



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

"DETERMINAR SI EL FIP DETIENE A LAS CELULAS  
TUMORALES Y FIBROBLASTICAS PROVENIENTES DE  
CERVIX EN LA FASE G<sub>1</sub> DEL CICLO CELULAR"

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**HUGO LOPEZ MUÑOZ**

ASESOR: M. en C. LUIS SANCHEZ SANCHEZ



MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 mi hijo :

Aramís, por que veniste a darle un nuevo sentido a mi vida y por ser la razón más importante para seguir adelante.

A mi esposa:

Gris, por todo tu amor y paciencia.

A mi madre:

Julietta, por tu amor y por estar siempre conmigo apoyándome en todas mis locuras.

A mi padre :

Luciano, por enseñarme a ser independiente.

A mis hermanos:

José, Meche, Paty, Geo, Alma, Miguel, Jorge Silverio, por que siempre han estado conmigo cuando los he necesitado.

A Victor y Vicky :

Por su amistad y por el apoyo que me han brindado en todo momento.

A mis amigos:

Pao, Vero, Sandra, Magy, Alex, Ivan, Sergio, Lalo, Yanet, Miriam, Inés, Migel, Luz, Fer, por todo lo que compartimos juntos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez por su confianza, enseñanzas y por todo el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado:

M. en C. Luis Sánchez Sánchez

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

M. en C. Jorge Hernández Montes

M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez

M. En C. Rosalva Rangel Corona

Por las sugerencias realizadas para enriquecer este trabajo

Al hospital General de Zona " Troncoso " de IMSS por su valiosa colaboración para la realización de este trabajo y muy especialmente al Dr. Enrique López y a todo el personal de quirófanos.

TESIS CON  
FALLA DE URGEN

## INDICE

Resumen	1
Introducción	2
- Reguladores de la proliferación	4
Factores de crecimiento y citocinas	4
- Factor inhibidor de la proliferación (FIP)	8
Ciclo celular	10
Cáncer	13
- Cáncer cérvico uterino (CaCu)	13
- Factores de riesgo	15
- Tratamiento del cáncer cérvico uterino	17
- Características de las líneas tumorales CaLo, HeLa e InBI	18
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos	22
Materiales y métodos	23
Resultados	31
Análisis de resultados	40
Conclusiones	43
Bibliografía	44
Apéndice	52

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

Los cultivos confluentes de fibroblastos provenientes de cérvix humano secretan al medio de cultivo un factor soluble capaz de inhibir la proliferación de células epiteliales, fibroblásticas y tumorales provenientes del cérvix humano, denominado Factor Inhibidor de la Proliferación (FIP). En este trabajo se determinó que el FIP es capaz de detener a las células fibroblásticas provenientes de cérvix humano así como a las células tumorales Calo, HeLa e InB1 en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. El hecho de que el FIP no activa a la caspasa 3, sugiere que no se trata de un factor apoptótico sino más bien de un factor citostático. Con respecto a su mecanismo de acción, se encontró que el FIP induce la expresión de la proteína p27 sin un aparente efecto sobre la proteína Rb. Estos hallazgos confirman que las células normales regulan su división celular con la participación de factores solubles que ellas mismas secretan y que su estudio podría ser enfocado para evaluarlos como agentes terapéuticos en enfermedades relacionadas con desórdenes de la división celular como es el caso del cáncer.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN

Para mantener la integridad de un individuo, las células de su cuerpo deben mantener un equilibrio entre proliferación y muerte celular. El continuo crecimiento y la división celular que caracteriza a la mayoría de los tejidos del cuerpo determina el desarrollo del individuo como un todo.

Sobre la base de la frecuencia de la división celular, los distintos tejidos o poblaciones celulares se pueden clasificar en poblaciones estáticas, estables y renovables, las primeras solo sufren división durante el desarrollo embrionario ya que se encuentran en la fase  $G_0$  del ciclo celular, tal es el caso de la células nerviosas. Por su parte las poblaciones estables, que se componen de células que rara vez se dividen y que también se encuentran en el estadio  $G_0$  del ciclo celular, no presentan diferenciación terminal dado que pueden activarse en respuesta a estímulos externos, por ejemplo alguna clase de lesión celular, tras lo cual retornan a la fase  $G_1$  y sufren división normal. Como ejemplo de estas poblaciones se tienen a los fibroblastos y las células endoteliales que se pueden estimular para la división por procesos de cicatrización. Finalmente las poblaciones de células renovables que representan tejidos en los que se produce renovación constante y actividad mitótica regular, tal es el caso de las células del estrato basal de la epidermis (1).

Cuando una célula termina su ciclo de vida llega la muerte celular, la cual se puede presentar de diferentes formas como son: necrosis y apoptosis. La necrosis se debe siempre a una acción lesiva, que puede ser un simple traumatismo físico o químico, por carencia de oxígeno o la acción de toxinas bacterianas. Esta acción desencadena la liberación de enzimas lisosómicas y de autólisis de la célula, generalmente en este proceso el núcleo se retrae hasta formar un grumo denso y finalmente se rompe en varios trozos, la célula se disuelve gradualmente y por lo general es eliminada por acción de los fagocitos (2). La apoptosis, por otro lado es un proceso que requiere de energía y está programado genéticamente; a diferencia de la necrosis este proceso elimina células aisladas. Generalmente aquí se presenta una condensación y fragmentación de la cromatina nuclear y retracción celular, la degradación de la cromatina se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

produce por acción de las endonucleasas y las enzimas citoplasmáticas transforman la célula en una envoltura rígida que se rompe en fragmentos. Generalmente durante este proceso las membranas y los organelos celulares se mantienen intactos durante todo el proceso que finaliza cuando los fragmentos limitados por las membranas son fagocitados por las células vecinas y en menor grado por macrófagos (3).

El envejecimiento celular también es un fenómeno programado que se expresa porque las células normales presentan una cantidad limitada de divisiones, por ejemplo los fibroblasto de fetos humanos se pueden dividir unas 50 veces en cultivos celulares, tras lo cual pierden su capacidad de división y pasan a la fase  $G_0$  irreversible. Los fibroblastos de una persona de 40 años dejan de dividirse después de 40 divisiones y los de una persona de 70 años después de 20 o 30 (4).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## REGULADORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

### Factores de crecimiento y citocinas.

Los factores de crecimiento pueden ser definidos como polipéptidos que estimulan o inhiben la proliferación celular a través de su captura por receptores de membrana específicos de alta afinidad. Los factores de crecimiento difieren de los polipéptidos hormonales no sólo en el mecanismo de respuesta, sino también en la forma de ser secretados por la célula. Los factores de crecimiento, no actúan usualmente de forma endocrina, sino que se difunden en un área pequeña a través de los espacios intercelulares actuando localmente ( 5 ).

Desde la década de los 70's se ha dado un gran auge en las investigaciones sobre los reguladores del crecimiento. En 1972 Taylor y sus colaboradores reportan un **factor de crecimiento epidérmico** (EGF por sus siglas en inglés) el cual fue descrito como un péptido que estimula el crecimiento de cultivos celulares. Éste fue primero purificado de la glándula submaxilar de ratón y mas adelante de la orina humana. El EGF es un polipéptido de 6kDa formado por una cadena simple de 53 residuos de aminoácidos (6).

En 1975 Gospodarowics purifica al **factor de crecimiento fibroblástico** (FGF por sus siglas en inglés), que es capaz de estimular el crecimiento de células endoteliales vasculares así como de células fibroblásticas en cultivo (7) su caracterización molecular indica que se trata de una proteína de cadena simple de entre 14 y 18 kDa (5).

En 1978, De Larco y Todaro reportan actividad de un factor obtenido de células de ratón transformadas con el virus de Sarcoma murino Moloney (8) al que se nombró **factor de crecimiento transformante  $\beta$**  (TGF- $\beta$  por sus siglas en inglés) por su habilidad de estimular, bajo condiciones apropiadas, crecimiento de algunas líneas celulares de forma independiente de la adhesión al sustrato. El TGF- $\beta$  es capaz de inhibir, estimular o no influir en la proliferación o diferenciación celular, además de estar involucrado en la degradación y producción de matriz extracelular y en la respuesta inflamatoria e inmune dependiendo del tipo celular y las

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

condiciones del microambiente en donde se utilice (9, 10). Esta importante molécula consiste en dos cadenas idénticas entrelazadas por puentes disulfuro con un peso molecular de 25 kDa y cada cadena está compuesta de 112 aminoácidos (11). El TGF- $\beta$  es uno de los factores de crecimiento mas estudiados. Jin Woo Kim y sus colaboradores reportan que es capaz de inducir apoptosis en células de cáncer cervical por una disminución en la expresión del gene c-myc (12); Dimitris Klestas y su grupo de trabajo, reportan que es capaz de inhibir la síntesis de ADN en cultivos de fibroblastos de embriones humanos (13) y Ellen A. Rorke y colaboradores así como James W. Jascobberger, reportan que el TGF- $\beta$  suprime la proliferación y potencia la apoptosis en células del epitelio cervical humanas transformadas con el virus del papiloma humano HPV-16 (11,14).

Otro importante factor de crecimiento celular es el **Interferón  $\gamma$**  (IFN- $\gamma$ ). 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 (16); el efecto antiproliferativo del IFN- $\gamma$  en células tumorales parece estar mediado por linfotoxinas, aunque se piensa que sus mecanismos de inhibición pueden ser desencadenados a través de inducción de enzimas antivirales, inducción de genes supresores pero de función y estructura 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 (16, 17).

El **Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$**  (TNF $\alpha$  por sus siglas en inglés), es también una proteína con actividad reguladora de la proliferación celular, cuya actividad está denominada por el tipo celular al que se liga y a la presencia de otras proteínas reguladoras (18); el TNF $\alpha$  tiene actividad biológica cuando se presenta como un trímero con subunidades de 17 kDa y puede estimular la proliferación de varias líneas fibroblásticas humanas y algunas líneas celulares tumorales (19), es 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* (20).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) por su parte, estimula la proliferación de fibroblastos, células musculares, queratinocitos, células mesenquiales, células gliales, linfocitos T y B, así como precursores hematopoyéticos, induce actividad procoagulante y adhesividad de células endoteliales entre otras funciones (21, 22); ha mostrado detener la proliferación de miocitos y fibroblastos cardíacos, además de su efecto inhibitor en células transformadas de músculo liso y astrocitos (23), también se ha reportado que inhibe la proliferación de células tumorales provenientes de cáncer ovárico (24).

La interleucina 2 (IL-2) es también un potente regulador de crecimiento de células T (25) además de tener actividad en el crecimiento y diferenciación de las células B, células asesinas y algunas células no linfoides (26, 27); también se ha encontrado que esta citocina es capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos 3T3 (28) e inhibe la proliferación de células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro* (29).

#### Otros factores

Además de éstos ya bien caracterizados factores de crecimiento, se han reportado muchos otros. La mayoría de estos factores son proteínas o glicoproteínas de bajo peso molecular y se encuentran pobremente caracterizados. En 1992 Patrick G. Jonson y colaboradores, identifican una proteína secretada por la línea celular 3T3-L1 derivada de la línea fibroblástica de ratón 3T3 que es capaz de inhibir el crecimiento de células en cultivo de cáncer de mama humanas MCF-7 y señalan que dicha molécula es un polipéptido de 69 kDa (30).

En 1993, el grupo de Masatoshi Kataoka purifica a partir del citosol de la bacteria *Actinobacillus actinomycescomitans* Y4 un factor con un peso de 65 kDa que es capaz de inhibir el crecimiento de fibroblastos gingiviales humanos en cultivo (31) y en ese mismo año H. F. McMurray reporta una molécula de entre 2.5 y 6.5 kDa obtenida a partir de cultivos de macrófagos de la línea P388D1 que inhibe el crecimiento de fibroblastos 3T3 así como de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

células del músculo liso de la aorta porcina. Dicha molécula es sensible al calor y a la tripsina y la actividad inhibidora no afecta la morfología celular (32).

En 1994, C. Blat y colaboradores, reportan una molécula de 45 kDa secretada en medios de cultivo confluentes de fibroblastos de embrión de ratón que tiene efecto sobre ellos mismos (33); ya en estos trabajos se observa que los factores de crecimiento pueden tener tanto un efecto autócrino como parácrino.

En 1995 Isabella Caniggia y su grupo de trabajo caracterizan parcialmente un factor con actividad inhibidora del crecimiento de fibroblastos a partir de medios condicionados de células epiteliales de pulmón de embrión de rata, dicho factor presenta un peso de entre 3.5 y 12.5 KDa, se desactiva con la tripsina y es sensible al calor y al ácido (34). Chieko Hashimoto y su grupo reportan un factor obtenido de lisados de hígado de hámster que es capaz de inhibir el crecimiento de cultivos de fibroblastos de hámster transformados con el virus SV-40, éste inhibidor tiene un peso de 37 kDa y presenta un efecto reversible al ser retirado de los cultivos (35).

En 1996 Nobuko Satomi y colaboradores, purifican y caracterizan una citosina con actividad antitumoral en células fibroblásticas de ratón, esta fue obtenida de sobrenadantes de cultivos de una línea celular de histiocitos humanos así como de suero de conejo, el peso molecular de esta citosina es de 41 y 46 KDa en humanos y de 42 y 55 KDa en conejo (36).

#### **Factor Inhibidor de la Proliferación (FIP)**

Para 1999 Sánchez, L y su grupo de trabajo aíslan un factor que es capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos normales al que se ha denominado Factor Inhibidor de la Proliferación (FIP) (37). El FIP es un factor aislado de sobrenadantes de cultivos confluentes de células fibroblásticas de cérvix humano por precipitación con 80% de sulfato de amonio, dializado y filtrado. Este factor es capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos normales en un 35% con respecto a un control cuando es adicionado en un 25% del volumen total del medio

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de cultivo. El medio condicionado fue fraccionado por exclusión molecular y un análisis de la densidad óptica de las diferentes fracciones reveló que la fracción con actividad inhibitoria corresponde a un peso molecular de 23kDa. Se confirmó que se trata de una molécula de naturaleza proteica ya que al adicionarle tripsina se pierde la actividad inhibidora al igual que al incrementar la temperatura a 60°C. Se comparó la actividad inhibitoria del FIP con el efecto de algunas citocinas como el EGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y IL-1 $\beta$  en cultivos de fibroblastos en crecimiento exponencial y se encontró que el único factor con actividad inhibitoria en condiciones y concentración similar al FIP fue el TGF $\beta$ , sin embargo se descartó que se trate del mismo ya que al evaluar el efecto de ambos sobre cultivos de la línea celular Mv1Lu, que se sabe son sensibles al TGF $\beta$ ; se encontró una inhibición del 40% con el TGF- $\beta$  y no se encontró un efecto correspondiente con el FIP ( 37).

FACTOR	ALGUNOS DE LOS TIPOS CELULARES EN QUE ACTÚA	PM (kDa)
EGF	Estimula la proliferación de fibroblastos y epitelios	6
FGF	Estimula la proliferación de células endoteliales vasculares y fibroblastos en cultivo	14-18
TGF $\beta$	Células humanas no transformadas, fibroblastos, epitelios, endotelios, células linfohematopoyéticas	25
TNF $\alpha$	Fibroblastos, células transformadas	17
IL-1 $\beta$	Fibroblastos, células musculares, queratinocitos, endotelios	17,5
IL-2	Fibroblastos 3T3, células tumorales, células T	15-18

**Tabla 1. Algunos de los principales reguladores de la proliferación celular reportados en la literatura.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 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: **G<sub>1</sub>** 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. **G<sub>2</sub>** 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 **G<sub>2</sub>** y designa a la mitosis, que se divide en una serie de estadios parciales: profase, metafase, anafase y telofase. **G<sub>0</sub>** se refiere a las células que se encuentran temporalmente o permanentemente fuera de ciclo (38) (Figura 1).

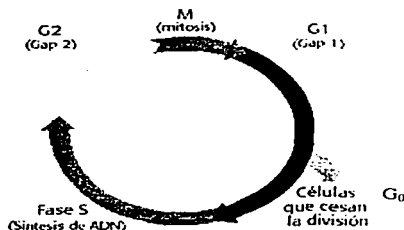


Figura 1. Esquema del ciclo celular donde se observan los diferentes momentos de la interfase, la mitosis y la fase **G<sub>0</sub>** (41).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Durante el ciclo celular se deben completar los eventos de cada fase antes de pasar a la siguiente, por lo que existen puntos de control que monitorean la integridad del ADN y se encuentran en puntos estratégicos del ciclo: en  $G_1$  tardía y en la interfase  $G_2/M$  para prevenir la propagación de células dañadas o mutadas.

Las células normales dependen de estímulos externos (mitogénicos o factores de crecimiento) para salir de  $G_0$  a  $G_1$ , respondiendo con una cascada de fosforilaciones intracelulares en donde las ciclinas y las cinasas dependientes de las ciclinas (CDKs por sus siglas en inglés) 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 (39,40).

El ciclo avanza por  $G_1$  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  $G_1$ . Los miembros de la familia RB son proteínas que sequestran 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  $G_1$  tardía, hay también un aumento en la expresión de la ciclina E que es requerida acoplejada con CDK2 para la transición de  $G_1$  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 (39,40) (Figura 2).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

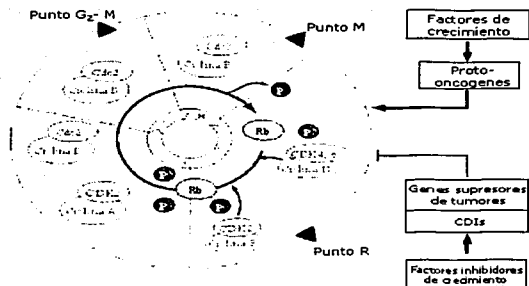


Fig. 2. Las células normales dependen de factores de crecimiento para salir de G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub>, respondiendo con una cascada de fosforilaciones intracelulares en donde las ciclinas CDKs adquieren un papel fundamental. Los complejos ciclina/CDK fosforilan sustratos proteicos específicos 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 (39).

En el punto de control G<sub>2</sub> se monitorea que no exista daño en el ADN o que no se haya copiado completamente, en cuyo caso el ciclo es detenido hasta que el daño sea reparado o el ciclo sea abortado, en caso de que el daño exceda la capacidad de la célula para repararlo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **Cáncer**

Todas las células del cuerpo están organizadas de tal modo que se comportan como una sociedad en donde todas ellas colaboran entre sí para mantener la salud del organismo. Dentro de esta sociedad impera la norma del auto sacrificio mas que el de la competencia, por lo que casi todas las células en algún momento están condenadas a morir con la finalidad de que sobrevivan las células germinales, que de alguna manera, serán las encargadas de propagar los genes del individuo. Cualquier comportamiento no altruista de una célula somática pondrá en peligro a todo el organismo (41).

El cáncer es una enfermedad en la que las células individuales rompen el orden natural y empiezan a proliferar a expensas de sus vecinas pero que finalmente destruyen a toda la sociedad y mueren. Las células tumorales proliferan a pesar de las restricciones normales y además producen metástasis, es decir, que tienen la capacidad de ingresar al torrente sanguíneo para llegar hasta otros sitios del cuerpo donde continúan su proliferación (42).

### **Cáncer cérvico uterino (CaCu)**

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es la primera causa de muerte en la mujer mexicana (43). Aparece en la unión del canal cervical y del ectocérvix, que es el sitio donde las células pueden sufrir transformaciones por la acción de uno o mas factores de riesgo ya sean biológicos ( mutaciones, virus, edad), socioculturales (escolaridad, hábitos de higiene), e incluso factores medioambientales a los que todos estamos expuestos. Las anomalías tempranas del cérvix, conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se diagnostican comúnmente en mujeres de entre 30 y 40 años de edad. Para que el NIC evolucione a CaCu invasor necesita de 8 a 20 años y en la mayoría de los casos se requiere de 5 a 10 años para que las células transformadas penetren a la membrana basal del cérvix e invadan otros tejidos (44). Una vez ocurrido esto, las pacientes que no han recibido tratamiento, o que no han respondido a éste, mueren usualmente en un periodo de 3 a 5 años.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La Sociedad Americana del Cáncer (*American Cancer Society*) estima que, durante 2002, se diagnosticarán alrededor de 13,000 casos de cáncer invasivo del cuello uterino en los Estados Unidos. Algunos investigadores calculan que el cáncer no invasivo del cuello uterino (carcinoma in situ) es casi 4 veces más común que el cáncer invasivo del cuello uterino.

Entre 1955 y 1992, el número de muertes debidas a este tipo de cáncer en los Estados Unidos disminuyó en un 74%. La razón principal de este cambio es el aumento del uso de la *prueba de Papanicolaou*, un procedimiento de detección que permite diagnosticar el cáncer preinvasivo y el cáncer invasivo en sus etapas iniciales. El índice de mortalidad continúa bajando a razón de aproximadamente 2% al año (45.46).

Por su parte, de acuerdo con el Sistema Nacional de Salud, el cáncer cérvico-uterino ocupó el primer lugar como causa de muerte por cáncer en México con 41,326 casos, lo que corresponde al 22.5% del total de casos registrado. Las cifras señalan que también ocupó la primera posición en la población femenina en el trienio 1993-1995 (34.7%). Los grupos de edad más afectados son los de 35 a 59 años (33.6%).

La variante histológica más frecuente fue el carcinoma de células escamosas (91.5%); y le siguen en orden de importancia el adenocarcinoma con 3.7%. De acuerdo con la notificación por institución, el sector público reportó mas del 70% de los casos y el sector privado el 15.9% .

Con respecto a la entidad federativa, el Distrito Federal, Jalisco y Veracruz son los estados que reportaron los más altos porcentajes, y los estados de Quintana Roo, Baja California Sur los menores. Sonora, con 680 casos representó el 1.6% (47).

### **Factores de riesgo**

Varios factores de riesgo aumentan las probabilidades de contraer cáncer del cuello uterino. Las mujeres sin estos factores de riesgo raramente contraen dicha enfermedad. Aunque estos factores aumentan las probabilidades de contraer un cáncer del cuello uterino, muchas mujeres que los tienen, no lo padecen. Cuando una mujer contrae cáncer del cuello uterino o presenta cambios

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

precancerosos, no es posible decir con seguridad qué factor de riesgo en particular lo ha causado. Sin embargo algunos de los más comunes son los siguientes:

**Edad:** la edad promedio de las mujeres que por primera vez reciben un diagnóstico de cáncer del cuello uterino es entre 50 y 55 años. El riesgo de contraer este cáncer es muy bajo entre las jovencitas menores de quince años. Comienza a presentarse en las mujeres que tienen entre 20 y 29 años de edad. El cuello uterino es distinto a la mayoría de los tipos de cáncer cuya frecuencia aumenta con la edad de la persona. Aunque el cáncer del cuello uterino sí afecta a las mujeres jóvenes, muchas mujeres mayores no se dan cuenta de que su riesgo para contraer cáncer del cuello uterino no disminuye a medida que aumentan en edad y de que es importante para ellas continuar haciéndose las pruebas de Papanicolaou (45).

**Infección con el virus del papiloma humano:** el factor de riesgo más importante para el cáncer del cuello uterino es la infección con el *virus del papiloma humano* (HPV, por sus siglas en inglés). Los HPV son un grupo de más de 70 tipos de virus llamados papilomavirus porque pueden causar verrugas, o *papilomas*. Ciertos tipos de HPV pueden infectar los órganos genitales femeninos y masculinos, así como el área del ano. Estos tipos de HPV se transmiten de una persona a otra durante el contacto sexual. El término médico para las verrugas genitales es *condiloma acuminado*. La mayoría de las verrugas genitales se debe a dos tipos de virus del papiloma humano: el HPV 6 y el HPV 11. Sólo en raros casos éstos se convierten en cáncer del cuello uterino, por lo que se les llama virus de "bajo riesgo". Sin embargo, otros tipos de HPV de transmisión sexual han sido asociados con el cáncer genital o anal, tanto en hombres como en mujeres. Éstos se denominan tipos de "alto riesgo" e incluyen el HPV 16, HPV 18, HPV 33, HPV 35, HPV 45 y otros (48,49). Ciertos tipos de conductas sexuales aumentan el riesgo de una mujer de contraer una infección con virus del papiloma humano: relaciones sexuales a temprana edad, tener muchas parejas sexuales, realizar el acto sexual a cualquier edad sin protección, entre otras (50).

**Hábito de fumar:** Fumar expone al cuerpo a numerosas sustancias químicas cancerígenas que afectan otros órganos, además de los pulmones. Estas sustancias dañinas son absorbidas por los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

pulmones y conducidas en el torrente sanguíneo a través de todo el cuerpo. Se han detectado subproductos del tabaco en la mucosidad cervical de mujeres fumadoras. Los investigadores opinan que estas sustancias dañan las células del cuello uterino y pueden contribuir al origen del cáncer del cuello uterino. Las fumadoras tienen el doble de probabilidades respecto a las no fumadoras de contraer cáncer del cuello uterino (51,52).

**Anticonceptivos:** No existe evidencia definitiva que relacione el uso de las píldoras anticonceptivas con el cáncer del cuello uterino. Hay cierta evidencia estadística de que el uso de píldoras anticonceptivas por períodos prolongados puede aumentar ligeramente el riesgo de cáncer del cuello uterino. Algunos investigadores sugieren una relación entre el uso de las píldoras anticonceptivas durante cinco o más años y un aumento en el riesgo de cáncer del cuello uterino. La investigación para resolver este asunto continúa (45).

**Otros factores de riesgo.** Se han reportado otros factores que también pueden en un momento aumentar las posibilidades de contraer la enfermedad, tales como la alimentación y la condición económica, ya que muchas mujeres con bajos ingresos no tienen acceso fácil a servicios adecuados de atención a la salud, incluyendo las pruebas de Papanicolaou y el tratamiento de la enfermedad precancerosa cervical. Estudios recientes indican que las mujeres cuyas madres o hermanas han tenido cáncer del cuello uterino tienen mayores probabilidades de contraer la enfermedad. Algunos investigadores sospechan que esta tendencia familiar se debe a una condición hereditaria que hace que algunas mujeres sean menos capaces de luchar contra la infección con HPV que otras (50).

#### **Tratamiento del cáncer cérvico uterino**

Un cáncer pequeño (llamado cáncer microinvasivo), puede ser removido totalmente mediante un procedimiento llamado biopsia de cono. En este tipo de biopsia, se remueve una cantidad mayor del tejido de cérvix. El tejido es examinado bajo un microscopio para ver si todo el cáncer ha sido removido. Este procedimiento puede hacerse en el consultorio del doctor, o en el hospital.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ya que existen tres clases de biopsias de cono, los síntomas y el tiempo de recuperación varía. Si el cáncer no puede ser removido por medio de la biopsia de cono, la mujer puede que tenga que ser sometida a una operación para remover el útero (histerectomía), para prevenir que el cáncer invada otras partes del cuerpo. A veces, los nódulos linfáticos en el área de la pelvis también son removidos. A esta operación se le llama histerectomía radical. Pero si el cáncer ha invadido otras áreas fuera del cérvix, el tratamiento usualmente es la radiación. Generalmente, la quimioterapia no es usada para tratar el cáncer cervical (53,54).

#### **Características de las líneas CaLo, HeLa e InBI provenientes de CaCu**

##### **CaLo**

Edad de la paciente: 55 años

Diagnóstico clínico: Carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizadas con HPV-18

Descripción microscópica: Las células muestran núcleos pleomórficos con mitosis atípicas.

Escaso citoplasma eosinófilo y núcleos centrales. Forman grumos en mosaico.

Estadio clínico IIB (55).

Características del estadio: El estadio IIB es considerado como cáncer microinvasor de alto riesgo. Es tratado con ciertos agentes químicos en combinación con radioterapia (56).

##### **HeLa**

Edad de la paciente: 31 años

Diagnóstico clínico: Adenocarcinoma de cérvix con HPV-18

Descripción microscópica: Células epiteliales.

Estadio clínico: IVB metastásico.

Características del estadio: Éste estadio es maligno con un alto riesgo de mortandad, con pocas posibilidades de curación y el riesgo de invadir otros órganos se encuentra en un porcentaje considerable. El tratamiento depende de las características que se presenten pero el porcentaje de sobrevivencia es mínimo (57).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**InBI**

Edad de la paciente: 45 años

Diagnóstico clínico: carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizantes con HPV-18

Descripción microscópica: Células grandes con núcleos hipereromáticos. Mitosis atípicas y formación de perlas córneas.

Estadio Clínico: IVB (55).

Características de estadio: El estadio IVB es considerado al igual que el IIB, como un cáncer microinvasor de alto riesgo. Por lo general se recurre a otros tratamientos colaterales a radioterapia; dependiendo de todas las características en conjunto que se presenten.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se realizan múltiples investigaciones en torno a los diversos factores que controlan el ciclo celular así como la forma en que éstos actúan ya sea estimulando o inhibiendo la proliferación celular. Esto es de gran relevancia, ya que su estudio nos permitirá comprender mejor los mecanismos involucrados en dicho proceso y a su vez entender también algunas enfermedades derivadas de alteraciones en este ciclo, tales como el cáncer cérvico uterino, que es una de las principales causas de muerte en la mujer mexicana.

El FIP es un factor capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales, por lo que su estudio, además de ayudarnos a comprender su participación en el mecanismo del ciclo celular, podría convertirse en una terapia alterna para el tratamiento del CaCu y brindar así nuevas esperanzas de vida para las mujeres que lo padecen.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## HIPÓTESIS

La mayoría de las moléculas que mantienen el equilibrio entre proliferación y muerte celular son glicoproteínas de bajo peso molecular y generalmente ejercen su efecto en la fase  $G_1$  del ciclo celular. Dado que las células fibroblásticas provenientes del cérvix humano, secretan el Factor Inhibidor de la Proliferación (FIP), el cual ejerce su acción tanto en células normales como tumorales y conociendo de que la mayoría de los factores que detienen la división celular lo hacen en la fase  $G_1$  del ciclo celular, esperamos que la acción inhibitoria del FIP también sea ejercida en dicha fase. De igual manera se ha demostrado que los factores inhibidores de la proliferación no sólo funcionan en la fase  $G_1$  sino además son capaces de inducir muerte celular por la vía apoptótica. En base a lo anterior y en vista de que el FIP presenta un efecto reversible tanto en células fibroblásticas así como en las células tumorales, esperamos que el FIP no sea un factor apoptótico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**OBJETIVOS****Objetivo general.**

Determinar si el Factor Inhibidor de la Proliferación (FIP) secretado por fibroblastos provenientes de cérvix humano, frena la proliferación de células tumorales CaLo, HeLa e InBI, así como a células fibroblásticas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular.

**Objetivos particulares:**

1. Establecer cultivos de fibroblastos provenientes del cérvix humano.
2. Obtener el FIP a partir de sobrenadantes de cultivos confluentes de células fibroblásticas.
3. Cultivar células tumorales CaLo, HeLa e InBI.
4. Determinar si el FIP detiene a las células tumorales así como a las células fibroblásticas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular evaluadas por citometría de flujo.
5. Determinar si las proteínas Rb y p27 intervienen en el mecanismo de acción del FIP
6. Determinar si el FIP induce apoptosis en las células tumorales CaLo, HeLa e InBI

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIALES Y METODO

### Obtención de fibroblastos provenientes de cérvix humano

Los fibroblastos se obtuvieron de cérvix humano provenientes de pacientes a quienes se les realizó una histerectomía por presentar miomatosis uterina.

Una vez obtenida la pieza quirúrgica, se cortó un fragmento de cérvix y se transportó en condiciones estériles en medio de cultivo RPMI adicionado con el 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB) (GIBCO) a una temperatura de 4° C. Posteriormente la muestra se fragmentó en trozos de aproximadamente 5mm y se depositó en un vaso de precipitados de 50ml que contenía 15ml de tripsina al 0.05% en solución salina de verseno y un agitador magnético. El matraz se colocó en un baño de agua a 37° C y en agitación suave durante 15min. Después de este tiempo se decantó el sobrenadante en un embudo con malla y se colectó en un tubo cónico que contenía 1ml de SFB. Al tejido remanente se le adicionaron 15ml más de tripsina al 0.05% en verseno y se repitió el procedimiento anterior.

Los tubos que contenían los filtrados fueron centrifugados a 1500rpm durante 5 min y posteriormente se retiró el sobrenadante por decantación y el botón celular resultante en cada tubo fue resuspendido en 5ml de RPMI suplementado con 10% de SFB y se sembró en cajas de cultivo de 5ml (COSTAR) mantenidas en una incubadora (Scientific) a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera de humedad a punto de rocío por 24h. Al cabo de este tiempo se realizó un cambio de medio por medio fresco (RPMI con 10% de SFB) de tal manera que solo permanecieron las células adheridas. Después de 5 a 7 días se obtuvieron cultivos celulares de fibroblastos que fueron resebrados con la finalidad de obtener una población celular más homogénea.

La resiembra se realizó cuando las cajas de cultivo presentaron un número celular importante (aproximadamente el 70% de saturación). A las cajas de cultivo se les retiró completamente el medio de cultivo y se les adicionaron 2ml de tripsina al 0.05% en verseno

TESIS CON  
FALLA DE CANCELACIÓN

(para el caso de las cajas COSTAR de 5ml), dejándolas en esta solución por 3 min en la incubadora. Al cabo de este tiempo, la caja de cultivo fue observada en un microscopio invertido para asegurarse que las células estuvieran completamente desprendidas. En seguida, con resuspensión vigorosa se completó la remoción de las células y la suspensión celular fue centrifugada a 1500rpm durante 5min. El botón celular fue resuspendido en RPMI al 10% de SFB, para posteriormente distribuir las células en concentraciones de 20.000 células/caja. A esta resiembra se le llamó R<sub>1</sub>. La siguiente resiembra (R<sub>2</sub>), fue utilizada para ensayos de actividad biológica, o para obtención de medio condicionado. Las células no se emplearon para ningún tipo de ensayo después de la resiembra 3 (58,59).

#### **Obtención de medios condicionados**

Los medios condicionados de fibroblastos (MCF) de cérvix humano se obtuvieron después de que las células en cultivo llegaron a la fase de confluencia. A estos cultivos se les retiró el medio de cultivo y fueron lavados 5 veces con 5ml de solución salina PBS y se dejaron posteriormente con RPMI libre de SFB durante 48h después de lo cual se colectó el medio condicionado. El medio se centrifugó a 3000rpm para retirar el detrito celular y se almacenó a 4 °C en recipientes de vidrio estériles, hasta iniciar la concentración.

#### **Concentración del MCF**

El medio condicionado obtenido fue alícuotado en tubos para centrifuga de 50ml y se concentró hasta sequedad por liofilización en un liofilizador Speed Vac (SAVANT AES2000). El concentrado de cada tubo fue resuspendido en 1ml de PBS y se colocó en una bolsa de diálisis con poro de 1 kDa (Spectra/Poor MWCO 1000) y se introdujo en un recipiente con 1 litro de PBS 0.25X durante 48h con cambios cada 8h.

Por último, el PBS 0.25X se cambió por PBS 1X en agua en donde el MCF se dejó dializando por otras 24h. Una vez concluido este tiempo, el contenido de la bolsa de diálisis se recuperó en tubos Eppendorf y se centrifugó a 14 000rpm durante 10min a 4 °C. El medio

condicionado concentrado se esterilizó haciéndolo pasar por una membrana de poro de 0.22 micras y fue almacenado a 4 °C hasta su utilización.

### **Cultivos de células tumorales de CaCu CaLo, HeLa e InBl**

Las líneas celulares tumorales criopreservadas CaLo, HeLa e InBl, provenientes de tres biopsias diferentes de pacientes con cáncer cérvico-uterino (60), se descongelaron y se hicieron crecer en cajas petri de 5ml y en RPMI al 10% de SFB dentro de una incubadora (Scientific) a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda a punto de rocío durante tres a cinco días dependiendo de la densidad inicial.

### **Evaluación de la Proliferación Celular mediante la técnica de Cristal Violeta**

El colorante cristal violeta, posee características alcalinas, que le permiten incorporarse a los núcleos celulares. El número de núcleos teñidos aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida (61). Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% durante 10min, para posteriormente ser lavadas con agua bidestilada y secadas al aire. A las placas secas se les agregó una solución de cristal violeta al 0.1% (hasta cubrir completamente las células), manteniéndose en agitación durante 10min. Una vez concluido este tiempo las placas de cultivo se lavaron exhaustivamente con agua desionizada (de manera que el colorante no incorporado sea retirado), para posteriormente secarse al aire a temperatura ambiente. A las cajas de cultivo se les añadió ácido acético al 10% (que solubiliza el colorante de los núcleos celulares), dejando en agitación durante 20min. Posteriormente a eso, se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA (EI 800; Bio-Tek) a 570nm y las densidades ópticas se graficaron como % de proliferación celular con respecto a al control.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

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

El colorante azul tripano solamente es asimilado por la células cuando ésta se encuentra deteriorada de la membrana, en cambio, las células que no lo incorporan se consideran como células viables.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos e inducidas con 15µg/ml de FIP . transcurrido el tiempo de estímulo, el sobrenadante fue retirado de los pozos y se desprendieron las células con tripsina o verseno, éstas se diluyeron 1 a 1 con azul tripano. Las células se contaron en una cámara de Neubauer (Boeckel Co) y el porcentaje de viabilidad fue obtenido mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Células teñidas}}{\text{Células teñidas} + \text{células no teñidas}} \times 100$$

### Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue evaluada con un kit de detección de los aminoácidos cisteína, triptofano, cisteína y tirosina los cuales forman un color púrpura cuando reaccionen con ácido bicinonínico (BCA) en combinación con el método de Biuret (BCA Protein Assay Reagent, PIERCE). El color obtenido exhibe una fuerte absorbancia a 562nm y las lecturas de las muestras son comparadas con una curva patrón de albúmina sobre la cual se hace la determinación (62).

### Ensayos de actividad biológica

La actividad inhibidora del FIP se determinó mediante ensayos experimentales en los que se evaluó cada uno de los MCF sobre el cultivo de células fibroblásticas o tumorales en fase

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

exponencial. Para cada cultivo inducido se determinó el número y se comparó con un control al que no se aplicó inductor.

### **Cromatografía de exclusión molecular**

Una columna cromatográfica de 35cm de altura y 1.5cm de diámetro fue empacada con resina Sephacryl S-100 (Farmacia Biotech), la columna se equilibró con solución salina (PBS) isotónica pH 7.0 y se calibró con marcadores de peso molecular conocido.

En la columna se aplicaron 750mg/0.5ml de medio condicionado concentrado y las proteínas eluidas fueron colectadas. Se realizaron 30 separaciones cromatográficas consecutivas y se colectaron todas juntas de acuerdo con sus intervalos de peso molecular (lotes). Los lotes de peso molecular obtenidos fueron concentrados por liofilización hasta obtener 500µl de volumen final. Las fracciones de proteína fueron probadas en ensayos biológicos para determinar su actividad inhibidora.

### **Inmunolectroanálisis**

El análisis de fosforilación de la proteína RB y la expresión de p27 se determinó por inmunolectroanálisis (63). La proteína total fue extraída utilizando una solución de lisis conteniendo Tris (pH 7), NaCl, NP-40, NaF, vanadato de sodio e inhibidores de proteasas. Las células fueron lavadas con una solución de TBS y lisadas con 350 µl/plato de solución de lisis durante 20 minutos en hielo. La proteína extraída fue colectada en tubos Eppendorf y centrifugada a 14000rpm durante 5min y el sobrenadante fue almacenado a -20 °C. La cantidad de proteína en cada muestra fue determinada por el método BCA. Posteriormente, 150µg de proteína total para cada condición fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5%. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Hybond), la cual se bloqueó con una solución de leche semidescremada al 6% en TBS-Tween durante 1h. Las membranas se incubaron con los anticuerpos correspondientes durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina diluido

TESIS CON  
FALLA DE CUBRIR

1:1000 en TBS-5% de leche, incubándolo durante 1h a temperatura ambiente. La membrana después de lavarse, fue revelada con 5ml de solución amortiguadora de fosfatasa alcalina y azul de tetrazolio.

### **Análisis PARP**

Las células tumorales fueron sembradas a una densidad de  $2 \times 10^6$  células en cajas petri de 100mm. Después del tratamiento con  $15 \mu\text{g/ml}$  de FIP por 24, 48 y 72h las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 8000rpm por 3min a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante fue retirado y el botón celular fue resuspendido en  $20 \mu\text{l}$  de buffer ( Tris  $62.5 \text{ mM}$ , Urea  $\text{pH } 6.8$ ; glicerol al 10%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.003%, 2-mercaptoethanol al 5%) y sonicated por 30s. Para inducir la degradación del sustrato de la caspasa 3 las células fueron tratadas con luz UV por 16h y procesadas en condiciones similares a las células tratadas con el FIP. Estas fueron usadas como un control positivo en la ruptura del PARP por la caspasa. La proteína celular total ( $150 \mu\text{g}$ ) fue incubada a  $65^\circ\text{C}$  por 15min y separado por electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS al 7.5%. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond Amersham) con buffer de tranferencia (Tris  $25 \text{ mM}$ ; Glicina  $192 \text{ mM}$ ; Metanol 20%) a 60V por 1-2h. Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con solución PBS-MT (PBS 1X, pH 7.4; leche semidescremada al 5%;twen 20 al 0.1%) por 1h e incubada toda la noche con el anticuerpo C 2.10 (Anticuerpo monoclonal IgG anti-PARP) diluido 1:10,000 en PBS-MT. Después de la incubación la membrana fue lavada con PBS-MT e incubada con anti IgG de ratón (Sigma) diluida 1:2500 en PBS por 30min. La membrana fue lavada por 30min con PBS y la proteína PARP fue detectada por quimioluminiscencia usando un sustrato comercial (Supersignal, Pierce) (64).

### **Citometría de flujo**

Las células a evaluar fueron desprendidas con verseno o tripsina, según el caso, se centrifugaron a 1500rpm durante 3min y se lavaron una vez con PBS. posteriormente se fijaron con metanol al

TESIS CON  
FALLA DE CENSURA

50% en PBS por 10min a 4 °C o con etanol al 70% en PBS. Se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 50 UI/ml de RNAsa en PBS durante 1h a 37 °C. Posteriormente se tiñeron con 20 UI/ml de yoduro de propidio (200 mg/l) en PBS durante 2min. Se resuspendieron en PBS y se evaluaron en el citómetro de flujo (65).

#### **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 (66-68)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

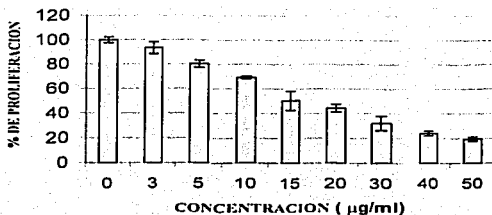


**RESULTADOS**

La regulación de la división celular está dada por factores solubles que secretan las células al medio. Tales factores son capaces de actuar sobre las mismas células que los secretan, así como en diferentes tipos celulares. En el caso particular de las células fibroblásticas provenientes del cérvix, se ha reportado que son capaces de secretar un factor con actividad inhibidora de la proliferación de las células fibroblásticas, así como de células tumorales provenientes de tumores de cérvix humano, denominado FIP (37). Sin embargo, pese a demostrar que presenta una actividad inhibidora de la proliferación, no se ha demostrado si dicha actividad ejerce su acción en alguna fase específica del ciclo celular y si induce a las células hacia la apoptosis ó sólo es un factor citostático. Al respecto, se cultivaron células fibroblásticas en RPMI al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) con el propósito de que las células se adhirieran a la caja de cultivo. Una vez adheridas, los cultivos fueron lavados con una solución salina de fosfatos (PBS), con la intención de retirar en lo más posible los factores de crecimiento y proteínas contenidas en el SFB. Posteriormente, se añadió únicamente RPMI y las células fueron incubadas durante 48h más. Al término del tiempo, el sobrenadante fue colectado y centrifugado. El sobrenadante fue concentrado por liofilización y desalado por diálisis. El dializado fue esterilizado por filtración a través de una membrana de 0.22 micrómetros y la concentración de proteínas fue determinada a través de la técnica del BCA. La actividad inhibidora fue determinada en la línea celular HeLa y en los fibroblastos del cérvix (Figura 1).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### CÉLULAS TUMORALES HeLa



### CELULAS FIBROBLÁSTICAS

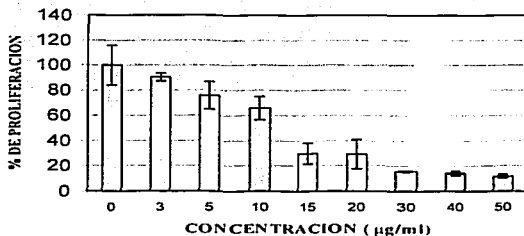


Figura 1. Efecto de los medios condicionados concentrados sobre las células tumorales de la línea HeLa y células fibroblásticas. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y el medio condicionado fue puesto en el momento de la siembra. La evaluación se realizó a las 72h de la estimulación con 0,3,5,10,15,20,30,40 y 50 µg/ml respectivamente de proteína total en el medio concentrado.

Los resultados muestran que el FIP disminuye la proliferación celular hasta en un 50% en células tumorales y 70% sobre células fibroblásticas a concentraciones de 15 µg/ml

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

manteniendo una viabilidad celular por encima del 90%. A concentraciones mayores se vuelve citotóxico ya que las células se despegan de la caja de cultivo y modifican su morfología.

El dializado fue separado en una columna de exclusión molecular y la actividad del FIP fue registrada en las fracciones correspondientes a un peso molecular entre 20 y 30 KDa (Figura 2), por lo que se procedió a generar una muestra enriquecida de estas fracciones, con el objeto de utilizarla en los demás ensayos.

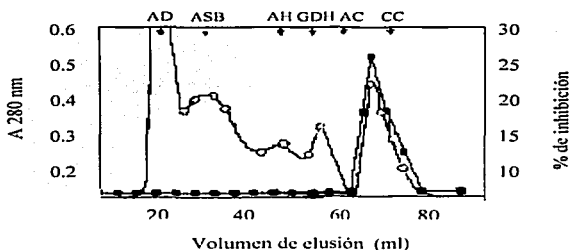


Figura 2.- Separación por cromatografía de exclusión molecular del factor inhibidor de la proliferación presente en el medio condicionado de cultivos de fibroblastos confluentes, provenientes de cérvix de pacientes con miomatosis uterina 750mg/0.5ml de medio condicionado concentrado, fue separado a través de una columna de Sephacryl S-100 HR ( 35 X 1.5cm de DI) a una velocidad de flujo de 18ml/h. La columna previamente calibrada con PBS, fue calibrada con proteínas con pesos moleculares estándares: AD (Azul Dextran, 2000 KDa) ; ASB (Albumina Sérica Bovina 68KDa) ; AH (Albumina de Huevo 45KDa) ; GDH ( Gliceraldehido-3-fosfato Deshidrogenasa 36 KDa) ; AC ( Anhidrasa Carbónica 29KDa) ; y CC ( Citocromo C 12.4 KDa) . La densidad óptica de las fracciones fue monitoreada cada 2ml a 280nm (círculos) , cada fracción colectada fue empleada para evaluar el efecto sobre la proliferación de fibroblastos en crecimiento exponencial ( cuadros).

El hecho de saber que los fibroblastos son capaces de producir un factor con actividad inhibidora de la proliferación genera la inquietud de saber si este factor está relacionado con el paro del ciclo celular. Para dar respuesta a dicha inquietud,  $1 \times 10^6$  células fibroblásticas y

tumorales fueron sembradas en cajas de cultivo de 60 mm y estimuladas con 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de la fracción activa del medio condicionado de fibroblastos, con el propósito de determinar la distribución del ADN en el ciclo celular y de esta manera ver en que fase del ciclo celular son detenidas las células (Figura 3).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

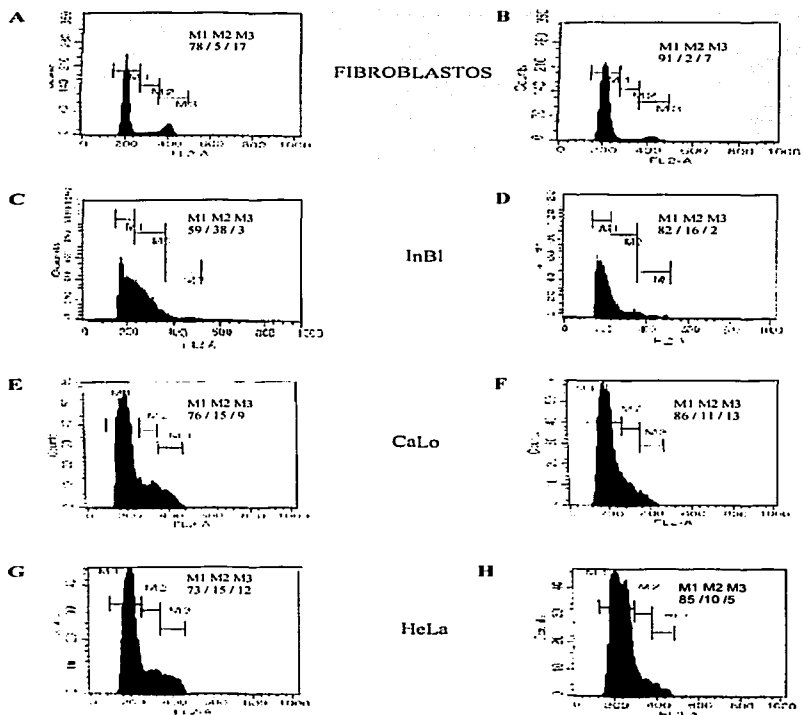


Figura 3. Efecto del FIP en el ciclo celular de fibroblastos y células tumorales CaLo, HeLa e InBi determinado por citometría de flujo. A, C, E y G son células cultivadas en RPMI, suplementadas con 10% de SFBS. B, D, F y H son células estimuladas con 15 $\mu$ g / ml de FIP. M1, M2 y M3, representa el porcentaje de células en las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>-M del ciclo celular respectivamente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los resultados confirman que el FIP actúa en la fase  $G_1$  del ciclo celular, ya que la cantidad de células en la fase  $G_1$  se incrementó en aquellos cultivos que fueron inducidos con el FIP en comparación con los cultivos control.

Dado que las células tumorales se caracterizan por presentar ciclos celulares continuos, y el hecho de que el FIP actúe en la fase  $G_1$  del ciclo celular, surge la necesidad de determinar qué proteína se encuentra implicada en el paro del ciclo celular, particularmente en la fase  $G_1$ . Es conocido que la proteína Rb es una proteína que regula la transición de la fase  $G_1$  a la fase S del ciclo celular, y que dicha regulación es llevada a cabo cuando la proteína Rb se encuentra en un estado de hipofosforilación. Al respecto, se cultivaron  $1 \times 10^6$  células tumorales y fueron estimuladas con  $15 \mu\text{g/ml}$  de FIP durante 24h. y la proteína total fue extraída para determinar la expresión de la proteína Rb a través de la técnica de inmunoelectrotransferencia (Figura 4).

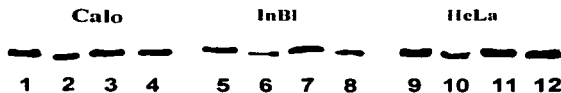


Fig.4. Efecto del FIP sobre la expresión de la proteína Rb en células tumorales.  $150 \mu\text{g}$  de proteína de lisado celular total de células tumorales Calo, HeLa e InBl cultivadas en RPMI suplementado con 10% de SFB y tratadas con  $15 \mu\text{g/ml}$  de FIP, fueron separados en SDS-PAGE al 7.5% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. El blot fue cortado entre el peso molecular de 98 y 130 kDa e incubado con anti-Rb y revelado mediante la técnica de fosfatasa alcalina. Los números muestran los carriles. Los carriles 1,5 y 9 corresponden al control o células no tratadas; los carriles 2,6 y 10 corresponden a las células en la fase  $G_0/G_1$ ; los carriles 3,7 y 11 corresponden a células tratadas con FIP; los carriles 4, 8 y 12 corresponden a células tratadas con  $10 \text{ ng/ml}$  de TGF $\beta$ .

La figura muestra que en los carriles donde las células no fueron tratadas con el FIP la banda está un poco más arriba que en aquellos carriles donde las células están en  $G_0/G_1$ , indicando que la proteína Rb se encuentra en el estado hiperfosforilado y en las células en  $G_0/G_1$ , Rb se encuentra en un estado hipofosforilado. Sin embargo, en las células tratadas con el FIP y con TGF $\beta$ , Rb se encuentra en estado hiperfosforilado, indicando que la proteína Rb no se ve

alterada en el efecto del PIF, mientras que con el TGF $\beta$ , Rb al estar hiperfosforilada sugiere un mecanismo de resistencia en contra del efecto inhibitor de este factor.

Otra proteína importante en la regulación del ciclo es la proteína p27, originalmente identificada como un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (CDK), que detiene la progresión del ciclo celular en respuesta a inhibición por contacto o por la inducción de TGF $\beta$ . Además p27 se incrementa durante la diferenciación y ha mostrado ser un importante regulador de la progresión de las fases G<sub>1</sub>/S del ciclo celular al unirse a los complejos ciclina D-cdk4 y prevenir con ello su activación. Para determinar si el FIP afecta la expresión de esta proteína, se cultivaron  $1 \times 10^6$  células tumorales y fueron estimuladas con  $15 \mu\text{g/ml}$  de FIP durante 24h y la proteína total fue extraída para determinar la expresión de p27 a través de la técnica de inmunoelectrotransferencia (Figura 5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

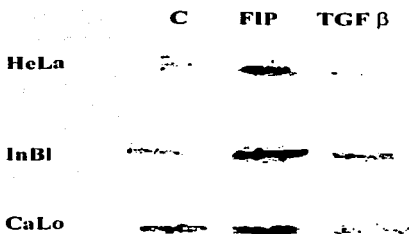


Figura 5. Determinación del efecto del FIP sobre la expresión de p27 en células tumorales. 150  $\mu$ g de proteína de lisado celular total de células tumorales CaLo, HeLa e InBl cultivadas in RPMI suplementado con 10% de SFB y tratadas con 15  $\mu$ g/ml de FIP fueron separados en SDS-PAGE al 7.5% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. El blot fue cortado entre el peso molecular de 20 y 30 KDa e incubado con anti-p27 y revelado mediante la técnica de fosfatasa alcalina. C: Control; FIP: células estimuladas con el FIP; TGF: células tratadas con 10 ng/ml de TGFβ

Los resultados indican que el FIP incrementa la expresión de p27 en las células tumorales, implicando a ésta proteína como una de las proteínas de ciclo que intervienen en su vía de señalización. Sin embargo, el TGFβ no afecta la expresión de p27 en estas líneas ya que no hay diferencia con el control.

Dados estos resultados, si bien es cierto que el FIP es un factor que actúa en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular y que p27 se encuentra involucrada, existe la incertidumbre de que el FIP no sólo detenga el ciclo celular sino que pudiese ser un factor apoptótico. Para dar respuesta a dicha incertidumbre, las células tumorales fueron tratadas con 15 $\mu$ g/ml de FIP y el efecto apoptótico fue evaluado a través de un Kit para apoptosis, basado en la actividad de la caspasa 3 para degradar a su sustrato (Figura 6).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



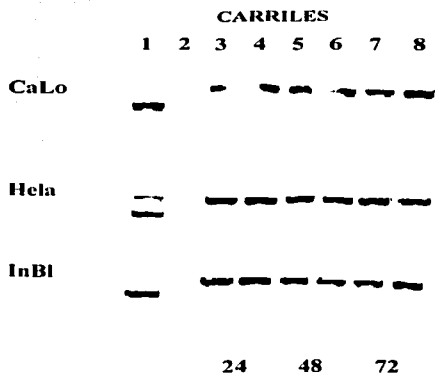


Figura 6. Efecto del FIP en la actividad de la caspasa 3 en las líneas celulares CaLo, HeLa e InBl, utilizado como un indicador de apoptosis. Los números indican los carriles: 1 células expuestas a luz ultravioleta por 16 hrs; 2, carril vacío; 3, 5 y 7 células no tratadas; 4, 6 y 8 células tratadas con 15µg de FIP. 24, 48 y 72, indica las horas de cultivo.

Los resultados obtenidos revelan que el FIP no induce la activación de la caspasa 3 a diferencia de la luz UV sugiriendo que se trata de un factor no apoptótico y muy probablemente sea un factor citostático.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANALISIS DE RESULTADOS

Los seres vivos estamos constituidos por diversas poblaciones celulares que presentan diferentes ritmos de crecimiento, de tal manera, que les permiten mantener la integridad y funcionalidad del individuo. Uno de los mecanismos utilizados por las células para lograr esta organización, es a través de diferentes moléculas bioquímicas que son producidas por ellas mismas y que pueden tener un efecto parácrino, endocrino o autócrino. Entre éstas existe un grupo de moléculas denominadas factores de crecimiento, que son capaces de regular la división celular ya sea en forma positiva o negativa.

Desde hace algunas décadas se ha mostrado un gran interés por el estudio de esos factores reguladores del crecimiento celular y se ha reportado que existen diferentes líneas celulares tales como fibroblastos y epitelios capaces de producir, en cultivo, diferentes moléculas que pueden estimular o inhibir el crecimiento de ellas mismas o de otros tipos celulares (15). Algunos de estos factores ya han sido bien caracterizados bioquímicamente, sin embargo muchos de ellos aun no han sido bien estudiados. Uno de los factores que recientemente han sido reportado es el FIP, el cual es producido por células fibroblásticas y que es capaz de inhibir la proliferación de células tumorales en cultivo así como la de células epiteliales y fibroblásticas (37). Nuestro estudio reveló que el efecto de FIP es dosis dependiente, logrando una inhibición del 50% en las células tumorales de la línea HeLa cuando se encuentra a una concentración de 15µg/ml en el medio de cultivo y del 70% en fibroblastos provenientes de cérvix a la misma concentración (Figura 1). Se sabe que dentro de los medios condicionados se encuentran diversas proteínas además de FIP que pudieran, en un momento dado, interferir con nuestro estudio, por lo que los medios condicionados se fraccionaron en una columna de exclusión molecular, corroborándose que la fracción con actividad inhibitora tiene un peso molecular entre 20 y 30

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

kDa con un pico máximo cercano a los 23 kDa , (Figura 2) por lo que las muestras enriquecidas con esta fracción fueron las más adecuadas para los ensayos efectuados.

La mayoría de los factores inhibidores de la proliferación celular actúan sobre la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (69-71) y el FIP no es la excepción, ya que en nuestros resultados se observa que al inducir los cultivos celulares con éste y evaluarlos por citometría de flujo, se incrementa el número de células que se encuentran en dicha fase (Figura 3) con lo que asumimos que el FIP, al igual que la mayoría de los factores inhibidores, ejerce su efecto sobre la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Por otro lado, hay muchas evidencias que muestran que la proteína Rb está directamente implicada en el control de la transición de la fase G<sub>1</sub>-S del ciclo celular a través de la represión de los promotores de la síntesis de ADN (72-76), sin embargo, nuestros resultados sugieren que Rb no está implicada en el mecanismo de inhibición que utiliza el FIP para lograr su efecto.

No obstante, este resultado tendrá que corroborarse en un futuro, ya que sólo se detecta una banda en el blot, sugiriendo que el poder de resolución fue bajo, no permitiendo ver los dos estados de fosforilación en la misma muestra o con el mismo inductor, como se ha descrito en otros trabajos en donde se evalúa Rb (73-75,77) (Figura 4). Con lo que respecta a su mecanismo de acción, es claro que p27 es una de las proteínas supresoras que participan en el mecanismo de acción del FIP ya que su expresión se ve incrementada en las células tumorales cuando son inducidas con el FIP, lo cual no es de sorprenderse, ya que es sabido que p27 se considera una proteína supresora de tumor (78) (Figura 5) y podría actuar inhibiendo la formación de complejos de la ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2, ciclina D1-CDK4 o CDK6 como se sabe actúa esta proteína (79). Finalmente, se determinó que el paro del ciclo celular inducido por el FIP, no provoca que las células activen su vía apoptótica, dado que no se encontró la actividad de la caspasa 3 en las células tratadas con el mismo (Figura 6) y aun que datos recientes nos indican que en la apoptosis no necesariamente están implicadas todas las caspasas (80,81), nuestras observaciones nos proporcionan información de que cuando el PIF es retirado de los medios de cultivo que se encuentran detenidos en la fase G<sub>1</sub> del ciclo, éstos continúan proliferando de manera normal, lo que fortalece nuestras conjeturas. No obstante se podrían utilizar otras técnicas como la tinción de núcleos por TUNEL para reforzar nuestros resultados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los resultados aportados, permiten establecer que el FIP es un factor secretado por células fibroblásticas que detiene el ciclo celular de las células tumorales de CaCu y de los propios fibroblastos en la fase  $G_1$  del ciclo celular y que para llevar a cabo dicho paro, se incrementa la expresión de la proteína p27. Esta información genera la posibilidad de que el FIP solo, o en combinación con otros factores inhibidores de la proliferación celular, pudiera ser considerado en la utilización para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la división celular, como es el caso del cáncer.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES

1. El FIP actúa deteniendo la proliferación de las células CaLo, HeLa e InBl así como fibroblastos de cérvix humano en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular.
2. El FIP incrementa la expresión de la proteína p27 en las células tumorales CaLo, HeLa e InBl.
3. El FIP no activa a la caspasa 3 en las células tumorales CaLo, HeLa e InBl.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BIBLIOGRAFÍA

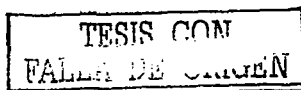
1. Cooper G.M. 2000. The cell: A molecular approach. Second edition. Sinauer associates Inc. Washington D.C. 689 pp
2. Karp G. 1992. Biología Celular. Segunda edición. Mc Graw Hill, México. 950 pp
3. Ming G. and Bruce A. 1999. Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:745-752
4. Finn G. 2001. Histología sobre bases moleculares. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. México. 813 pp
5. Scott A. G., Edward B. Leof, Gary D. Shipley and Harold L. Moses. 1986. Growth factors and cancer. *Can. Res.* 46:1015-1029.
6. Taylor J. M., Michelle W. M. and Cohens. 1972. Epidermal growth factor: Physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* 247:5928-5934.
7. Gospodarowicz D. 1975. Purification of a fibroblastic growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.* 250:2515-2520.
8. De larco J. E. and G.J. Todaro. 1978. Growth factor from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:4001.
9. Moses H. Yang and J. Pietenpol. 1990. TGF-  $\beta$ , stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights. *Cell* 63:245.
10. Daniel B. R, Phillip Dennis, Yasuformi Sato, Ryoji T. Subol. 1990. Cell to cell interaction and the control of growth factor activity. In Burger M., Sorday B., Zinkernagel R. (Eds) *Cell to Cell interaction*. Basel Karger. New York. 252 pp
11. James W. J, Nywana Sizemore, George Gorodeski and Hellen A. Rorke. 1995. Transforming growth factor  $\beta$  regulation of epidermal growth factor receptor in ectocervical epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 220:390-396.
12. Jin W. K., Ho Shik Kim. In Kyung Kim, Mee Ran Kim, Eun Young Cho, Heung Kee Kim, Joon Mo Lee, and Sung Eun Namkoong. 1998. Transforming growth factor  $\beta$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- induces apoptosis through down-regulation of c-myc gene and overexpression of p27<sup>KIP1</sup> protein in cervical carcinoma. *Gyn. Oncol.* 69:230-236.
13. Dimitris Kleitsas, Dimitri Stathakos, Vincenzo Sorrentino and Lennart Philipson. 1995. The growth- inhibitory block of TGF- $\beta$  1s located close to the G<sub>1</sub>/S border in the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 217:477-483
  14. Rorke A. E., Desheng Zhang, C.K. Choo, Richard L. Eckert and James W. Jacobberger. 2000. TGF- $\beta$  mediated cell cycle arrest of HPV-16-Immortalized human ectocervical cells correlates with decreased E6/E7 mRNA and increased p53 and p21<sup>WAF-1</sup> expression. *Exp. Cell Res.* 259:149-157.
  15. Wang L. J. and Yen-Ming Hsu. 1986. Negative regulators of cell growth. *J. Cell Biol.* 102:362-369.
  16. Kurzrock K., Talpaz M., and U. Guttermaj. 1991. Interferons. In: de Vita B. , Hollman S., S. Rosenberg (eds). *Biologic Therapy of Cancer*. Lippincot Co. USA. 247 pp
  17. Foxwell B. M., Barret K. and M. Feldman. 1992. Cytokine receptors: Structure and signal transduction . *Clin. Exp. Immunol.* 90:161.
  18. Aggarwal B. B. 1992. Tumor Necrosis Factor in: Aggarwal B. B., J. U. Gutterman. (eds). *Human Cytokines*. Blachwell Scientific Publications. USA. 270 pp
  19. Balkwill F. R. 1988. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. *cytokines in cancer therapy*. Oxford University Press. Oxford. 347 pp
  20. Fiers W., Browekaert P. and A.L. Goldberg. 1987. Structure-function relationship of tumor necrosis factor and its mechanism of action in: Tumor necrosis factor and related cytokines (Ciba Foundation Symposium 131). Chichester. Wiley (Eds). 109 pp
  21. Dower S. K., Sims J. E., Ceretti D.P. and T.A. Bird. 1992. The interleukin-1 system: receptors, ligands and signals. *Chem. Immunol Karger*. Zwitterland. 33 pp
  22. O'Neil L.A., Bird T.A. and J. Saklatvala. 1990. Interleukin-1 signal transduction. *Immunol Today* 11:390.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

23. Palmer J. N., Hartogensis W. E., Patten M., Fortuin D. and C.S. Long. 1995. Interleukin 1- $\beta$  induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblasts proliferation in culture. *J. Clin. Inv.* 95:2555.
24. Kilian P.L., Kaffka K.L., Biondi D.A., Lipman J.M., Benjamin W.R., Feldman D. and C.A. Campen. 1991. Antiproliferative effect of Interleukin-1 on human ovarian carcinoma cell line. *Can. Res.* 51:1823.
25. Smith K.A. 1988. Interleukin-2, a potent T-cell growth regulator. *Science* 240:1169-1179.
26. Waldman T.A., C. K. Goldman, R. J. rob, J.M. Deepr, W.J. Leonards, O. Sharrow, K. Bongiovanni, S.J. Korsmeyer and W.C. Green. 1984. IL-2 affects growth and differentiation of B Cells. *J. Exp. Med.* 160:1450-1466.
27. Smith K.A. Effect of IL-2 on killer cells and some non-lymphoid cells *Curr. Opin. Immunol.* 4:271-276.
28. Rubinchik E. and Francesca Levi-Schaffer. 1996. Interleukin-2 inhibits 3T3 fibroblast proliferation. *Life Sci.* 58:1509-1517.
29. Satoshi Yasumura, Wen-chang Lin, Eckart Weidmann, Patricia Hebda and Theresa L. Whiteside. 1994. Expression of interleukin-2 receptor on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin-2. *Int. J. Can.* 59:225-234.
30. Johnston G. Patrick, Christina M. Rondinone, Donna Voeller and Carmen J. Allegra. 1992. Identification of a protein factor secreted by 3T3-L1 preadipocytes inhibitory for the human MCF-7 breast cancer cell line. *Can. Res.* 52:6860-6865.
31. Masatoshi K., Keizoh Kawamura, Tamotsu Kondoh, Yoichi Wakano and Hiroshi Ishida. 1993. Purification of a fibroblast-inhibitory factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *FEMS Microbiology Letters.* 107:111-114.
32. McMurray H.F., D. Proudfoot, J.D. Davis, D.P. Parrott and D.E. Bower. 1993. A small molecular mass inhibitor of growth of 3T3 cells and porcine aortic smooth muscle cells released from the macrophage cell line P388D1. *J. Cell Sci.* 106:1301-1311.
33. Blat C., J. Villaudy and L. Harel. 1994. Density-dependent inhibition of mouse embryo fibroblast growth: Involvement of IGFBP-3. *Exp. Cell Res.* 215.114-118.





34. Caniggia I., Irene T'seu, Gaelle Rlland, Jeff Edelson, A. Keith Tanswell and Martin Post. 1995. Inhibition of fibroblast growth by epithelial cells in fetal rat lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13:91-98.
35. Chiecko H., Masako Ayaki and Yukiharu Inui. 1994. Isolation and Characterization of a growth inhibitory factor from hamster liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 1220:107-117.
36. Nobuko Satomi, Ruriko Haranaka and Katsuyuki Haranaka. 1996. Purification, characterization and anti-tumor activity of a new cytokine, Hstocyte-Screted-Factor (HSF). *Int. J. Can.* 66:209-213.
37. Sanchez S. L., Ma. Antonieta Chávez, Angel Manjares, Rebeca López, Edgar Centeno and Benny Weiss-Steider. 1999. Isolation of a proliferation inhibitor factor from uterine miomatosis fibroblasts. *Prep. Biochem and Biotechnol.* 29:23-33.
38. De robertis Eduardo. 2000. *Biología celular y molecular de De Robertis*. Editorial El Ateneo. Argentina. 820 pp
39. Peralta Z., Bahena R., Diaz B., Madrid M. 1997. Relationship between cell cycle and cancer development: Therapeutically approaches. *Salud pública, México.* 39:451-452
40. Israels E. D., L. G. Israels. 2000. The cell cicle. *The Oncol. Fund. Can. Med.* 5:510-513.
41. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition. Garland Publishing Inc. New York. 1387 pp
42. Darnell J., Havey Lodish and David Baltimore 1993. *Molecular cell biology*. Second edition. Scientific American Books. USA. 920 pp
43. Ramirez G. 1991. Boletín de información estadística de México. No. 11. Sistema nacional de salud. 35 pp
44. Rommery S.L. 1980. *Gynecology and obstetrics: The healt care of women*. Second edition. Mc. Graw Hill. Mexico. 430 pp
45. American Cancer Society. 2002. *Cancer Facts and Figures 2002*. Atlanta. 126 pp
46. Eifel PJ, Berek, JS, Thigpen JT. 2001. Cancer of the cervix, vagina, and vulva. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg S., (Eds) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins. 1526-1572 pp

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

47. Lascano P. Rojas M. López A. López C. Hernández A. 1999. Instituto Nacional de Salud Pública de México. 35:65-73
48. Massing. A. M. Epistein W. 1963. Study of human papiloma virus lesions. Arch. Dermatol. 87:306
49. Phelps W. Yee C. Munger K. Howley P. 1988. Benignant human larynx lesions and human papilloma virus type 6. Cell 53:539.
50. Mc Nab J. 1991. Human papillomaviruses and cervical cancer fro: Paterson Symposium No. 26 28-30<sup>th</sup> October 1991. Manchester, England. 450 pp
51. Haley N. Hoffman D. Wynder E. 1986. Uptake of tobacco smoke components In: Hoffman D. C.C. (Eds.) Mechanisms in tobacco carcinogenesis. Cold Spring Harbor NY. 186:3
52. Slattery M. Robinson L. Schuman K. 1989. Cigarette smoking and exposure to passive smoke are risk factors for cervical cancer. JAMA 261:1593.
53. Tak W. Munzenrider J. Mitchel G. 1979. External irradiation and one radium application for carcinoma of the cervix. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 5(1):29
54. Prempree T. 1982. Radiation treatment of carcinoma of the cervix with extension into the endometrium. Cancer 49:20.
55. Monroy G. A. 1991. Citotoxicidad de linfocitos de sangre periférica sobre células provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino en presencia de IL-2 recombinante humana. Tésis de maestría. México ENEP- Zaragoza UNAM. 93 pp
56. Krebs H. B. 1992. Nuevos métodos en tratamientos de CaCu. Memorias Universidad George Washington USA 158-165 pp
57. Ruiz O. E., González L. G., Escudero P., Sebastián M., 1994. Cáncer cérvico uterino microinvasor: Diagnóstico y tratamiento. Ginecol. Obstet. 62:237
58. Freshney R. 1994. Culture of animal cell. A manual of basics technique. Wiley-Liss Inc. New York. USA.397 pp
59. Griffiths B. 1988. Scaling-up of animal cell cultures 1ed. Freshney R.I. Animal cell culture:A practical approach IRL. Press England. 345 pp
60. Monroy G. A., Rosalva R., Leticia R., Catalina T., Jose Luis R., Rubén D., Benny W. 1992. Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cervix

TESIS CON  
FALLA DE CUBRIR

normal y con cáncer cérvico uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína. *Oncología* 7:69-76

61. Kueng W, Silber E. U. Eppenberger 1989. Quantification of cells cultured on 96 well plates. *Anal. Biochem.* 182:16
62. Smith P, Kronh R, Hermanson G, MalliaA. F. H, Gartner. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 150:76
63. Harlow D. D. Lane. 1988. *Antibodies: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Press. USA. 220 pp
64. López M.R., Gisela R., Criselda G., José Luis V., Luis S., Elba R., Alejandro Z., Luis Felipe M., 2002. Ceramide promotes the death of human cervical tumor cells in the absence of biochemical and morphological markers of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 239:1028-1036
65. Vindelov L, Christensen I, Nissen N. 1985. A Detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytom.* 6:348-356.
66. Zar Jerrold H. 1996. *Biostatistical Analysis.* Prentice Hall, New Jersey. 662 pp
67. Mendenhall W., Dennis D., Richard L. 1994. *Estadística matemática con aplicaciones.* Segunda edición. Grupo editorial Iberoamérica. México. 772 pp
68. Kreyszig E. 1991. *Estadística matemática , principios y métodos.* Editorial Limusa. México. 505 pp
69. Sporn, M., B. Roberts. 1985. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313:745.
70. Scott G. A, Leof E, Shipley G., H. L. Moses. 1986. Growth factors and cancer. *Can. Res.* 46:1015-1029.
71. Sellers W., Novitch B, Miyake S, Heith A, Otterson G, Kaye F, Lassar A, Kaelin W. 1998. Stable binding to E2F is not required for retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation and suppress tumor cell growth. *Genes Dev.* 12:95-106
72. Cornell-Crowley L, Harper J, Goodrich D. 1977. Cyclin D1/cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol. Biol. Cell.* 8:287-301

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

73. Bremner R. Cohen B. Sopta M. Hamel P. Ingles C. Gallie B. Phillips R. 1995. Direct transcriptional repression by pRB and its reversal by specific cyclins. *Mol. Cell Biol.* 15:3526-3265.
74. Beijersbergen R. Carlec L. Kerkhoven R. Bernards R. 1995. Regulation of the retinoblastoma protein -related p107 by G<sub>1</sub> cyclin complexes. *Genes Dev.* 9:1340-1353.
75. Adnane J. Shao Z. Robbins P. 1995. The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter. *J. Biol. Chem.* 270:8837-8843.
76. Buchkovich K. Duffy L. Harlow E. 1989. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58:1097-1105.
77. Sherr C. Roberts J. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 Phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
78. Perez-Roger. I. Solomon D. Sewing A. Land H. 1997. Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27 binding to newly formed complexes. *Oncogene* 14:2373-81.
79. Muller D. Boucherd C. Rudolph B. Steiner P. Anderson W. Eilers M. 1997. Phosphorylation of p27 by cyclin E/cdk2 facilitates its Myc-induced release from cdk2 complex. *Oncogene.* 14:2394-99.
80. Porter A. G. Janicke R. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6:99-104.
81. Zhihu Ding, Xialong Yang, Alan Pater, shou-Ching Tang. 2000. Resistance to apoptosis is correlated with the reduced Caspase-3 Activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells. *Biochemical and Biophysical communications* 270:415-420.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APÉNDICE I

### Medio RPMI-1640

El medio se utilizó para mantener en condiciones fisiológicas estables a las líneas celulares. El siguiente listado proporciona los componentes del medio.

Aminoácidos	mg/l
L-Arginina (libre de base)	200.00
L-Asparagina (Anhidra)	50.00
L-Aspártico	20.00
L-Cistina 2 HCl	65.20
L-Ácido glutámico	20.00
L-Glutamina	300.00
Glicina	10.00
L-Histidina (libre de base)	15.00
L-Hidroxiprolina	20.00
L-Isoleucina	50.00
L-Leucina	50.00
L-Lisina HCl	40.00
L-Metionina	15.00
L-Fenilalanina	15.00
L-Prolina	20.00
L-Serina	30.00
L-Treonina	20.00
L-Triptofano	05.00
L-Tirosina 2Na	28.83
L-Valina	20.00

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<b>Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
Biotina	00.20
D-Pantotenato	00.25
Ácido fólico	03.00
Cloruro de Colina	01.00
Mio-Inositol	35.00
Niacienamida	01.00
PABA	01.00
Piridoxina HCl	01.00
Riboflavina	00.20
Tiamina HCl	01.00
Vitamina B 12	00.005
<b>Sales inorgánicas</b>	<b>mg/l</b>
Nitrato de calcio 4H <sub>2</sub> O	100.00
Cloruro de potasio	400.00
Cloruro de sodio	6000.00
Sulfato de magnesio	48.84
Fosfato de sodio dibásico (Anhidro)	80.00
<b>Otros compuestos</b>	<b>mg/l</b>
D-Glucosa	2000.00
Glutati6n reducido	01.00
HEPES	5958.00

Forma de prepararse: en 950ml de agua bidestilada se diluyen 10.39g de RPMI-1640 (Sigma. USA), se adicionan 2.0g de bicarbonato de sodio, además los antibióticos penicilina

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

G100u/ml y estreptomycin 100µg/ml. Posteriormente se añoran a un volumen de 1000ml, agitándose hasta disolver. El medio se ajusta a un pH de 7.2-7.4 y se esteriliza con un filtro de membrana de 0.22µm en presencia de CO<sub>2</sub> finalmente el RPMI se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

## APÉNDICE 2

### Solución amortiguadora de fosfatos

Esta solución se uso para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos de tiempo. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfatos. Los componentes químicos se diluyen en un volumen final de 1000ml de agua bidestilada.

Componentes	g
Cloruro de magnesio	0.1
Cloruro de calcio	0.1
Cloruro de sodio	8.0
Cloruro de potasio	0.2
Fosfato ácido de Sodio	2.16
Fosfato diácido de Potasio	0.2

En la mayoría de las ocasiones se prescindió de Calcio y Magnesio, estas sales no son indispensables para la finalidad de este trabajo. Las restantes sales se diluyen en 800ml de agua bidestilada por agitación. Posteriormente se afora a un volumen final de 1000ml y esta solución se ajusta a un pH de 7.2-7.4. La solución amortiguadora se esterilizó utilizando filtros de membrana (Milipore, USA) con un poro de 0.22µm, finalmente la solución se almacena a una temperatura de 4°C hasta el momento de uso.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**APÉNDICE 3****Verseno**

Generalmente esta solución se emplea para disolver la tripsina y poder desprender a las células adherentes. Sus componentes son los siguientes:

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

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua destilada, el pH se ajusta a 7.7 con HCl y se afora a 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de autoclave.

**APÉNDICE 4****Preparación del colorante cristal violeta**

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200mM pH6; la cual consiste en agregar 3.96g de NaOH y 4.28ml de ácido fórmico aforados a 500ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución de cristal violeta es filtrada y posteriormente usada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## APÉNDICE 5

### Tripsina al 0.05%

La tripsina se utilizó para desprender a las células de los platos de cultivo y para la disgregación de tejido de córnix. Esta se preparó disolviendo 0.025g de tripsina (Sigma USA) en 500ml de verseno, todo en condiciones de esterilidad.

## APÉNDICE 6

### Análisis estadístico

#### Fibroblastos

Muestra	FIP ( $\mu\text{g/ml}$ )	D.O.			$(X_n)$	$(X_n - \bar{X})^2$	$\sum(X_i - \bar{X}_n)^2$
$\mu_1$	0	0.770	0.756	0.614	0.692	0.1289	0.0163
$\mu_2$	3	0.642	0.594	0.61	0.626	0.0859	0.0015
$\mu_3$	5	0.578	0.512	0.472	0.525	0.0369	0.0058
$\mu_4$	10	0.41	0.489	0.501	0.4555	0.015	0.0053
$\mu_5$	15	0.247	0.345	0.166	0.2065	0.0159	0.0225
$\mu_6$	20	0.146	0.12	0.259	0.2025	0.017	0.0132
$\mu_7$	30	0.109	0.129	0.106	0.1075	0.0508	0.0005
$\mu_8$	40	0.105	0.134	0.092	0.0985	0.0549	0.0013
$\mu_9$	50	0.088	0.144	0.078	0.083	0.0624	0.0038

$$\bar{X} = 0.3329$$

$$r = 9$$

$$n = 27$$

$V_o > c$  por lo tanto existe diferencia significativa entre 2 o mas pares de medias

$$\mu_1 = \mu_2, \mu_1 \neq \mu_3, \mu_3 = \mu_4, \mu_4 \neq \mu_5, \mu_5 = \mu_6$$

$$q_1 = 1.4031$$

$$q_2 = 0.0702$$

$$V_o = 44.97$$

$$\alpha = 0.05$$

$$P(V \leq c) = 0.95$$

$$c = 2.51$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Células HeLa**

Muestra	FIP ( $\mu\text{g/ml}$ )	D.O.			( $X_n$ )	( $X_n - X$ ) <sup>2</sup>	$\Sigma(X_i - X_n)^2$
$\mu_1$	0	1.219	1.082	1.26	1.2395	0.2837	0.0256
$\mu_2$	3	1.115	1.105	1.2	1.1575	0.203	0.0064
$\mu_3$	5	1.02	0.995	0.97	0.995	0.083	0.0013
$\mu_4$	10	0.866	0.81	0.85	0.858	0.0228	0.0024
$\mu_5$	15	0.692	0.688	0.556	0.624	0.0069	0.0133
$\mu_6$	20	0.576	0.507	0.521	0.5485	0.0251	0.0032
$\mu_7$	30	0.45	0.39	0.349	0.3995	0.0945	0.0052
$\mu_8$	40	0.315	0.4	0.283	0.299	0.1664	0.0107
$\mu_9$	50	0.225	0.31	0.227	0.241	0.2171	0.0052

$X = 0.7069$

$r = 9$

$n = 27$

 $V_0 > c$  por lo tanto existe diferencia significativa entre 2 o mas pares de medias

$\mu_1 = \mu_2, \mu_1 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5, \mu_5 = \mu_6$

$q_1 = 3.3075$

$q_2 = 0.0733$

$V_n = 100.83$

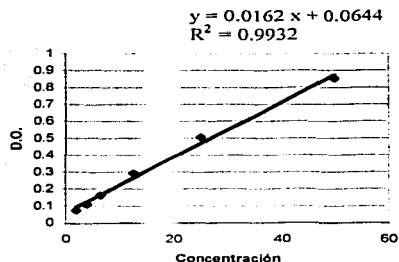
$\alpha = 0.05$

$P(V \leq c) = 0.95$

$c = 2.51$

**APENDICE 7****Curva patrón para la cuantificación de proteínas**

Concentración de proteína $\mu\text{g/ml}$	D.O. 562 nm
1.875	0.074
3.75	0.109
6.25	0.164
12.5	0.292
25	0.505
50	0.853



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN