1993). La línea de adenocarcinoma HeLa (estadio IVB metastásico), se adquirió del American Type Culture Collection (ATCC). Las células se mantuvieron al 5%(v/v) de SFB y se utilizaron cuando se encontraron en proliferación exponencial.

### **Cultivo De Linfocitos**

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de sangre periférica humana, con una jeringa estéril de 20 ml, la cual se humedeció internamente, de manera previa con heparina (5000 UI/ml, PISA, México). Posteriormente se procedió a extraer la muestra, de la vena del brazo de un voluntario sano en condiciones de ayuno.

Por otra parte, se depositaron 5 ml de Ficoll-Hypaque (densidad de 1.077, +/- 0.001) (Sigma, E.U.), en cada uno de tres tubos de vidrio fondo cónico; inmediatamente se agregaron 5-6 ml de la muestra de sangre a cada uno de los tubos por las paredes, de forma lenta para lograr la formación de dos fases. Se centrifugaron los tubos durante 35 min., los primeros 5 minutos a 500rpm y posteriormente se incremento la velocidad a 1000rpm por 5 minutos mas, dejando una velocidad de 1500 rpm para los minutos restantes. Finalmente se obtuvieron cuatro fases en la columna del tubo: Una al fondo de color rojo que contenía eritrocitos, seguida de una fase incolora que correspondía al Ficoll-Hypaque; inmediatamente se pudo apreciar un delgado anillo de color blanco, constituido por las células leucocíticas y en la superficie una fase de color amarillo, en la cual se encuentra el plasma sanguíneo.

Se procedió a coleccionar el anillo blanco con la ayuda de una micro pipeta de 1000µl, evitando extraer lo menos posible del liquido de las fases adyacentes; la muestra de linfocitos fue depositada en otro tubo de vidrio fondo cónico, para ser lavados vía centrifugación a 1500 rpm/5 minutos con 10 ml de RPMI-1640, al final

de esta operación se retiró el sobrenadante por decantación y las células fueron resuspendidas con RPMI-1640, para repetir la operación.

Finalmente, las células obtenidas fueron sembradas en una caja petri con RPMI-1640 y suplementados con SFB al 20% (v/v), manteniéndose en condiciones de cultivo por 1 hora, con el propósito de eliminar a las células adherentes y sólo coleccionar aquellas células en suspensión, que representan en un 95-98% a las células linfocíticas, listas para ser utilizadas en los ensayos biológicos.

### **Viabilidad celular por método de exclusión por azul tripano**

El colorante azul tripano es capaz de penetrar al interior de las células cuya membrana celular está dañada (células muertas por necrosis). En tanto que las células que no son teñidas son consideradas como viables; por lo tanto se cuantificó la viabilidad celular por la técnica de exclusión por tinción con azul tripano (Sigma Co. E.U.), para esto se diluyó un volumen conocido del cultivo linfocítico en proporción 1:1 con el colorante azul tripano y se observó al microscopio, a través de una cámara de Neubauer (Boeckel Co). El porcentaje de las células muertas se obtuvo por la siguiente relación: (células teñidas/células totales) x 100

### **Obtención de medios condicionados**

Para la obtención de los medios condicionados (MC), las dos líneas tumorales HeLa y CaLo se mantuvieron por separado, en botellas Falcón de tres niveles. Se cultivaron con 100 ml de RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. Después de 24 hrs se lavaron cinco veces con 100 ml c/u de PBS (con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>) y se les sustituyó el medio de cultivo por RPMI-1640 únicamente. A las 24 horas se coleccionó el MC (libre de suero), se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min para eliminar el detrito celular y se almacenó a -20°C.

### **Liofilización de los MC**

Una vez reunido el litro de cada medio condicionado se liofilizó en un Speed-Vac (Automatic Environmental, modelo AES2000, Savant) hasta un volumen

aproximado de 50 ml, después se hizo pasar por membranas de corte molecular de 50, 30, 10 y 1 KDa, obteniéndose fracciones >50, >30, >10 y >1 KDa las cuales se utilizaron en los ensayos biológicos.

### **Efecto de los MC de HeLa y CaLo en linfocitos de sangre periférica humana**

Las células linfocíticas fueron sembradas en placas de 96 pozos y el MC fue puesto al momento de la siembra (100 µg/ml del MC), se les adicionó fitohemaglutinina como agente mitogénico. A las 48 horas de la siembra se les agregó timidina tritiada, de manera que las células que se encontraron en fase de síntesis, incorporaron la timidina marcada. Después de 16 horas en cultivo con la marca, las células se pasaron por membranas que se depositaron en viales de 2 ml con líquido de centelleo (Beckman, USA). La radiación fue evaluada en un contador de centelleo de emisión  $\beta$  (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%.

### **Tratamiento de los MC con una proteasa y con calentamiento**

Para determinar si la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos era de naturaleza proteica, el medio condicionado se trató con tripsina en una proporción de 1:1; y por otra parte, se sometió a un calentamiento a 37, 40, 45, 50, 55 y 100°C. Después de recibir cada uno de los tratamientos, los medios condicionados se utilizaron en los ensayos biológicos.

Las células linfocíticas fueron sembradas en placas de 96 pozos y el MC tratado con la tripsina y con calentamiento fue puesto al momento de la siembra (100 µg/ml del MC), a las 48 horas de la siembra se les agregó timidina tritiada y se desarrolló el mismo procedimiento descrito anteriormente.

### **Bloqueo del efecto inhibitor de los MC sobre los linfocitos con anti TGF $\beta$**

Las células linfocíticas fueron sembradas en placas de 96 pozos y el MC fue puesto al momento de la siembra (100  $\mu$ g/ml del MC). Previamente el MC fue tratado con 1 $\mu$ g/ml de mAb-TGF $\beta$  incubado previamente a 37°C por 30 min. A las 48 hrs de cultivo los linfocitos se marcaron con timidina tritiada, y se siguió el mismo procedimiento que en los ensayos anteriores.

### **Citometría de flujo**

Para determinar si el medio condicionado detiene a las células linfocíticas en la fase G1 del ciclo celular, se midió la cantidad de DNA presente en las células por citometría de flujo.

Se sembraron los linfocitos y se estimularon con el medio condicionado. A las 60 horas se lavaron una vez con PBS. Se fijaron con etanol al 70% en PBS por 10 min. a 4°C. Posteriormente se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 2.5 u/ml de RNAsa en PBS durante 1 h a 37°C.

Se tiñeron con 20  $\mu$ l/ml de ioduro de propidio (200 mg/l) en PBS durante 2 min. Por último se resuspendieron en PBS y se evaluaron en el citómetro de flujo FACScalibur, Becton Dickinson.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de los ensayos experimentales fueron sometidos a tres pruebas estadísticas, una denominada ANDEVA o análisis de varianza, que establece un valor medio denominado Gran Media, con una distribución de los datos de una manera normal y nos dice que tan alejados están los valores promedios de las muestras de nuestros ensayos con respecto a la Gran Media, lo que determina si la muestra presenta un comportamiento de distribución normal; la segunda prueba denominada Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher, se realiza para saber si existe diferencia significativa entre dos o mas pares de medias, finalmente se aplicó la prueba de Tukey para determinar entre que pares de medias existía diferencia (Zar, J, 1996;Mendenhall y col, 1994 y Kreyszig, 1991).

## RESULTADOS

Es conocido que las células son capaces de generar condiciones en su micro ambiente que les favorecen para sobrevivir e inclusive para estimular su proliferación. Específicamente en las células tumorales, también se ha reportado que ellas son capaces de secretar citocinas o factores de crecimiento que les induce a evadir el ataque de las células de defensa propias del organismo, inducir su proliferación o a sobrevivir en condiciones con menor concentración de estos factores, incrementando su probabilidad de adaptarse a situaciones hostiles del microambiente (Lange, 1992). No obstante los reportes al respecto, poco se conoce de los factores de crecimiento o citocinas que son producidas por las células provenientes de cáncer cervicouterino. Con el fin de determinar si las células provenientes de cáncer cervicouterino HeLa y CaLo son capaces de secretar factores que permitan evadir el ataque del sistema inmunológico, sobrenadantes provenientes de cultivos de estas células fueron usados para determinar su efecto sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana. (Fig.1)

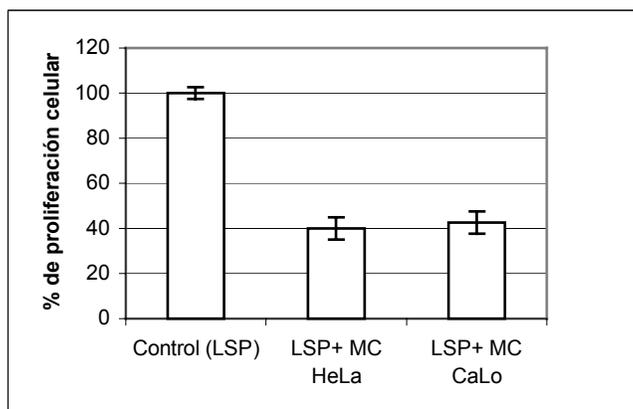


Fig 1. Efecto de los MC de las líneas tumorales HeLa y CaLo sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y el MC fue puesto al momento de la siembra. La evaluación se realizó a las 64 horas de cultivo. Las células fueron estimuladas con 100  $\mu\text{g/ml}$  del MC. El número celular fue evaluado a través de la técnica de incorporación de timidina tritiada. (LSP=linfocitos de sangre periférica; MC=medio condicionado)

Los resultados muestran que los medios condicionados provenientes de las células tumorales disminuyen la proliferación celular de los linfocitos de un 57 a un 60% (para los sobrenadantes de las células HeLa y CaLo respectivamente), manteniendo una viabilidad celular por encima del 90% determinado por la técnica de exclusión de azul tripano. Estos datos establecen por lo tanto que las células tumorales HeLa y CaLo son capaces de secretar un factor con actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH), provenientes de sangre periférica.

Teniendo en cuenta que los medios condicionados se encuentran constituidos por una gama de moléculas y factores de naturaleza química diferente, de tal forma que en ellos se pueden encontrar azúcares, lípidos, proteínas e incluso ácidos nucleicos, se procedió a determinar si la AIPCLH es de naturaleza proteica, dado que en la literatura se ha reportado que la mayoría de los factores con actividad inhibidora de la proliferación son de naturaleza proteica o glicoproteica (Meager, 1991; Santos-Argumedo, 1994). Para ello, los medios condicionados provenientes de cultivos de las células tumorales fueron tratados con una enzima llamada tripsina que ataca específicamente en la unión de los aminoácidos arginina y lisina, provocando su ruptura y en consecuencia su desnaturalización y pérdida de su actividad (Stryer, 1976) (Fig. 2). De igual manera, es conocido que las proteínas son funcionales a temperatura específica y su funcionalidad puede ser bloqueada al incrementar la temperatura, por lo que los medios condicionados fueron calentados a 37, 45, 55 y 100°C, con el objeto de desnaturalizar y desactivar a las proteínas presentes (Fig.3).

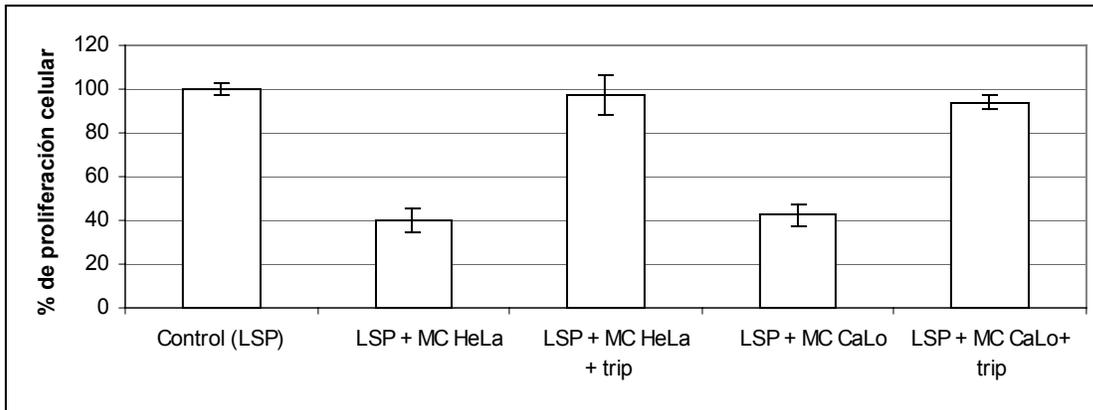
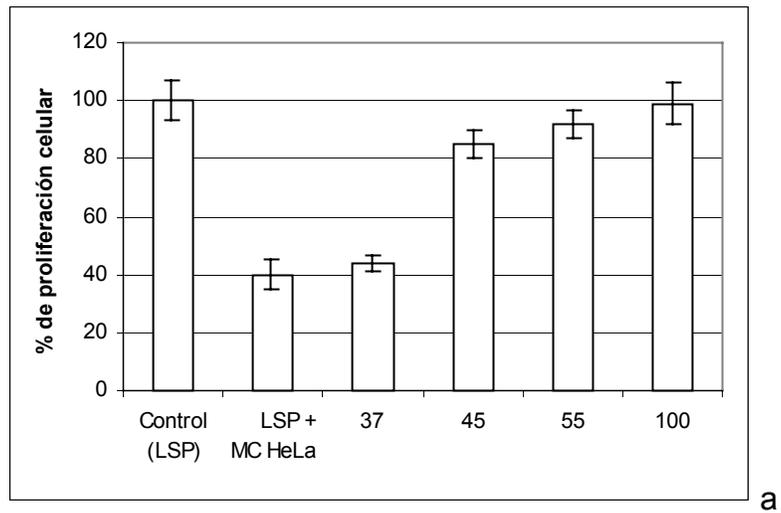


Figura 2. Efecto de la tripsina sobre los MC de las líneas tumorales HeLa y CaLo. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y el MC fue incubado una hora antes de la siembra con la tripsina al 0.05% (1:1 v/v). La evaluación del número celular se realizó a las 64 horas a través de la técnica de incorporación de timidina tritiada. (LSP=linfocitos de sangre periférica; MC=medio condicionado, trip=tripsina)



a

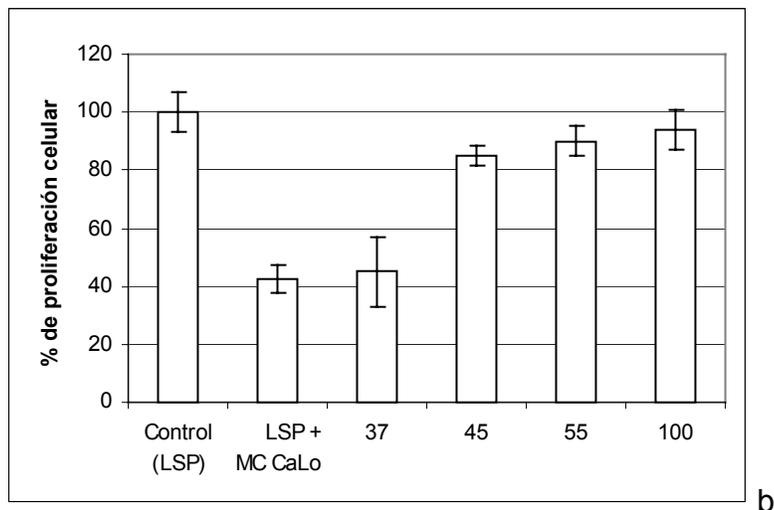


Figura 3 . Efecto de la temperatura sobre los Medios Condicionados de las l3neas tumorales HeLa (a) y CaLo (b). Las c3lulas linfoc3ticas fueron sembradas en placas de 96 pozos y los MC fueron sometidos a calentamiento a 37, 45, 55 y 100 °C durante una hora. La evaluaci3n se realiz3 a las 64 horas . El n3mero celular fue evaluado a trav3s de la t3cnica de incorporaci3n de timidina tritiada.

Los resultados observados en las figuras 2 y 3 sugieren que la AIPCLH presenta una naturaleza proteica ya que la actividad fue bloqueada al ser tratada con la proteasa tripsina y al calentarla arriba de 45 °C.

Una vez que se ha determinado que las c3lulas tumorales HeLa y CaLo, son capaces de secretar un factor de naturaleza proteica, con actividad inhibidora de la proliferaci3n de c3lulas linfoc3ticas humanas, es necesario saber el rango de peso molecular que tiene dicha actividad, con el fin de poder trabajar con una muestra m3s pura y enriquecida. Para tal fin, los medios condicionados provenientes de las c3lulas tumorales HeLa y CaLo fueron separados a trav3s del uso de membranas de corte molecular: 1, 10, 30 y 50 kDa., generando fracciones de los medios condicionados con un rango de peso de 1 a 10 kDa, de 10 a 30 kDa, de 30 a 50 kDa y mayor de 50kDa.

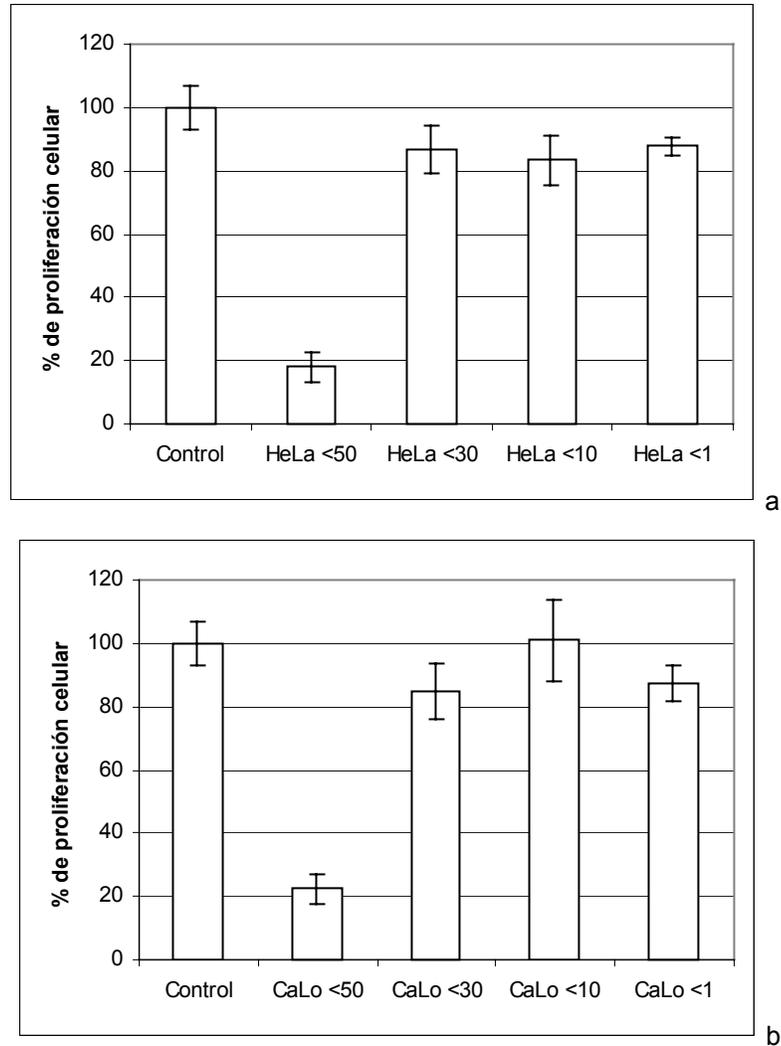


Fig. 4. Efecto de las fracciones de los MC de las líneas tumorales HeLa (a) y CaLo (b) en los linfocitos de sangre periférica. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y las fracciones fueron puestas al momento de la siembra. La evaluación del número celular se realizó a las 64 horas de estimulación con 100  $\mu\text{g/ml}$  de MC de HeLa y CaLo respectivamente a través de la técnica de incorporación de timidina tritiada.

Los resultados muestran que la actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH) presenta un peso molecular arriba de los 50 kDa, registrando una inhibición de un 80% para ambas líneas celulares (Fig 4).

Dadas las características de esta proteína, que presenta un peso molecular arriba de 50 kDa con actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas, genera la duda de, si se trata de un factor conocido como es el caso del  $\text{TGF}\beta$  o se trata de un factor desconocido. Para aclarar esta interrogante, los MC fueron

tratados con un anticuerpo neutralizante contra TGF $\beta$ , con el propósito de determinar si la actividad inhibidora de la proliferación presente en los MC es debida al TGF $\beta$  (Fig. 5 )

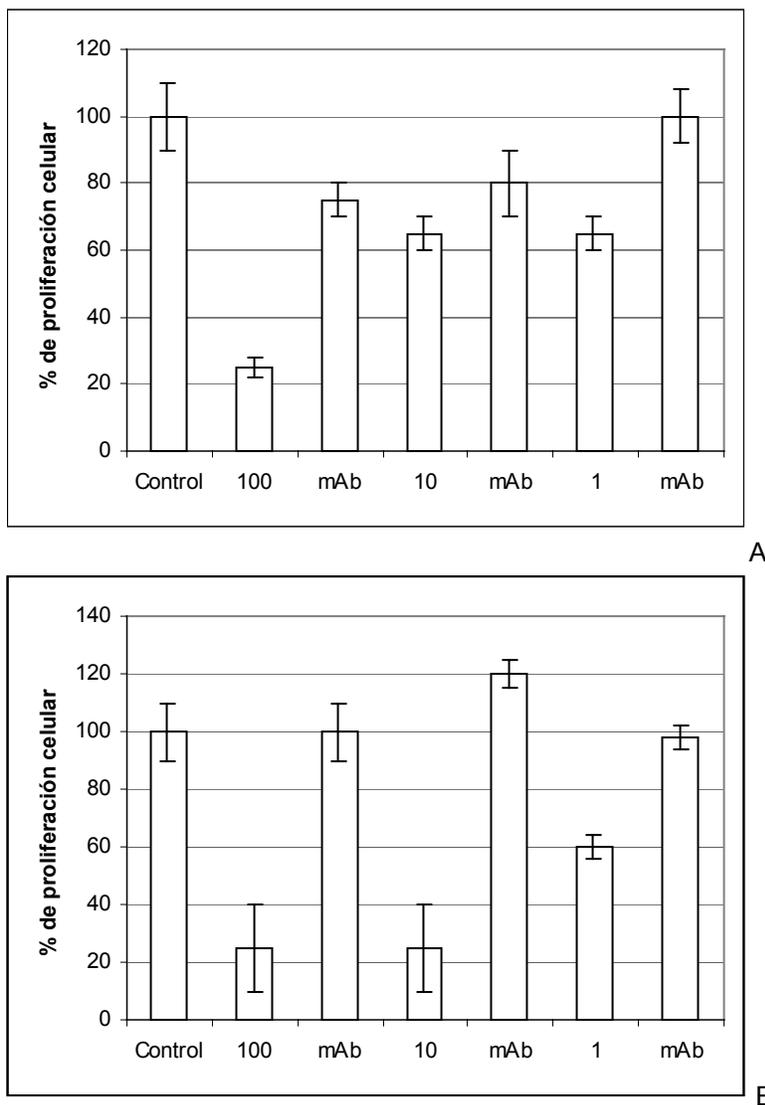


Fig. 5. Efecto de 100, 10 y 1  $\mu\text{g/ml}$  de proteína total proveniente de CaLo (A) y HeLa (B) sobre cultivos de linfocitos de sangre periférica humana así como el bloqueo del TGF $\beta_1$  secretados por dichas células tumorales, con 1  $\mu\text{g/ml}$  de mAb anti- TGF $\beta_1$ . El potencial proliferativo fue evaluado a través de la técnica de incorporación de timidina tritiada.

Los resultados obtenidos establecen que con 100  $\mu\text{g/ml}$  de proteína total proveniente de los sobrenadantes de HeLa y CaLo, se abate la proliferación de los cultivos de linfocitos hasta un 75 %. El sobrenadante de HeLa inhibió desde un

75% (10  $\mu\text{g/ml}$ ) hasta un 45 % (1  $\mu\text{g/ml}$ ). En el caso de CaLo se obtuvo un 45 % con 10 y 1  $\mu\text{g/ml}$ . Con respecto al bloqueo de la actividad del TGF $\beta$  se observó que la actividad inhibidora de la proliferación presente en los sobrenadantes, sobre los cultivos de linfocitos, se bloqueó hasta en un 100% cuando se le dirigió el mAb neutralizante anti- TGF $\beta$ 1, demostrándose que el TGF $\beta$ 1 es el principal responsable de tal actividad, sin embargo en CaLo existió una incompleta recuperación de la proliferación celular cuando se trataron con el mAb neutralizante, sugiriendo la posible participación de factores distintos al TGF $\beta$ 1.

Todos nuestros resultados indican que las células tumorales secretan moléculas que presentan AIPCLH, que son de naturaleza proteica, con un peso mayor a 50kDa y que muy probablemente el TGF $\beta$  esta directamente relacionado con dicha actividad, sin embargo es necesario saber si esta inhibición es ocasionada por el paro del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, por lo que se llevó a cabo una citometría de flujo con el propósito de determinar la distribución del ADN en el ciclo celular y observar en que fase del ciclo celular son detenidas las células (Fig. 6)

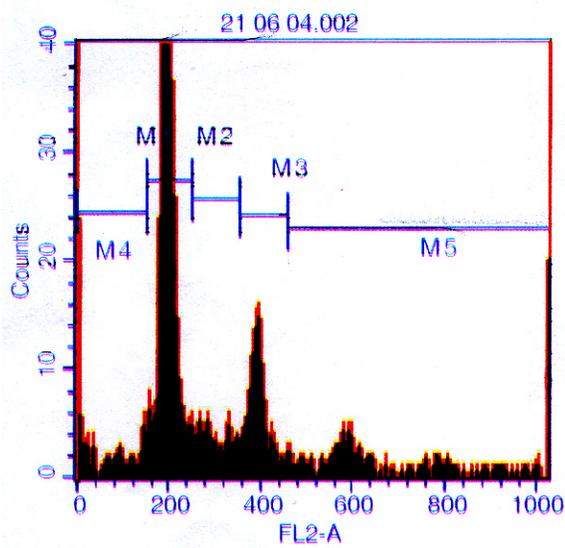
Los resultados muestran que los LSP sin estímulo (control) tienen un 85% de células en G<sub>1</sub>, (M1) 5% en S (M2) y 10% en G<sub>2</sub>-M (M3), los LSP estimulados con el MC de HeLa, tienen un 91% de células en G<sub>1</sub>, un 1% en S y un 8% en G<sub>2</sub>-M y por último los LSP estimulados con MC de CaLo tiene 89% en G<sub>1</sub>, 4% en S y 7% en G<sub>2</sub>-M. Aunque aparentemente hay un incremento en el porcentaje de células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, éste es muy pequeño y no correlaciona con la magnitud que tienen los MC sobre el potencial proliferativo de las células linfocíticas. Sin embargo, en la región 4 de distribución del ADN (a la izquierda de M1, se muestra un incremento significativo. Esta región M4 es considerada con un contenido de ADN menor que el que presenta la región M1, por lo que algunos

investigadores lo asocian como un indicativo de apoptosis (Tabla 1), sugiriendo que probablemente las células linfocíticas son inducidas a entrar en apoptosis.

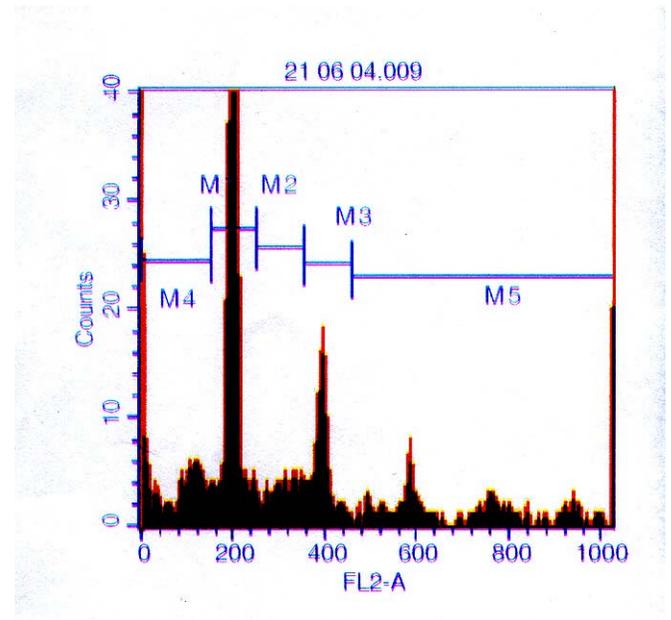
Tabla 1. Resultados obtenidos en el citómetro.

Regiones analizadas en el citómetro	Control		HeLa		CaLo	
	Eventos	% Total	Eventos	% Total	Eventos	% Total
	5000	100	5000	100	5000	100
<b>M1 (G1)</b>	3515	70.3	3389	67.78	3732	74.64
<b>M2 (S)</b>	198	3.96	42	.84	188	3.76
<b>M3(G2/M)</b>	395	7.9	306	6.12	297	5.94
<b>M4</b>	591	11.82	971	19.42	506	10.12
<b>M5</b>	307	6.14	297	5.94	283	5.66

CONTROL



CALO



HELA

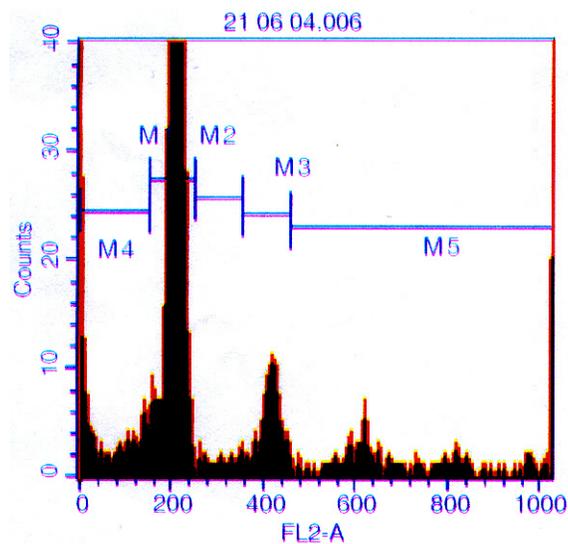


Fig. 6. Efecto de los MC de CaLo y HeLa en el ciclo celular de células linfocíticas. Las células fueron sembradas en cajas de 2.5 ml y estimuladas con 100  $\mu$ l/ml de MC de HeLa y CaLo, la evaluación se llevó a cabo a las 60 horas en el citómetro de flujo. En las gráficas, M1, M2 y M3, representan el porcentaje de células en las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>-M del ciclo celular respectivamente.

## DISCUSIÓN

A pesar de los importantes avances en el descubrimiento y tratamiento del cáncer, éste sigue siendo considerado uno de los principales causantes de muerte, junto con otras enfermedades. En México y el resto del Mundo el CaCu ocupa los primeros lugares en causas de muerte en mujeres (Rorke y col, 2000). Esto nos hace pensar que todavía falta mucha investigación acerca de los recursos que usan las células tumorales para poder proliferar y que es necesario comprender mejor todos los factores involucrados para poder ofrecer una cura eficaz contra esta enfermedad.

Las células tumorales tienen varias características que las hacen peligrosas para el huésped, incluida la capacidad de invadir otros tejidos y de inducir la vascularización capilar, la cual les asegura un buen abastecimiento de nutrientes que les permite proliferar, pero el más destacado es el de responder de manera anormal a los mecanismos de control que regulan la división de las células normales, dividiéndose de una forma relativamente incontrolada hasta producir la muerte del huésped (Weinberg, 1996, Keleg y col 2003)

En el caso particular del Cáncer Cérvico Uterino (CaCu), no es claro cuales y cuantas citocinas secretan y cual es su papel en la tumorogénesis. En este trabajo se ha encontrado que en los sobrenadantes o medios condicionados de cultivos de dos líneas celulares provenientes de tumores de pacientes con cáncer cervicouterino, presentan una actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH). Dicha actividad tiene una naturaleza proteica y un peso mayor a los 50 Kda, apoyando la hipótesis de que las células tumorales son capaces de secretar factores o citocinas que les favorecen en su proliferación o evasión de la respuesta inmunológica. Es de llamar la atención, que el peso molecular observado para la AIPCLH es mayor de 50 Kda, peso que no corresponde con el reportado para el TGF-  $\beta$ , sin embargo, es posible que el peso

obtenido a través de las membranas de corte, sea consecuencia de una agregación ocasionada por las condiciones en que se realiza esta técnica (alta presión), por lo que sería conveniente en un futuro, realizar una separación cromatográfica en columnas de exclusión molecular, para corroborar su peso u obtener el peso real, el cual creemos que es de 25 Kda, correspondiente al TGF-  $\beta$  en su estado activo, acorde con lo observado con el uso de anticuerpos neutralizantes contra el TGF- $\beta$ , los cuales bloquearon casi en su totalidad la actividad inhibidora (AIPCLH), presente en los sobrenadantes de cultivos de las células CaLo y HeLa. Estos resultados indican que las células tumorales de CaCu CaLo y HeLa secretan TGF- $\beta$  el cual es utilizado para bloquear la vigilancia inmunológica. Sin embargo, sería conveniente determinar la subpoblación de linfocitos que son afectados por los sobrenadantes de estas líneas celulares, ya que el estudio se realizó con todas las poblaciones existentes de linfocitos presentes en el paquete leucocitario. Por otro lado, se ha reportado que el TGF-  $\beta$  detiene a las células en la fase G1 del ciclo celular, o en algunos casos las induce a la apoptosis. Con respecto a nuestros resultados, encontramos que la AIPCLH no detiene a las células linfocíticas en la fase G1 de manera significativa, sin embargo, cuando analizamos la distribución del contenido de ADN en las cinco regiones del histograma (Fig. 6) y en la tabla 1, encontramos un incremento significativo en la región M4, que muchos investigadores interpretan como un indicativo de apoptosis, que sugiere que la AIPCLH probablemente esté induciendo a las células linfocíticas a entrar en apoptosis. No obstante esta interpretación no se puede descartar un efecto citostático o inclusive citotóxico (muerte por necrosis). Es de llamar la atención que las células tumorales usen un factor que presenta una actividad inhibidora de la proliferación de muchos tipos celulares, indicando que por alguna razón estas células tumorales son resistentes al efecto inhibidor del TGF-  $\beta$ , y el hecho de que células normales como los linfocitos de sangre periférica humana sean inhibidos por el TGF-  $\beta$  presente en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales de CaCu, implica que el TGF-  $\beta$  no presenta alguna mutación que altere esta actividad, sugiriendo que la

modificación que presentan las células tumorales de CaCu esta en su maquinaria celular y no en la modificación de la estructura y función del TGF-  $\beta$ .

Por otro lado, las líneas celulares utilizadas en este trabajo son HPV-18, abriendo la interrogante de sí las células HPV-16 o sin HPV presentan la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana, es decir, si la AIPCLH es dependiente del tipo de HPV o es una característica específica de este tipo de tumor, independientemente de la presencia o ausencia del HPV. Todo esto con el fin de aportar información que permita entender de manera más adecuada la participación de factores o citocinas que están involucrados en el mecanismo tumorogénico, de tal forma que se pueda lograr en un futuro, proponer a algún o algunas citocinas o factores como agentes con potencial terapéutico para patologías como el cáncer.

## CONCLUSIONES

- Los medios condicionados provenientes de cultivos de células tumorales de CaCu HeLa y CaLo presentan una actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH).
- La AIPCLH de las células tumorales es de naturaleza proteica.
- La AIPCLH de las células tumorales HeLa y CaLo tiene un peso mayor a los 50kDa.
- Las células tumorales HeLa y CaLo secretan TGF- $\beta$
- El TGF $\beta$  que secretan las células tumorales HeLa y CaLo es el principal responsable de la actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (2002). Cellular and molecular immunology. 4<sup>th</sup> Edition. WB. Saunders Company. USA.
2. Aggarwal, B.B (1992). Tumor Necrosis Factor. In : Aggarwal B.B, J.U, Gutterman. (eds). Human Cytokines. Blackwell Scientific Publications. USA. 270 pp.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition. Garland Science. New York, NY, USA, p 1463.
4. Ames BC, Gold LS, Willett WC.(1995).The causes and prevention of cancer . Proc Natl AcadSci USA.92:5258-5265.
5. Antoshina E, Ostrowski LE. (1997). TGF beta 1 induces growth arrest and apoptosis but not ciliated cell differentiation in rat tracheal epithelial cell cultures. In Vitro Cell Dev Biol Anim, (3): 212-217.
6. Arteaga CL, Dugger, TC, Hurd, SD. (1996). The multifunctional role of transforming growth factor (TGF)- beta on mammary epithelial cell biology. Breast Cancer Res Treat, 38(1):49-56.
7. Azuma M, Motegi K, Aota K, Yamashita T, Toshida 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-beta 1. Exp. Cell Res, 250(1):213-222.
8. Balkwill, FR. (1988). Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: Balkwill, R.R. Cytokines in Cancer Therapy. Oxford:Oxford University Press. 347pp
9. Baserga R, Devita VT. (1993). Principles of Molecular Cell Biology of Cancer: The Cell cycle. Chaper 4. Cancer Principles y Practice of Oncology. 4 a edition philadelphia 955pp.
10. Bogin L, Papa MZ, Polak-Charcon S, Degani H. (1998). TNF-induced modulations of phospholipid metabolism in human breast cancer cells. Biochim Biophys Acta, 1392(2-3):217-232.
11. **Bowen I y Bowen SM. (1990). Programmed cell death in tumor and tissues. Chapman and Hall, London. 268pp**

12. Buggins AGS, Milokovic D, Arno MJ, Lea NC, Mifti GJ, Thomas SB, Hirst WJR. (2001). Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF- $\kappa$ B, c-Myc, and pRb pathways. *The J of immunol*, 167:6021-30.
13. Cipriano SC, Yong, QC. (1998). Insensitivity to growth inhibition by TGF- $\beta$ 1 correlates with a lack of inhibition of the CDK2 activity in prostate carcinoma cells. *Oncog*. 17, 1549-1556.
14. Chang CJ, Liao CH, Wang FH, Lin CM. (2003). Transforming growth factor  $\beta$ , induces apoptosis-specific CD4<sup>+</sup>T cells prepared for adoptive immunotherapy. *Immunol Letters*. 86:37-43.
15. Chávez, GMA. (1997). Purificación del factor Inhibidor de la proliferación (FIP) y Evaluación de su efecto en el Ciclo Celular de Fibroblastos de Cerviz Humano. Tesis licenciatura, UNAM; México, D.F.; 65pp.
16. Danforth DN Jr, Sgagias MK. (1996) Tumor necrosis factor alpha enhances secretion of transforming growth factor beta2 in MCF-7 breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2(5):827-35.
17. Darnell J, Baltimore D. (1995). *Biología celular y molecular*. Ed. Omega, 3a Edición. España. 920pp.
18. De Robertis E. (2000). *Biología celular y molecular de De Robertis*. Editorial El Ateneo, Argentina. 820pp.
19. De Vita T. (1997). *Cancer Principles y Practice of Oncology*, 6<sup>a</sup> Edition. USA Company, 1 New York, 1078 pp.
20. Demers GW, Espling E, Harry JB, Etscheid BG, Galloway DA. (1996), Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. *J of virol*, 70(10), 6862-6869.
21. Dower SK, Sims JE, Ceretti DP, Bird TA. (1992). The interleukin-1 system receptors, ligands and signals. *Chem. Immunol Karger*. Zwitterland. 33pp.
22. Edwards PAW. (1999). The impact of development biology on cancer research: an overview. *Cancer and Metastasis Reviews*. 18:175-180.
23. Fiers W, Browckaert P, AL Goldberg. (1987). Structure-function relationship of tumour necrosis factor and its mechanism of action. In: *Tumour Necrosis Factor and Related Cytokines*. (Ciba Foundation Symposium 131). Chichester: Wiley, 109 pp.

24. Foxwell BM, Barret K, Feldman N. (1992). Cytokine receptors; Structure and signal transduction. *Clin. Exp Immunol*, 90:161.
25. Gerald K. (1998). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. Mc Graw Hill Interamericana. México.
26. Gershenwald HE, Fidler IJ. (2002). Targeting Lymphatic Metastasis. *Science*. 296:1811-1812.
27. 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):505-512.
28. Gibbs WW. (2003). Untangling the Roots of Cancer. *Scientific American*. 289(1):59-59.
29. Giora M, Mavligt, Alexander A, Zukiwksi, Chuslip Charnsangavenj, Carrasco W, Gutterman U. (1991). Regional Biologic Therapy. *Cancer*, 69:557-561.
30. Gorelik L, Flavell RA. (2002). Transforming growth factor-beta in T -cell biology. *Nat Rev Immunol*. 2(1):46-53.
31. Israels ED, Israels LG. (2000). The cell cycle. *The Oncol. Fund. Can. Med*, 5:510-513.
32. Jiang Y, Porter A.G. (1998). Prevention of tumor necrosis factor (TNF)-mediated induction of p21WAF1/CIP1 sensitizes MCF-7 carcinoma cells to TNF-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(3):691-697.
33. Jiménez GLF, Merchant LH. (2003). *Biología celular y molecular*, Pearson Educación.
34. Johnson TC. (1994). Negative regulators of cell proliferation. *Pharmac Ther*, 62:247-265. Laugen P. (ed). Copyright 1994. Elsevier Science Ltd. Printed in Great Britain.
35. Kang SH, Bang YJ, Jong HS, Seo JY, Kim SJ. (1999). Rapid induction of p21 waf1 but delayed down-regulation of Cdc25A in the TGF-beta-induced cell cycle arrest of gastric carcinoma cells. *Br J Cancer*, 80(8):1144-1149.
36. Karp G. (1996). *Biología Celular y molecular*. Ed. MacGraw-Hill. México. pp671-692.
37. Keleg S, Büchler R, Ludwin MW, Büchler y Fries H. (2003). Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 2(14):1-7.

38. Kilian PL, Kaffka KL, Biondi DA, Lipman JM, Benjamin WR, Feldman D, Campen CA. (1991). Antiproliferative effect of interleukin-1 on human ovarian carcinoma cell line. *Cancer Res*, 51:1823.
39. Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, Studer H. (1999). Expression of transforming growth factor beta 1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas a comparative study. *Thyroid*, 9(2):119-125.
40. Ko TC, Yu W, Sakai T, Sheng H, Shao J, Beauchamp RD, Thompson EA. (1998). TGF-beta effectson proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncog*. 16(26):3445-3454.
41. Kretschmar M, Massagué J. (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Current Opinion in Genetics and Development*. 8: 103-111.
42. Kreyszig E.(1991).Estadística matemática, principios y métodos. Editorial Limusa, México. 505pp.
43. Kriegler M, Perez C, Defay D, Albert Y, Lu SD. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 53: 43.
44. Kurzrock K, Talpaz M, Guttermaj U. (1991). Interferons. In: de Vita B, Hollman S S. Rosenberg (eds). *Biol therapy of cancer*. Lippincot Co. USA.
45. Landesman Y, Bringold F, Milne DD, Mekk DW. (1997). Modifications of p53 protein and accumulation of p21 and gadd45 mRNA in TGF-beta 1 growth inhibited cells. *Cell Signal*, 9;3/4:291-298.
46. Lange WB, Rosenthal FM, Kanz L, Lindermann A. (1992). The role of cytokines in oncology. *Int J cell cloning* 9(4):252-273.
47. Lee DH, Yang SC, Hong SJ, Chung BH, Chung HJ, Tokunaga H, Kim IY, Song YS, Lerner SP, Morton RA. (1999). The loss of expression of transforming growth factor-beta receptors correlates with the histopalogic tumor grade in bladder transitional cell carcinoma patients. *Yosein Med J*, 40(2):118-23.
- 48. Liotta LA. (2001). An Attractive force in metastasis. *Nature*. 410:24-25.**

49. Longstreet M, Miller B, Howe PH. (1992). Loss of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1)-induced growth arrest and p 34 super (cdc2) regulation in ras-transfected epithelial cells. *Oncog*, 7(8):1549-1556.
50. López-Marure R. (1997). Caracterización de la Respuesta Antiproliferativa de células endoteliales humanas al Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ). Tesis Doctoral. UNAM, México D:F. 122pp.
51. Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. (2002). Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol*. 14(4):517-1521.
52. Margni. (1996). *Inmunología Clínica*. Ed. Medica-Panamericana. México. 680pp.
53. Mark EE, Oliver CJ, Sluss HJ, Miller SJ, Peeper DS. (1995). p53-Dependent repression of cdk4 traslation in TGF- $\beta$  induced G1 cell-cycle arrest. *Genes and Develop* (2):204-217.
54. McGee DW, Bamberg T, Vitkus SJD, McGhee JR. (1995). A synergistic relationship between TNF-alpha, 1L-1 beta, and TGF-beta 1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial. *Immunol*, 86(1):6-11.
55. Meager A. (1991). *Cytokines*. Ed. Prentice Hall. USA. 280 pp.
56. Mendenhall W, Dennis D, Richard L. (1994) *Estadística matemática con aplicaciones*. Segunda Edición. Grupo Editorial Iberoamérica, México. 772pp
57. Meneses GF, Cos-A Ma T. (1994). Evaluación de las actividades de detección y seguimiento del Cáncer Cércouterino en población bajo cobertura de la secretaria de Salud. México, 1992. *Rev Inst Nal Cancerología* 40:168-177.
58. Mire-Sluis AR, Torpe R (1998). *Cytokynes*, ED. Academic Press. USA. 426 pp.
59. Monroy AG. (1991). Citotoxicidad de linfocitos de sangre periférica sobre células provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino en presencia de interlucina-2 recombinante humana. Tesis Maestría en IBSH. UNAM, D.F. 93 pp.
60. Moses H, Yang E, Pietenpol J. (1990). TGF-b stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights. *Cell*. 63:245-252.

61. Muñoz N, Bosch FX. (1997). Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública de México* 39(4):274-282.
62. Nagy N, Vánky F, (1998). Transforming growth factor  $\beta$ , (TGF $\beta$ ) secreted by immunogenic ex vivo human carcinoma cells, counteracts the activation and inhibits the function of autologous cytotoxic lymphocytes. Pretreatment with interferon $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  reduces the production of active TGF $\beta$ . *Cancer immunol immunother.* 45:306-312.
63. Okamoto A, Wei J, Seong-Jin K, Spillare EA, Stoner GD, Weinstein IB, Harris CC. (1994). Overexpression of human cyclin D1 reduces the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor and growth inhibition by TGF-beta 1 in an immortalized human esophageal epithelial cell line. *Proc of the Nat Acad of Scie USA*, 91(24):11576-11580.
64. Palmer JN, Hartogenesis WE, Patten M, Fortuin D, Long CS. (1995). Interleukin 1- $\beta$  induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblasts proliferation in culture, *J. Clini. Inv*, 95:2555
65. Peralta Z, Bahena R, Diaz B, and Madrid M. (1997). Relationship between cell cycle and cancer development: Therapeutically approaches. *Salud Pública. México*, 39:451-452.
66. Rangel CR, José LRG, Leticia RZ, Gilberto SL, Alberto MG, Rubén DMP, Catalina TB, María JIS, Benny WS. (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- $\alpha$  e INF- $\gamma$  sobre su proliferación. *Rev. Inst Nal cancerol (Mex) Vol 39, Nú 3*, 1861-66.
67. Richards SM., Richard DG, Lynne K, Jhon MM. (1998). Prolactin es an antagonist of activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell immunol*, 184: 85-91.
68. Roitt IM, Delves PJ. (2003) *Inmunología. Fundamentos*. 10 Ed. Editorial Medica Panamericana Argentina.
69. Rorke EA, Jacobberger JW. (1995). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) enhances apoptosis in human papillomavirus type 16-immortalized human ectocervical epithelial cells. *216(1):65-72*.
70. Rorke EA, Zhang D, Choo CK, Eckert RL, Jacobberger JW. (2000). TGF- $\beta$ -Mediated cell cycle arrest of HPV16-immortalized human ectocervical cells correlates with decreased E6/E7 mRNA and increased p53 and p21 expression. *Exp cell res*, 259, 149-157.

71. Santos-Argumedo L. (1994). Principios básicos de la respuesta inmunológica. *Perinatol. Reprod. Hum*, 8(1): 4-11.
72. Stanley LR, Vinay KMD. (1989). *Patología humana*. 4 edición. Ed. Interamericana. México. 732pp.
73. Stavnezer J. (1995). Regulation of antibody production and class switching by TGF- $\beta$ 1. *J of immunology*. 155(4):1647-1651.
74. Stevens A y Lowe SJ. (1995). *Texto y Atlas de Histología*, Mosby/Doyma Libros, España.
- 75. Studzinski GP. (1995). Cell growth and apoptosis. Oxford University Press. New Yor. 26pp.**
76. Stryer Lubert. (1976). *Bioquímica*, Ed. Reverté Venezolana S.A, Venezuela.
77. Sugarman BJ, Lewis GD, Eesalu TE, Aggarwal BB, Shepard HM. (1987). Effects of growth factors on the antiproliferative activity of tumor necrosis factor. *Cancer. Res.* 47:480.
78. Thiery JP, Chopin D. (1999). Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 18:31-41.
79. Tsutomu S, Naofumi Y, Hiroyoshi S, Minoru T, Tetsuro O, Sumui S, Naoki W, Yoshiro N. (1998). An apoptosis-inducing gene therapy for pancreatic cancer with a combination of 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor gene transfection and mutein TNF administration. *Cancer Res*, 58:1677-1683.
80. 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) isoform in hormone-dependent and independent lines of mouse mammary tumors. *Cancer detect Prev*, 23(5):375-386.
81. Vilcek J, Palombella VJ, Zhang Y, Lin JX, Feinman R, Reis LFL, Le J. (1988). Mechanisms and significance of the mitogenic and antiviral actions of TNF. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol*. 139:307.
82. Weinberg RA. (1996). How cancer arises. *Scientific american*, 275 (3):62-70.
83. Werness AB, (1995). Cáncer cervicouterino: en busca de una etiología infecciosa. *Contemp Oncol Julio/Agosto*: 13-21.

84. Wikstrom P, Lindh G, Bergh A, Damber JE, (1999). Alterations of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) and TGF beta receptor expressions with progression in dunning rat prostatic adenocarcinoma sublines. *Urol Res* 27(3):185-193.
85. Wu F, Buckley S, Bui KC, Yee A, Wu HY, Liu J, Warburton D. (1996). –cell cycle arrest in G0/G1 phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells. *Am J Physiol* 270(5) 879-888.
86. Yarden A, Kimchi A. (1986). Tumor necrosis factor reduces c-myc expression and cooperates with interferon-gamma in HeLa cells. *Scie* 234(4782):1419-1421.
87. Yocota J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 21(3):497-503.
88. Zar JH.(1996) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. New Jersey. 662pp

## APENDICE

Análisis estadístico ANDEVA o análisis de varianza

Tratamiento	Número celular	ni	Xi	Xi.
Control	490000 440000 440000	3	1370000	453333.67
HeLa	340000 350000 200000	3	890000	296667
H + Trip	450000 440000 460000	3	1350000	450000
H 37	320000 330000 300000	3	950000	316666.667
H 45	420000 440000 460000	3	1320000	440000
H 55	510000 450000 460000	3	1420000	473333
H 93	390000 510000 430000	3	1330000	443333
	Total	21	8630000	

Fuente	g. l.	SC	CM	F calc	F teor
Tratamientos	7-1=6	$\frac{1370000^2}{3} + \frac{890000^2}{3} + \dots + \frac{1330000^2}{3} - \frac{8630000^2}{21} =$ $3640566667000 - 3571219048000 =$ $634447630000$	$\frac{634447630000}{6} =$ $105733333000$	$\frac{105733333000}{1909523786} =$ $5.54$	F <sub>0.95, 6, 14</sub> = 2.85
Error	21-7=14	$490000^2 + 440000^2 + \dots + 510000^2 + 430000^2 -$ $3640566667000 = 26733333000$	$\frac{26733333000}{14} =$ $1909523786$		

F<sub>calc.</sub> > F<sub>Teorica</sub> por tanto hay diferencia significativa entre 2 o mas pares de medias.

$$DHS = q_{\alpha, k, gl \text{ error}} \sqrt{S^2 \text{ error} / n}$$

$$DHS = q_{0.05, 7, 14} \sqrt{1909523786 / 3} = 4.83 \sqrt{1909523786 / 3} = 70353.94$$

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
X1	-	159999	6666	140000	16666	16667	13333
X2	-	-	153333	19999	143333	176666	146666
X3	-	-	-	133334	10000	23333	6667
X4	-	-	-	-	123334	156667	126667
X5	-	-	-	-	-	33333	3333
X6	-	-	-	-	-	-	30000
X7	-	-	-	-	-	-	-

{	$\mu_1 - \mu_2$ $\mu_1 - \mu_4$ $\mu_2 - \mu_3$ $\mu_2 - \mu_5$ $\mu_2 - \mu_6$ $\mu_2 - \mu_7$ $\mu_3 - \mu_4$ $\mu_4 - \mu_5$ $\mu_4 - \mu_6$ $\mu_4 - \mu_7$	Presentan diferencia significativa
---	--	------------------------------------

Tratamiento	Número celular	ni	Xi	Xi.
Control	490000 440000 440000	3	1370000	453333.67
InBl	300000 260000 280000	3	840000	296667
I + Trip	450000 370000 340000	3	1160001	450000
I 37	330000 310000 290000	3	930000	316666.667
I 45	380000 350000 360000	3	1089999	440000
I 55	460000 510000 450000	3	1419999	473333
I 93	440000 500000 480000	3	1419999	443333
	Total	21	8159998	

Fuente	g. l.	SC	CM	F calc	Fteor
Tratamientos	7-1=6	$1370000^2/3 + 840000^2/3 + \dots + 1419999^2/3 - 8159998^2/21 = 3270881487000 - 3170741303000 = 100140184000$	$100140184000/6 = 16690030670$	$116690030670/2944179500 = 6.63$	$F_{0.95,6,14} = 2.85$
Error	21-7=14	$490000^2 + 440000^2 + \dots + 500000^2 + 480000^2 - 3270881487000 = 41218513000$	$41218513000/14 = 2944179500$		

Fcalc. > F Teorica por tanto hay diferencia significativa entre 2 o mas pares de medias.

$$DHS = q_{\alpha, k, g, l} \sqrt{S^2 \text{ error} / n}$$

$$DHS = q_{0.05, 7, 14} \sqrt{2944179500 / 3} = 4.83 \sqrt{2944179500 / 3} = 87359.07$$

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
X1	-	176666.7	69999.7	146666.7	93333.7	16666.3	16666.3
X2	-	-	106667	30000	83333	193333	193333
X3	-	-	-	76667	23334	86666	86666
X4	-	-	-	-	53333	163333	163333
X5	-	-	-	-	-	110000	110000
X6	-	-	-	-	-	-	-
X7	-	-	-	-	-	-	-

$\left. \begin{array}{l} \mu_1 - \mu_2 \\ \mu_1 - \mu_4 \\ \mu_1 - \mu_5 \\ \mu_2 - \mu_3 \\ \mu_2 - \mu_6 \\ \mu_2 - \mu_7 \\ \mu_4 - \mu_6 \\ \mu_4 - \mu_7 \\ \mu_5 - \mu_6 \\ \mu_5 - \mu_7 \end{array} \right\}$  Presentan diferencia significativa