
U A M - I
S. C. I. S.

ACTIVIDAD TRANSFORMANTE EN HIPERPLASIAS
MAMARIAS HUMANAS

TESIS QUE PRESENTA
ISAAC I. / RABINOVITZ STEMPA
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

MEXICO D.F. 1990

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA DE
IZTAPALAPA, BAJO LA DIRECCION DE:

M. en C. MARIA LUISA VILLARREAL O.	TUTOR
DR. MIGUEL BETANCOURT R.	ASESOR
M en C. JOAQUIN HERRERA M.	ASESOR

El presente trabajo contó con el apoyo económico de
FRONAES-SEP convenio No.: C86-01-0255 y con apoyo de la
Institución.

La Maestría de Biología Experimental de la Universidad
Autonoma Metropolitana de Iztapalapa cuenta con apoyo del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio
del convenio de fortalecimiento del posgrado nacional No.7 .

A mis Padres

A Rina

INDICE

-Agradecimientos.....	II
-Lista de abreviaturas.....	III
A. Resumen.....	1
B. Introducción.....	2
C. Marco Referencial.....	6
C.1 Factores de Crecimiento Polipeptidicos.....	6
C.2 Factores de Transformación.....	8
C.2.1. Factor de Transformación alfa.....	10
C.2.2. Factor de Transformación beta.....	12
C.3 La Glándula Mamaria.....	17
C.3.1 Algunos puntos importantes.....	17
C.3.2 Hiperplasias benignas de mama.....	22
C.4. Glándula Mamaria y Factores de Trasnformación.....	24
D. Objetivos e Hipótesis.....	26
E. Metodología.....	27
E.1 Reactivos.....	27
E.2. Obtención de la muestra.....	27
E.3. Extracción etanol-ácido.....	28
E.4. Determinación de la Actividad Transformante.....	29
E.5. Procedimientos Histopatológicos.....	30
E.6. Mediciones Morfométricas.....	30
E.7. Determinación de Acido Glucurónico.....	31
E.8. Sistema de Procesamiento de Imágenes.....	32
E.9. Pruebas Estadísticas.....	35
F. Resultados.....	36
F.1 Eficiencia y Presición del sistema de procesa- miento de Imágenes.....	36
F.2 Ensayo de Agar Blando con extracto plaquetario.....	36
F.3 Muestra de tejidos.....	39
F.4 Actividad transformante en los tejidos estudiados..	39
F.5 Mediciones Morfométricas.....	43
F.6 Correlación entre la actividad transformante y la celularidad tisular.....	46
F.7 Correlación con otros parámetros.....	47
G. Discusión.....	55
H. Referencias.....	69

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Maria Luisa Villarreal, al Dr. Miguel Betancourt y al M. en C. Joaquin Herrera por su orientación y estímulo en la realización de éste trabajo.

A los Doctores P. Maldonado y R.Ocampo Le Royale de los Servicios de Patología y Oncología del Hospital "20 de Noviembre" del ISSSTE por su colaboración en la obtención de los tejidos estudiados.

Al Dr. G.Gonzalez Almaraz por sus consejos y orientación

A la M. en C. Elvira Gonzalez S. por su ayuda metodológica.

*

LISTA DE ABREVIATURAS

EGF- Factor de crecimiento epidermico (Epidermal Growth Factor)

FGF- Factor de crecimiento fibroblastico (fibroblast growth factor)

IGF- Factor de crecimiento semejante a insulina (Insulin like growth factor)

PDGF- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet derived growth factor)

TGF- Factor de transformación (Transforming Growth Factor)

A. RESUMEN

Los factores de transformación (TGF, transforming growth factors) son proteínas que realizan diversas funciones en la regulación del crecimiento y diferenciación celulares. En este trabajo se estudió la presencia de estos factores en hiperplasias mamarias benignas y tejidos mamarios normales, mediante la determinación de la actividad transformante de sus extractos sobre fibroblastos normales (NRK 49-f) crecidos en agar blando con y sin factor de crecimiento epidérmico y su relación con el cuadro histopatológico. Los resultados muestran que los fibroadenomas contienen mayor actividad transformante que los tejidos normales, no así tejidos con mastopatía fibroquística que pueden tener niveles muy variables. Así mismo se encontró una correlación significativa de los niveles de celularidad mesenquimatosa y epitelial con la actividad transformante, sugiriendo la participación de estos factores en el desarrollo de estos tipos celulares. Se observó una interacción positiva entre epitelio y estroma en cuanto a la intensidad de la actividad transformante presente en el tejido. Aunque no se puede definir con certeza la naturaleza de la participación de los factores de transformación, los datos son congruentes con una estimulación del mesenquima, pero plantea una interrogante acerca de la falta de inhibición del epitelio, que coexiste y correlaciona con cantidades altas de actividad transformante.

B. INTRODUCCION

Los tumores mamarios ocupan un lugar primario en el campo de la salud por su alta morbilidad y mortalidad. EL estudio de sus mecanismos fisiopatológicos se ha intensificado en los últimos años, tratandose de reunir la mayor cantidad de información posible que conlleve a una comprensión integral del problema y por ende a elevar la posibilidad de encontrar nuevas herramientas de diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Uno de los temas mas estudiados al respecto, es el papel que juegan los factores de crecimiento polipeptidicos en el desarrollo de estas entidades fisiopatológicas. El presente estudio se ubica dentro de este tema, particularmente en el estudio de los factores de transformación en las hiperplasias benignas mamarias .

Los factores de transformación son una familia de polipéptidos que tienen la capacidad de hacer crecer fibroblastos normales en agar blando, sin que tengan que estar éstos anclados a un sustrato, propiedad característica de células transformadas (3).

Se han descrito dos formas diferentes de estos factores(28):

1.Factor de transformación alfa: Ejerce su acción a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico, guardando de hecho una homología de secuencia con este factor. El peso de la forma madura es de 6000 daltons(12).

Es un mitógeno importante de células epiteliales y mesenquimatosas. Se le ha encontrado principalmente en tejidos neoplásicos y embrionarios (11).

2. Factor de transformación beta: Ejerce su acción a través de su propio receptor y no guarda semejanza con el factor alfa. Su peso es de 25000 daltons y se han descrito varios subtipos (18). Su acción es multifuncional: mitógeno para algunos tipos de células mesenquimatosas, inhibidor para células de tipo epitelial; promotor de la diferenciación para algunos tipos celulares e inhibidor para otros; promotor potente de la formación de matriz extracelular (32). Esta presente en casi todos los tejidos normales. Se encuentra gran cantidad de este factor en las plaquetas (17).

En tejido mamario se ha encontrado ambos tipos de factores, aunque el tipo alfa principalmente en carcinoma (15). Su acción no se conoce con certeza aunque algunos estudios in vitro muestran que células transformadas provenientes de tumores mamarios son capaces de secretar y responder a estos factores en forma autócrina. En el caso del factor alfa la secreción es estimulada por estrógenos y ejerce un efecto estimulatorio sobre la proliferación de éstas células (65). Sucede lo contrario con el beta, que ejerce una acción inhibitoria sobre la proliferación y que disminuye sus niveles activos en presencia de estrógenos (66).

Los tumores mamarios tanto benignos como malignos, tienen una gran diversidad de cuadros histológicos. En estos se puede observar una mayor o menor cantidad de tejido mesenquimatoso acompañando a las células epiteliales. Es de gran importancia la interacción bilateral tumor-estroma en el crecimiento de un tumor y en la facilidad con que este puede invadir tejidos o metastatizar (67). El mismo tumor puede tener influencia sobre el estroma. Se ha descrito en varios estudios la influencia crucial que ejerce el estroma para el crecimiento del epitelio mamario: al parecer el efecto estimulador de los estrógenos es mediado por fibroblastos y muy probablemente por factores de crecimiento secretados al medio (43,44). En ausencia de fibroblastos los estrógenos no estimulan el crecimiento epitelial. Esta influencia es bilateral ya que el mismo epitelio estimula a los fibroblastos en presencia de estrógenos(44).

Pensamos que los factores de transformación pueden estar regulando la formación del estroma mamario, apoyándonos en el hecho de que estimulan la formación de matriz extracelular (34,33) y regulan el crecimiento de tejido mesenquimatoso (31). Las hiperplasias mamarias benignas resaltan por su gran variabilidad en la cantidad de estroma y epitelio que presentan y sugieren ser un modelo interesante para estudiar el papel de los factores de transformación in vivo.

En este trabajo se ha estudiado la actividad transformante existente en diversos tipos de hiperplasias

mamarias benignas y se ha buscado alguna relación con su cuadro histopatológico, particularmente con la cantidad de estroma y epitelio presentes. Ya que los factores ejercen una influencia importante sobre la matriz extracelular se ha buscado también una relación de éstos con la cantidad de glicosaminoglicanos presentes en los tejidos, pues son moléculas que ven aumentada su síntesis en presencia de los factores de transformación (34) y se encuentran presentes en las hiperplasias mamarias, particularmente en los fibroadenomas (87).

C.MARCO REFERENCIAL

C.1 Factores polipeptidicos de crecimiento .-

La interacción y comunicación entre las células son requisitos esenciales para el funcionamiento integral de un organismo multicelular durante su desarrollo y vida madura. La regulación del crecimiento y diferenciación celulares dependen en gran medida de estas interacciones. Uno de los mecanismos mas importantes que se utilizan para lograr esta comunicación es la secreción de diversos factores . La naturaleza química de estos factores es variada, pero existe un grupo de proteínas que parece ser responsable en gran parte de la regulación del crecimiento y diferenciación celulares. Estas han sido denominadas factores polipeptídicos de crecimiento. Mas de 20 tipos diferentes de estos factores se han caracterizados e incluso clonados (1)

Los factores polipeptidicos de crecimiento ejercen su influencia sobre la célula a través de un receptor de membrana de naturaleza glico-proteica enviando un mensaje al interior de la célula por diversos mecanismos. Dichos mensajes inciden sobre el crecimiento celular ya sea estimulando o inhibiendo .Algunos de los principales factores de crecimiento se describen en la tabla 1 (2).

Tabla 1.-CARACTERISTICAS DE VARIOS FACTORES DE CRECIMIENTOS

FACTOR	FUENTE	BLANCO	PESO MOLECULAR
Insulina	pancreas	general	6000
IGF-1 (Insulin-like growth factor)	plasma	general	7650
IGF-2	plasma	general	7500
FGF (Fibroblast growth factor)	pituitaria bovina	fibroblastos mioblastos músculo liso condrocitos glía endotelio	14000
NGF (Nerve Growth Factor)	glándula submaxilar	Ganglios del S.N. simpático y neuronas sen- sitivas	26500
EGF (Epidermal Growth Factor)	Glándula submaxilar, orina humana	epidermis, epiteliales diversas, endotelio, condrocitos, fibroblastos, glía	6000
PDGF (Platelet Derived Growth Factor)	Plaquetas	fibroblastos músculo liso arterial, glía	24000-31000
TGF alfa (Transforming growth factor)	células transformadas embrión	epitelio, mesénquima	6000
TGF beta	tejidos nor- males, plaque- tas,placenta	general	25000

C.2 Factores de transformación.-

Un grupo especial de este tipo de factores de crecimiento, los factores de transformación (TGF, transforming growth factors) fueron encontrados inicialmente en el medio condicionado por crecimiento de fibroblastos transformados con virus del sarcoma murino tipo Moloney, por Todaro y su grupo en el año de 1978(3).

Debido a que las células tenían los receptores necesarios para responder a los factores de transformación que ellas mismas producían, se acuñó un nuevo término para este fenómeno autoestimuladorio: secreción autócrina. Implicaba un mecanismo de transformación celular muy claro: Células que no necesitaban de factores externos para crecer, ya que ellas mismas producían los factores necesarios. Además se encontró que los TGF eran capaces de inducir en cierto tipo de células normales (fibroblastos de riñón de rata normal, NRK) un fenotipo de célula transformada (de ahí su nombre original).

Las características transformantes que los TGF inducen son: i) el crecimiento independiente de anclaje, ii) el crecimiento de células a densidades de población mucho mayores a las que alcanzarían en condiciones normales y iii) el crecimiento celular en policapas. Esta transformación es reversible: basta retirar del medio de cultivo estos factores para que la célula vuelva a la normalidad. Los medios condicionados de otras líneas

celulares humanas transformadas confirmaron la amplia presencia de estos factores(4).

Se les encontró en varios tejidos siendo gran parte de ellos de tipo neoplásico maligno (5); también se identificaron en el medio condicionado de células transformadas químicamente (6) y se inició su purificación (7).

Desde entonces se ha continuado una intensa labor de investigación sobre este tema tratando de caracterizar a estos factores, de encontrar sus tejidos de origen y de descubrir sus acciones fisiológicas u oncogénicas. Así mismo, se ha seguido estudiando el mecanismo de estimulación autócrina en otros sistemas, encontrándose cada vez mas datos que apoyan su existencia (8).

Mas adelante se encontró que esta actividad transformante estaba compuesta de dos principios aparentemente diferentes: aquellos factores que competían por el receptor del EGF (factor de crecimiento epidérmico ,epidermal growth factor,) y aquellos que no competían(9). Los primeros fueron denominados alfa y los segundos beta.

Una de las técnicas principales para diagnosticar la presencia de esto factores es la determinación de la ACTIVIDAD TRANSFORMANTE presente en el tejido o medio condicionado estudiados, probando su capacidad de hacer crecer fibroblastos normales de riñón de rata (NRK-49f) en agar blando(3). Estas células normalmente no crecen en este

medio, ya que no tienen donde adherirse. Al agregar medio con factores de transformación, se promueve el crecimiento de los fibroblastos en colonias que llegan a poblarse hasta con varias decenas de células a la semana de iniciado el cultivo. El TGF alfa se comporta como un requisito permisivo para que TGF beta ejerza una acción dosis dependiente: la concentración del factor está relacionada con el número de colonias formadas(10). Sin factor alfa, el factor beta no actúa.

C.2.1 TGF alfa.-

Este grupo de factores presentan pesos moleculares que van de 6 a 34 kD(11). El TGF alfa maduro de origen murino está compuesto por 50 aminoácidos proveniente de un precursor de 160 aminoácidos traducido de una RNA mensajero de 4,5 a 4.8 kB (12). Ya que solo ha sido encontrado un gen que codifica para este grupo de factores, es posible que todas las variaciones reportadas en la literatura (11) sean debidas al tipo de corte proteolítico a que sea sometido el precursor, a la formación de dímeros u oligómeros, o bien a la agregación de la forma madura a otras proteínas.

El precursor tiene una región hidrofóbica que le permite insertarse en la membrana plasmática y proyectar el segmento activo hacia el exterior (Fig 1). El precursor puede liberar el segmento activo para producir TGF alfa libre o bien permanecer en la membrana y ya que por si mismo tiene actividad, puede ejercer su función en la medida que contacte directamente otras células (11).

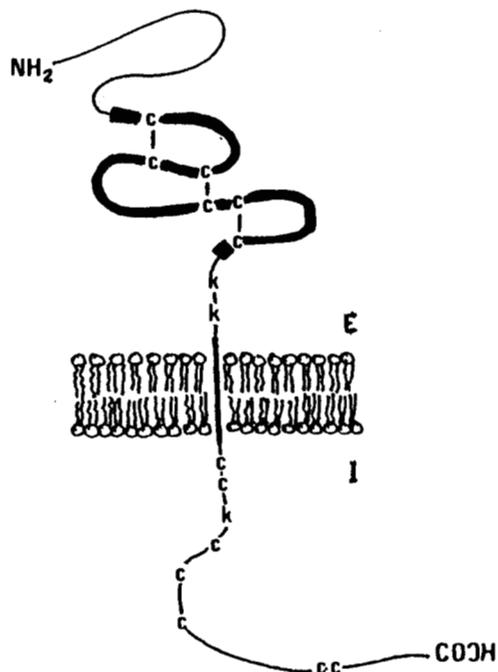


Fig.1.- El precursor de TGF alfa se inserta en la membrana plasmática. La proteína madura es liberada por proteólisis (línea gruesa).

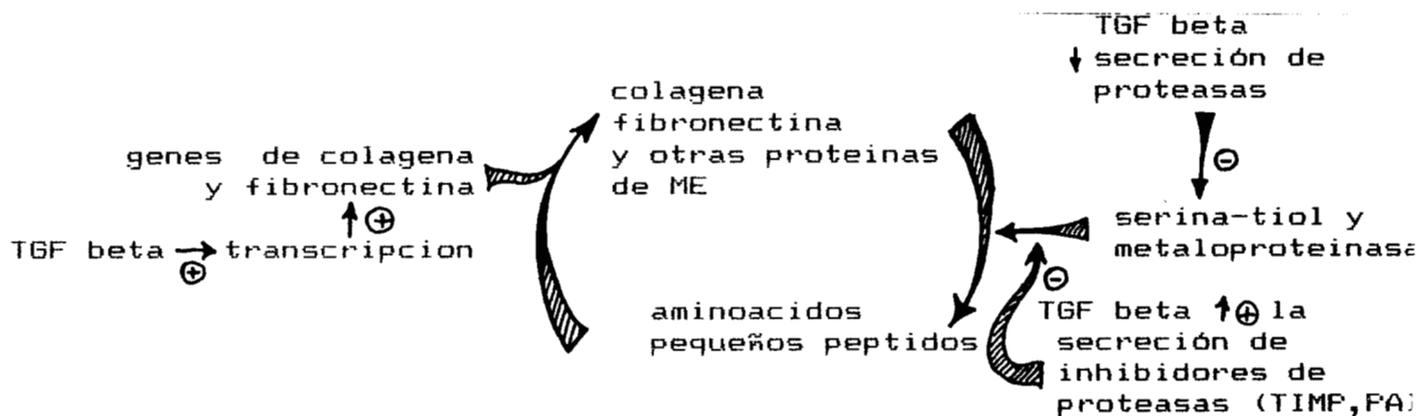


Fig.2
ACCION DE TGF BETA SOBRE LA MATRIZ EXTRACELULAR (ME)

El TGF alfa humano tiene una homología con EGF en 21 de sus 50 aminoácidos, compartiendo todas las cisteínas. El TGF alfa murino tiene en común con EGF solo 17 de los 50 aminoácidos. El TGF alfa ha sido encontrado con mayor frecuencia en células transformadas principalmente provenientes de tumores sólidos carcinomatosos y neuroectodérmicos (resalta su ausencia en neoplasias de origen hematopoyético) y en tejidos embrionarios.

Al parecer TGF alfa ejerce su acción a través del receptor de EGF uniéndose a este con la misma afinidad que el mismo EGF, aunque necesita de un intervalo de pH más restringido que EGF para unirse. Sin embargo su potencialidad en diversas acciones es diferente a la de EGF, por ejemplo TGF alfa es más potente que EGF en la promoción del crecimiento epidérmico, en la liberación de Ca^{++} en hueso (100X), en la proliferación de osteoclastos (10-100X) y en la angiogénesis. Se sospecha que pueda jugar un papel muy importante en la patología tumoral, independientemente de sus efectos mitogénicos, como en la resorción de hueso que se ve en tumores avanzados o en la angiogénesis, punto primario para el desarrollo de un tumor (11).

C.2.2.TGF beta.-

TGF beta es un homodímero de 25 kd que es producido por una gran variedad de células normales (10,13) y neoplásicas(14,15). Se encuentra en concentraciones relativamente altas en placenta(16) plaquetas(17) (hasta 100 veces más que en otros tejidos) y en hueso(18) , lo cual

sugiere que tenga una función primordial en la cicatrización y la remodelación ósea. Actualmente se han identificado dos formas moleculares de TGF beta que han sido denominadas TGF beta-1 y TGF beta-2. TGF beta-1 humano y porcino están compuestos de dos cadenas idénticas de 12500 daltons. Cada monómero es sintetizado como un segmento de 112 aminoácidos que conforma la parte COOH-terminal de un precursor de 391 aminoácidos (19,20). Su gén ha sido secuenciado y clonado (21). Ochenta de los 112 aminoácidos de TGF beta-2 son idénticos a TGF beta-1 conservando sus 9 cisteinas. En el precursor solo comparten 33 % de los residuos.

Es más abundante el TGF beta-1 (más del 80% en los diversos tejidos). En la mayor parte de los ensayos, las dos formas de TGF beta son indistinguibles en el aspecto funcional aunque presentan diferente afinidad por diversos receptores.

Han sido detectados tres tipos de receptores de membrana estructuralmente diferentes. El tipo I es una glicoproteína de 65 kD y se halla en la mayor parte de las células (22). El tipo II tiene un peso molecular de 95 kD (humanos y primates) u 85 kd (otros mamíferos)(23). El tipo III consiste en una subunidad de 280-330 kD asociado a una proteína de 560-600 kD (24). Este último receptor muestra una gran afinidad por TGF beta 1 y 2 , mientras que el tipo I y II muestran una afinidad 10 veces mayor por TGF beta-1 (25). Estos receptores a diferencia de los de EGF, no sufren

degradación al unirse al ligando (down regulation) (22). Los mecanismos de transducción de la señal generada por estos receptores se desconoce. Los receptores de TGF beta se han encontrado ampliamente distribuidos en las diversas células del organismo: fibroblasts, células epiteliales, endotelilales, mesoteliales y del sistema hematopoyético (22).

Los TGF beta pertenecen a una familia de péptidos relacionados estructuralmente y de acuerdo a una homología en su secuencia genética (tabla 2). Comparaciones filogenéticas con las secuencias de estos factores muestran un alto grado de conservación. Sus funciones son distintas y actúan a través de receptores diferentes (26).

La respuesta biológica a TGF beta depende del tipo de célula y es extremadamente compleja (27). En fibroblastos y osteoblastos parece estimular la proliferación mientras que en células epiteliales y carcinomatosas parece inhibir (28). Líneas celulares de epitelio bronquial, hepatocitos, epitelio mamario y epitelio renal son todas inhibidas por TGF beta en dosis picomolares, revelando a este factor como el más potente inhibidor fisiológico hasta el momento conocido. (22). Sus mecanismos de inhibición no están aún bien definidos, pero se sabe que ejerce influencia sobre la producción o acción de receptores de otros factores de crecimiento (29,30) o sobre la producción de los factores mismos (31). Ciertamente sobre sus mecanismos de

Tabla 2.-
FAMILIA DE FACTORES POLIPEPTIDICOS RELACIONADOS A TGF BETA

FACTOR	PESO MOL.	FUNCION
TGF beta (1y2)	25000	Regulador multifuncional del crecimiento y diferenciación celulares.
Inhibina	32000	Inhibición de la secreción de FSH por células hipofisiarias.
Activina	28000	Estimulación de la secreción de FSH por células hipofisiarias
MIS (Mullerian Inhibitory Substance)	140000	Inducción de la regresión del conducto Mulleriano en embriones machos.
DPFC (gen de Drosophilla)	?	Establecimiento de las especificaciones dorso-ventrales en embriones de Drosophilla
VG1 (gen de Xenopus)	?	Papel en la inducción del mesodermo durante el desarrollo de Xenopus.

transducción solo se conoce que no es a través de una proteína cinasa de tirosina (18).

En diversos casos TGF beta es un promotor de la diferenciación, mientras que en otros es lo contrario. Por ejemplo, promueve la diferenciación de células epiteliales bronquiales a células escamosas, mientras que bloquea la diferenciación de los linfocitos B hacia un estado activo de secreción de inmunoglobulinas (32).

Tiene una papel muy importante en la formación de la matriz extracelular. Se ha visto que es un estimulador muy potente de la producción y secreción de colágena(27) , fibronectina (33) y proteoglicanos(34) . Esta tendencia trófica se refuerza por otras acciones de TGF beta como la inhibición de la producción de colagenasas y otras proteasas, así como la estimulación de la producción de inhibidores de proteasas (35,36) (fig 2). Este tipo de acciones son de gran relevancia en los problemas de inflamación y reparación tisulares en respuesta a una lesión. El factor tiende a unirse a la fibronectina , acumulándose en el medio y conservando su actividad por un mayor tiempo(37). La estimulación de la síntesis de glicosaminoglicanos ha sido encontrada principalmente en líneas celulares de fibroblastos, en donde resalta la acción específica de TGF beta, pues ningún otro factor es capaz de estimular la síntesis de estas moléculas (34). Su importancia también se refleja en el papel que juega la matriz extracelular en el desarrollo embrionario (18).

En la tabla 3 se muestran los efectos de TGF beta sobre la expresión genética celular.

Poca información se tiene acerca de la acción de estos factores in vivo. La administración local de TGF beta promueve la velocidad de reparación tisular en heridas, promoviendo la migración de monocitos, fibroblastos y la formación de colágena(38).

C.3.Glandula mamaria.-

C.3.1.Algunos puntos importantes.- La glándula mamaria es una glándula sudorípara modificada que se desarrolla en una estructura funcional compleja. Es común considerar a la glandula mamaria como un arbol de multiples ramas constituidas por células epiteliales que termina en pequeños racimos denominados lobulillos(39). El tejido mesenquimatoso que queda entre los conductos y lobulillos epiteliales se denomina estroma mamario (fig 3).

La glándula se desarrolla principalmente despues de iniciados los ciclos menstruales, estando ligado su crecimiento a los niveles de estrogenos y progesterona. Los estrogenos estan relacionados con el crecimiento de los conductos mientras que la progesterona con el crecimiento de los lobulillos(40). En ausencia de estas hormonas, la glandula mamaria no se desarrolla y rara vez presenta patologia, como sería el caso de la glándula mamaria masculina. Otras hormonas de importancia son la prolactina, sin la cual las hormonas ováricas no tienen efecto sobre la glándula mamaria, y la hormona del crecimiento, cuya

Tabla 3.-
EFECTOS DE TGF BETA SOBRE LA EXPRESION GENETICA

CELULAS FIBROBLASTICAS

CELULAS EPITELIALES

Expresión aumentada:

c-sis
c-fos
c-myc
KC
JE
b-actina
g-actina
procolagena I
fibronectina
PAI-1
TGFbeta

c-sis
b-actina
receptor EGF
u-PA
PAI-1
TGF-beta

Expresion disminuida:

Transina
u-PA

c-myc
KC

No expresado

JE

Sin Efecto

c-fos

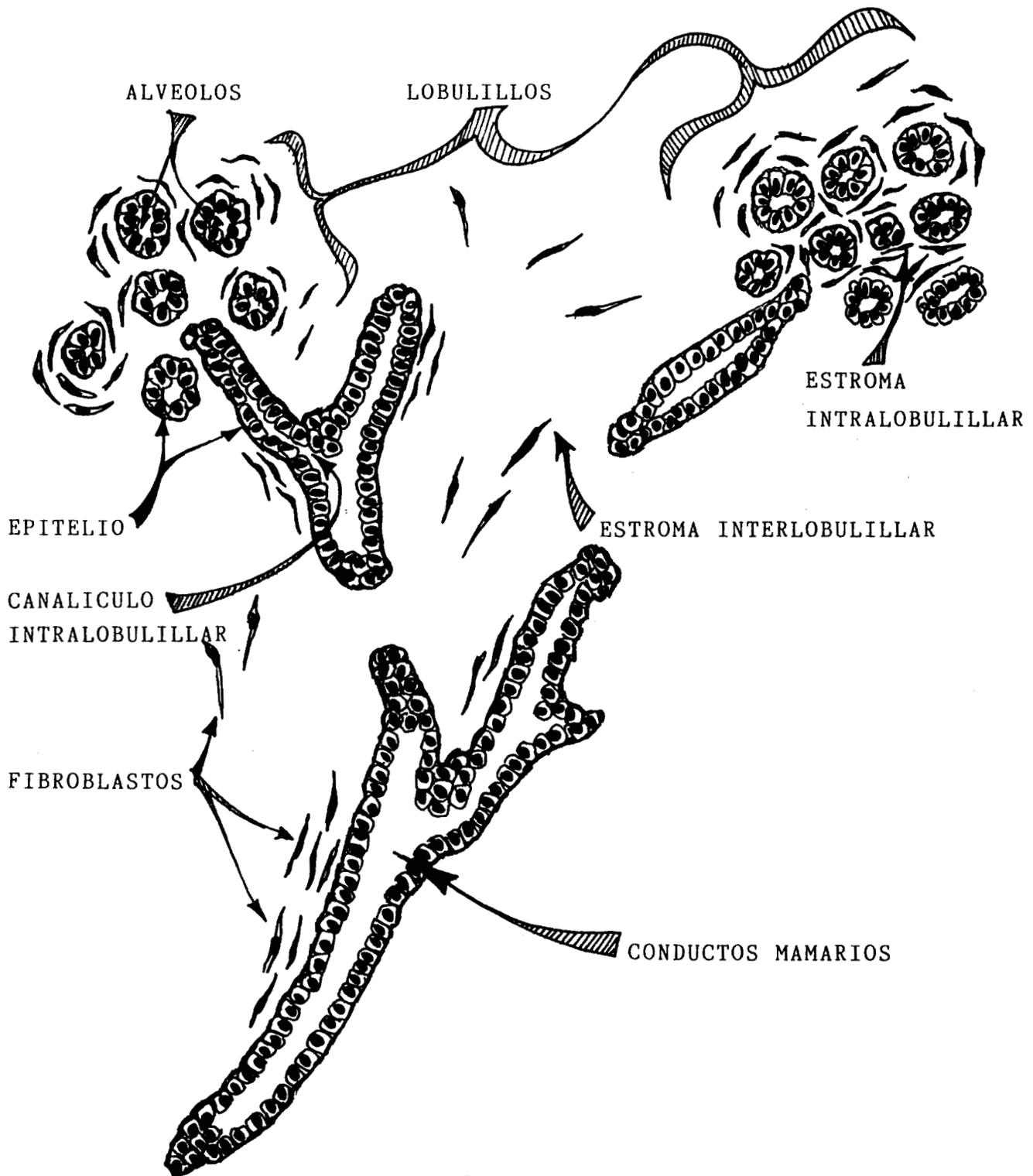


Fig. 3 .- ESQUEMA DE UN CORTE TRANSVERSAL DE LA GLANDULA MAMARIA

presencia permite el desarrollo completo de la glándula (41).

El mecanismo por el cual los estrógenos estimulan a las glándulas mamarias en su crecimiento no se conoce muy bien. Aparentemente ejercen un efecto a nivel local a través de un receptor propio que transloca al núcleo y se une a la cromatina cuando es activado por la hormona(40). También son importantes los efectos de los estrógenos en otros órganos, por ejemplo, la hipófisis, en donde induce la producción de prolactina, necesaria también para el desarrollo mamario. El epitelio en los seres humanos adultos, es el único tipo celular que porta receptores de estrógenos a diferencia del estroma que no los contiene: solo un 6 % del de las células epiteliales tiene receptores de estrógenos detectables (42). Uno de los productos que es consecuencia directa de la estimulación por estrógenos es el receptor de progesterona(40).

La proliferación por estimulación por estrógenos no parece ser un efecto directo , pues células epiteliales normales cultivadas in vitro no han mostrado ser estimuladas por estrógenos solos o en combinación de progestágenos(43).La interacción del epitelio con el estroma es importante para proliferar en respuesta a estrógenos (44). De esta forma , ha sido sugerido que los efectos de los estrógenos sobre la glándula mamaria son mediados por diversos factores polipeptídicos de crecimiento o algún otro mecanismo de comunicación

epitelio-estroma (45,46). Sin embargo se acepta que los estrógenos tiene una acción local, como se evidencia en algunos estudios (47,48) en donde se demuestra que un implante de estrógenos vecino a una glándula mamaria de ratón estimula las gemas epiteliales terminales cercanas, no así las lejanas o de otras glándulas en el mismo individuo (47). Ocurre un fenómeno semejante en el crecimiento de células tumorales mamarias a las que se les ha puesto un implante vecino (48). En el primer estudio de células normales (47) es interesante observar que las regiones epiteliales que tienen un mayor nivel de proliferación, contienen también los niveles mas bajos de receptores para estrógenos. Una vez más, esto podría ser interpretado en el sentido de que los estrógenos necesitan de mediadores para estimular a las células.

El adenocarcinoma mamario contiene receptores de estrógenos en un 60 % de los casos(46,49), mientras que las células normales no muestran un marcaje significativo. Las lesiones benignas de mama muestran variabilidad en los niveles de receptores estrogénicos, del 11-35% (49,50,51,52) aunque en estudios mas recientes usando métodos inmunohistoquímicos y análisis digital de imágenes(53), se encuentra que el número de células con receptores positivos en relación al total de células positivas y negativas, no varia significativamente del normal, aunque contenga mayor cantidad de receptores totales.

C.3.2 Hiperplasias benignas de mama.-

Las lesiones hiperplásicas benignas mas comunes son las que engloban la mastopatía fibroquística y los fibroadenomas.

La mastopatía fibroquística reúne una gran variedad de lesiones hiperplásicas que desde el punto de vista histopatológico se pueden agrupar como sigue (39):

- 1.Fibrosis.- caracterizada por un crecimiento aumentado del estroma sin ser acompañado de crecimiento epitelial
- 2.Enfermedad quística.-Se caracteriza por la formación de quistes a veces acompañados por hiperplasia de estroma y epitelio.
- 3.Adenosis esclerosante.- Se caracteriza histológicamente por fibrosis intralobulillar y proliferación de pequeños canaliculos o de los acinos.
- 4.Hiperplasia epitelial.- En estos casos la hiperplasia epitelial es hacia el interior de los conductos ya sea en forma de crecimiento papilar o sólido.

Se considera que este tipo de lesiones tiene su origen en un desbalance hormonal, principalmente de los estrógenos en relación a los progestágenos (39). Parecen tener mayor cantidad de receptores de estrógenos aquellas lesiones que tienen mayor proliferación epitelial, aunque no es un hallazgo constante (49), siendo la mayor parte de estas lesiones negativa a receptores de estrógenos.

El fibroadenoma es un tumor benigno en donde existe una hiperplasia de ambos componentes epitelial y mesenquimatoso

en diverso grado. A diferencia de la mastopatía, este crece bien circunscrito, formando nódulos contenidos en una pseudocápsula. (54,39). Su contenido de glicosaminoglicanos puede ser muy alto y dar una apariencia mixomatosa al tejido (87).

Se definen dos variedades: a)pericanalicular.- los conductos epiteliales crecen separados y el estroma crece rodeandolos. b)intracanalicular.- los conductos crecen juntos y engloban al elemento mesenquimatoso, que da la falsa impresión de crecer en el interior de un conducto.

Aunque no se conoce su etiología, se ha propuesto que sea resultado de una aumento de sensibilidad a estrógenos en una region localizada de la glándula. Su contenido de receptores de estrógenos es variable (55,49) aparentemente siendo mas frecuentemente positivos los que tienen mayor cantidad de epitelio (49), pero sin variar la relación de celulas receptor-de-estrógeno-positivas al total de células en relación a los tejidos normales (53). Ha sido controvertido cual de los dos tipos celulares es el que porta la lesión inicial, aunque se ha propuesto que la celula epitelial tiene algun defecto en la fabricación de la membrana basal(56), y que existe una lesión bioquímica a nivel del metabolismo de prostaglandinas y en la vía de respuesta a estas hormonas(57).

C.4 La glándula mamaria y los factores de transformación.-

Dentro del tema de este proyecto, han sido varios los trabajos que han buscado encontrar la acción que juegan los TGF en los tumores mamarios.

TGF beta ha sido encontrado en diversas líneas transformadas mamarias humanas(58,59), murinas(60) y en biopsias directas de tumores malignos de mama humana (61,15). También ha sido encontrado en secreción láctea . (61,62) así como en tejidos mamarios lactantes (63). TGF alfa también se ha encontrado en estos tejidos, aunque a diferencia de TGF beta, se ha encontrado con dificultad en los tejidos normales (46,64), pero presentándose en cantidades elevadas en tumores mamarios malignos (15). En algunas líneas tumorales mamarias parece existir una relación entre los estrógenos y los factores de transformación. En estas líneas celulares se ha encontrado que la producción y secreción de TGF alfa es estimulada por estrógenos y parece mediar la respuesta proliferativa en forma autócrina, ya que al neutralizar el medio en el cual se crecen estas células con anticuerpos anti-TGF alfa, se logra suprimir la estimulación por estrógenos (65). En forma consistente, los estrógenos disminuyen la producción de TGF beta, que también actúa en forma autócrina en estas células pero inhibiéndolas(66). El tamoxifén, inhibidor estrogénico actúa, al menos en parte, estimulando la secreción de TGF beta, que inhibe el crecimiento de estas células (66). No todas las líneas tumorales mamarias

confirman este sistema y es poco de lo que se conoce de estas interacciones in vivo(46).

D.OBJETIVOS E HIPOTESIS

-OBJETIVOS GENERALES

Conocer cual es el papel que desempeñan los TGF en diversos tumores mamarios benignos humanos

-OBJETIVOS ESPECIFICOS

a) Determinar la actividad transformante en tejidos mamarios normales y con patologia hiperplasica benigna.

b) Conocer la relación que guarda el cuadro histológico de éstos tejidos con la actividad tipo TGF.

c) Conocer la relación que existe entre la cantidad de glicosaminoglicanos y la actividad transformante presentes en los tejidos mamarios .

HIPOTESIS:

1. El crecimiento de tejido mesenquimatoso peritumoral esta relacionado con la actividad transformante. Se propone una elevación de la actividad transformante en cuadros que tengan una gran cantidad de tejido mesenquimatoso .

2. Varía la secreción de estos factores segun el tipo de lesión.

3. Las células epiteliales son inhibidas por TGF, por lo que se propone que una elevacion de la actividad transformante acompaña a una disminucion del elemento epitelial .

E. MATERIAL Y METODOS

E.1 Reactivos.- Todos los reactivos usados fueron de grado analítico. Pepstatina, Fenil-metil-sulfonil-floruro (PMSF), Ac. Glucurónico, Carbazole, Hematioxilina, eosina Y , medio mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM) , EGF, Glutamina, yodonitrotetrazolio , (Sigma Chemical). Etanol, Eter etílico, acidos acético, sulfúrico y clorhídrico, Cloruro de Sodio, EDTA , (Baker), Suero fetal de Bovino, Penicilina/Esterptomicina, Bicarbonato 7.5% (Microlab), tripsina (Difco), agar purificado (Merck).

E.2 Obtención de la muestra: Los tejidos fueron obtenidos de pacientes sometidos a cirugía en el servicio de Oncología del Hospital "20 de Noviembre", ISSSTE y en colaboración directa con el Servicio de Patología del mismo hospital.

Los tumores o tejidos mamarios, son enfriados a 4°C inmediatamente después de su remoción quirúrgica . El tumor es revisado macroscópicamente y muestreado ampliamente para estudio histopatológico. El resto es congelado a -70°C en la primera hora y es considerado adecuado para el estudio después de que no hay duda en el diagnóstico histopatológico.

E.3 Extracción etanol-ácido (68):

Los factores de transformación son extraídos de los tejidos mediante homogeneización en una solución de etanol/ácido (etanol 95% 375 ml, HCl concentrado: 7.5 ml, pepstatina, PMSF: 1.3 mg) a razón de 8 ml de solución por cada gramo de tejido mediante un homogeneizador de hélice coaxial (Biohomogeneizer). El material se ajusta con agua desionizada a un volumen final de 12 ml / gramo de tejido y se continua la extracción hasta la mañana siguiente. El extracto se centrifuga (15 min 10000 rpm 4°C), el sobrenadante se almacena y el sedimento se resuspende con la solución mencionada (sin inhibidores de proteasas) a razón de 4 ml/ gramo de tejido original ajustando con agua hasta un volumen final de 6 ml/gramo. Se continua la extracción durante 2 horas para finalmente centrifugar y reunir los sobrenadantes que contienen la actividad transformante. El sedimento se guarda para estudio de glicosaminoglicanos. A la mezcla de sobrenadantes reunidos se le ajusta el pH a 5.2 con hidróxido de amonio concentrado y se le agrega 1 ml de buffer de acetato de amonio 2M pH 5.3. por cada 85 ml de solución. Entonces se agregan 4 volúmenes de éter y 2 volúmenes de etanol absoluto fríos y se deja reposar la muestra por 36-48 horas a -20°C. El sedimento se recolecta mediante centrifugación (10 min 3000 rpm 4°C) y se redisuelve en ácido acético 1M a razón de 6 ml/gramo de tejido original. Esta mezcla se dializa ampliamente con una solución de ácido acético 0.1M en membranas de acetato de

celulosa (Spectrapor , peso molecular de exclusión de 3500 daltons), previamente tratadas con EDTA 0.5M 10 min. a temperatura de ebullición y 5 cambios en agua desionizada, misma temperatura . Finalmente se liofiliza la muestra y se almacena a -70°C para ser usada en los ensayos de agar blando.

E.4 Determinación de la actividad transformante (3,69).-

Ensayo de agar blando:

En cajas de 4 pozos (Nunc, 1.6 cm diametro) se fabrica una capa-soporte de 0.18 ml de agar purificado al 0.5% en DMEM con 10% de suero fetal de bovino y glutamina $2\ \mu\text{M}$. Se incluyen 3500 células indicadoras (NRK 49-F, cortesía Dr.J.Massague) en 0.15 ml de agar purificado al 0.3% en DMEM con 10% de suero fetal de bovino y glutamina $2\ \mu\text{M}$ a 45°C y se colocan sobre la primera capa. Estas células se obtienen de un cultivo semiconfluyente en monocapa despegando y disgregando las células con 1 ml de una solución de EDTA 1mM en PBS durante 20 segundos, retirando la solución y añadiendo 0.4 ml de una solución de tripsina 0.25% en PBS dejando en reposo durante 12 min, recolectando las células y diluyendo con DMEM-SFB. Las células se cuentan en cámara de Neubauer , tomándose la cantidad necesaria. Una vez solidificado el agar, se añade el extracto en la cantidad adecuada , disolviendolo previamente en una solución de HCl 4 mM y $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina bovina cristalizada, centrifugando para remover la fracción insoluble y posteriormente filtrando a través de un filtro de

nitrocelulosa (.22 μ m.Millipore). Los cultivos se incuban durante 7 días a 37 ° C en una atmosfera humidificada de bióxido de carbono al 5 %, flujo continuo. Las cajas se revisan constantemente para descartar contaminación. Al terminar la incubación, se agrega a cada pozo 30 μ l de una solución de yodo-nitro-tetrazolio (3 mg / ml en etanol 50%) dejandose reposar por 48 horas a 4°C.Se cuenta el número de colonias de más de 10 células (60 μ m de diámetro) por medio del sistema de procesamiento de imágenes (71,72) programa CONBIT (PAQUETE MORFOMETRICO II).

La actividad transformante de los extractos es medida por eficiencia de plaqueo: número de colonias celulares positivas (mayores a 60 μ m) por pozo / número de células sembradas. Una unidad de actividad = eficiencia de plaqueo de 1%. La actividad transformante especifica es el número de unidades de actividad transformante por gramo de tejido procesado.

E.5 Procedimientos histopatológicos(70).

Los tumores y tejidos mamarios se fijan y conservan en formalina al menos 24 horas. Posteriormente se lavan con agua de la llave corriente durante 2 horas y se deshidratan progresivamente en etanol (70% 12h, 80% 0.5h, 95% 0.5h X 2, 100% 0.5h X 3), se clarifican en xileno (0.5h X 2) y se incluyen en parafina (1 h X 3). Los cortes se tiñen mediante la técnica de hematoxilina eosina de Mayer:

1. Se remueve la parafina del tejido con xileno, rehidratando con etanol progresivamente mas diluido.
2. Se coloca en la solución de Mayer por 20 minutos (Hematoxilina 1g, Agua 1000 ml, Yodato de Sodio 0.2g, Sulfato de aluminio y amonio 50 g, Acido cítrico 1g)
3. Se lava con agua corriente durante 20 minutos.
4. Se coloca en una solución de eosina (eosina 1g, agua 100ml, alcohol 95% 300ml) durante 30 segundos y se lava con agua.
5. Se deshidrata progresivamente el tejido y se monta con resina.

E.6 Mediciones morfométricas : Se mide la celularidad epitelial y mesenquimatosa y la proporción de areas de los diversos tipos celulares, todo esto por el sistema de procesamiento y analisis de imagenes (71,72), programa DENAREA del PAQUETE MORFOMETRICO II.

Cada sección se analiza sistemáticamente para el cálculo de la proporción de area epitelial y conteo de nucleos en estroma. Los objetos de interes se segmentan del resto de la imagen y se modifican interactivamente cuando resulta necesario.

E.7 Medición de acido glucurónico por la técnica de carbazole (73):

10 a 20 mg del precipitado etanol ácido de los tejidos mamarios se lavan con acetona, se centrifugan a 5000 RPM 10 min, desechando el sobrenadante y deshidratando el

sedimento a 45° C durante 30 min. Se resuspende en 1 ml solución salina 0.85 % (p/v). Se agregan 5 ml de una solución de tetraborato de sodio (0.25 M en ácido sulfúrico concentrado) mezclando bien y calentando a temperatura de ebullición en baño María durante 10 min. Se enfría la mezcla y se agregan 0.2 ml de una solución de carbazole (0.125% en etanol) calentado a temperatura de ebullición durante 15 min. Se deja enfriar y se lee a 530 nm. Permanece estable 16 h. La curva de calibración se realiza con cantidades conocidas de ácido glucurónico en solución salina (0.02-0.2 uM).

E.8 Sistema de Procesamiento de imágenes(71,72).-

El sistema consta de una cámara Vidicon acoplada directamente al microscopio conectada a una computadora Apple II+ a través de una interfase digitalizadora (Imageworks II, Redshift Inc., Mountainview, CA) que genera imágenes de 256X256 pixels , 256 tonalidades de gris (fig 4.). El paquete de programas utilizado para análisis de imágenes fue elaborado en el laboratorio e incluye las siguientes funciones :

1. Captura de la imagen

2. Procesamiento de la imagen

-Sustracción de imagen de fondo (Background): Genera una imagen de baja frecuencia identificada como fondo para ser restada de la imagen de interés, con el objeto de eliminar las irregularidades de sombreado creada por alguno de los elementos de transmisión de la imagen.

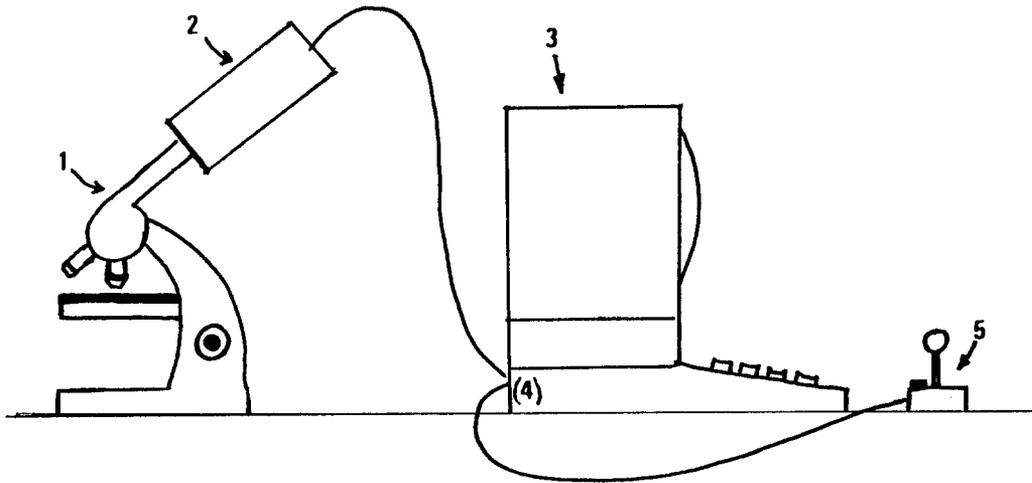


Fig 4.- El sistema de procesamiento de imágenes consta de 1.- microscopio 2.- cámara de video 3. computadora 4. tarjeta digitalizadora (dentro de la computadora) 5. palanca potenciómetro (joystick).

-Segmentación.- consiste en eliminar un rango de valores tonales de la imagen para separar los objetos de interés del resto de la imagen.

-Corte de la imagen(Rasura). Corta los bordes de la imagen para que se analice solo lo que se ve en pantalla .

-Mejoramiento de la imagen- generación de imágenes negativas, amplificación de la escala de tonalidades para aumentar el contraste.

-Edición de la imagen (pinta): generación de un cursor de tamaño modulable para borrar objetos no deseables en la imagen o de rellenar con alguna tonalidad modificable alguna región de interés.

3.Análisis de la imagen

-Calibración- se lleva a cabo mediante la medición de objetos de dimensión conocida.

-Tonalidad de una región (explorador, semilla):demuestra la tonalidad de un area especificada por un cursor o segmentada y mide el area.

-Longitudes,areas (en imágenes segmentadas totales o por la generación de semillas con algoritmos de relleno)

-Conteo y clasificación de objetos independientes. Usada en este caso para el conteo de colonias celulares y núcleos en el estroma. Se generan intervalos de clase para la clasificación, que puede incluir una matriz unidimensional (clasificación por area) o bidimensional (area y tono).

4.Operaciones externas- guardar o recuperar imágenes de diskette, o de datos obtenidos e imprimir la información.

E.9 Pruebas estadísticas.- Se utilizó la t de Student y la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnoff (68).

F.RESULTADOS

F.1 Eficiencia y precisión del sistema de procesamiento de imágenes (71,72). La captación de la imagen porta cierta distorsión geométrica producida por el microscopio y la cámara principalmente. Se calculó que esta distorsión es de 3% para este sistema.

El conteo de pixels en la pantalla es exacto (0% error) así como el conteo de objetos y la determinación de su área. Así pues, la variabilidad existente en este sistema en particular es debida principalmente a sus componentes optico-electrónicos de captación y el muestreo .

En el caso de la celularidad del estroma existe una variabilidad mayor debido a que la segmentación de la imagen es determinada por el usuario. En este caso se realizaron conteos visuales y digitales encontrándose una variabilidad de 6.3%.

El tiempo de medición de áreas por imagen es de unos 5 segundos mientras que el de conteo de objetos es de 20-40 segundos, dependiendo del número de objetos por imagen.

F.2 Ensayo de agar blando con extracto de plaquetas. El cultivo de fibroblastos en agar blando fue ensayado probando diferentes cantidades de un extracto etanol ácido de plaquetas, conocida fuente de TGF, mediante la metodología indicada. Los resultados se contemplan en las fig.5 y 6 , observándose la imagen característica de las

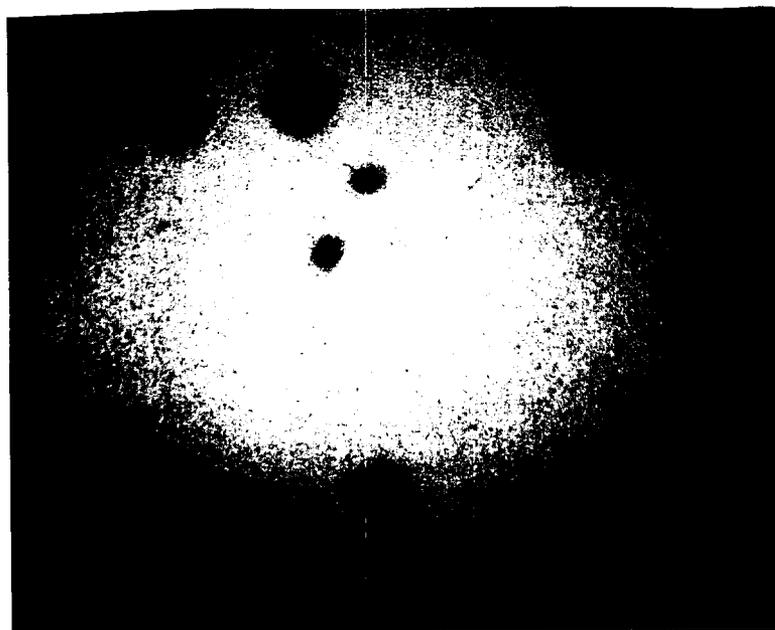


Fig.5 Microfotografía de un cultivo de fibroblastos en agar blando estimulado con extracto de plaquetas. Se observan las colonias teñidas con yodonitrotetrazolio (100 X)

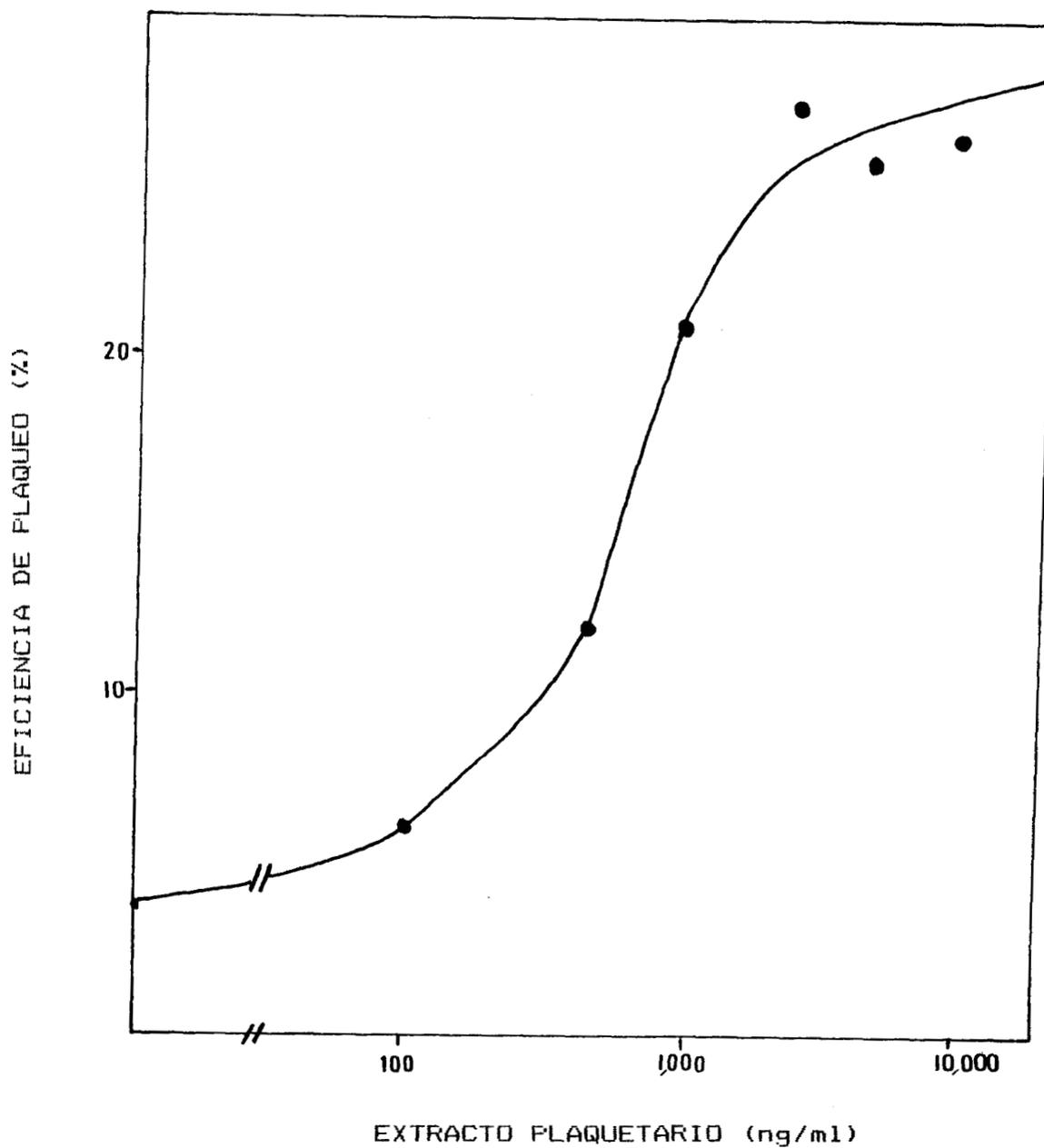


Fig 7.- Ensayo de agar blando de fibroblastos NRK-49F de acuerdo a metodología, con diferentes cantidades de extracto plaquetario en presencia de EGF 3.75 ng/ml. La eficiencia de plaqueo definida como porcentaje de colonias positivas (mayores a 60 μ m de diametro).

colonias de fibroblastos teñidas con colorante y la curva sigmoidea característica de estos factores.

F.3 Muestra de tejidos

Los resultados de los estudios histopatológicos de las muestras estudiadas así como algunos puntos importantes de las historias clínicas de los pacientes se presentan en la tabla 4 . En la tabla 5 se describen los pesos de las muestras que fueron procesadas, así como la cantidad de extracto etanol-ácido obtenido. En general se obtuvieron de 2 a 14 mg de extracto por cada gramo de tejido procesado, cantidad que no guardó relación con el tipo de tejido procesado.

F.4 Actividad transformante en tejidos mamarios

Los extractos fueron probados en ensayos de agar blando. . En la tabla 6 se encuentran los valores promedio de actividad para cada uno de los tejidos estudiados.

La eficiencia de plaqueo (EP) en estos ensayos fué determinada en presencia y ausencia de EGF con el objetivo de hacer una estimación de la actividad tipo alfa y de la actividad tipo beta presente en los tejidos. Mientras que la eficiencia de plaqueo con EGF, EP(EGF+) , nos habla principalmente de TGF beta (58), la eficiencia de plaqueo utilizando solo el extracto tumoral , EP(EGF-), nos habla de la cantidad de factores tipo alfa que ya existen en el tejido. De esta forma EGF revela toda la actividad transformante tipo beta que contiene el tejido (10).

TABLA 4
RELACION DE LA POBLACION DE PACIENTES Y SUS HISTORIAS
CLINICO-PATOLOGICAS

NO.	EDAD	A.GIN-OBS.	P.A.	DX.PATOLOGIA
A -	26	G2P1A1	6 meses	Fibroadenoma
B -	32	G3P3	1 mes	Fibroadenoma
C -	37	G2P2	3 meses	Fibroadenoma
D -	26	G2P2	2 meses	Fibroadenoma
E -*	31	G2P1C1	1 mes	Fibroadenoma
F -	43	G6P5A1	1 año	Fibroadenoma
G -	19	G0P0	6 meses	Fibroadenoma
H -	15	G0P0	1 año	Fibroadenoma
I -	16	G0P0	2 meses	Fibroadenoma
J -*	37	G2P2	3 mes.	Fibroadenoma
K -	22	G0P0	6 meses	Fibroadenoma
L -*	36	G3P3	1 año	Fibroadenoma
M -	12	G0P0	2años	Mastopatía fibroquística
N -	36	G3P3	5 años	Mastopatía fibroquística
O -	23	G2P2	1 año	Mastopatía fibroquística
P -	24	G1P1	2 meses	Mastopatía fibroquística
Q -	31	G2P2	6 meses	Mastopatía fibroquística
T -	29	G0P0	3 meses	Normal

* Se tomó una muestra de tejido normal adyacente al tumor
(claves S-, R-, U-, respectivamente)

P.A.= Padecimiento actual (detección de la tumoración)

G=Gestaciones P=Partos A=Abortos C=Cesareas

87092

 TABLA 5

RELACION DE LA CANTIDAD DE TUMOR PROCESADA Y LA CANTIDAD DE PRODUCTO OBTENIDO

TEJIDO	TIPO	PESO g	EXTRACTO mg	RELACION extracto/ tumor (mg/g)
A -	FA PC	3.91	28.78	7.36
B -	FA PC	1.03	14.21	13.80
C -	FA IC	4.55	31.54	6.93
D -	FA IC	3.22	19.80	6.14
E -	FA IC	2.65	13.02	4.91
F -	FA IC	2.30	9.40	4.08
G -	FA IC	0.69	6.75	9.78
H -	FA IC	0.56	4.20	7.50
I -	FA IC	0.28	3.37	12.03
J -	FA IC	1.03	6.72	6.52
K -	FA IC	1.03	7.86	7.63
L -	FA IC	0.26	2.43	9.34
M -	MF AE	5.33	27.46	5.15
N -	MF AE	1.35	14.35	10.6
O -	MF AE	1.45	7.85	5.41
P -	MF TC	0.52	3.87	7.44
Q -	MF QU	0.40	2.70	6.75
R -	NORM	3.49	21.16	6.06
S -	NORM	2.50	12.22	4.88
T -	NORM	4.72	20.78	4.4
U -	NORM	0.35	3.78	10.80

(FA=Fibroadenoma, IC=intracanalicular, PC=pericanalicular, MF=mastopatia fibroquística, AE=Adenosis Esclerosante, QU=enfermedad quística,TC=Túbulos ciegos, NORM= tejido normal)

 TABLA 6

RELACION DE ACTIVIDADES TRANSFORMANTES DE LOS EXTRACTOS DE TEJIDO MAMARIO PROCESADOS

CLAVE TEJIDO	EFICIENCIA DE PLAQUEO (EP)				ACTIVIDAD TRANSFORMANTE ESPECIFICA §		
	*EGF +		**EGF-		EGF+	EGF-	
	EP	µg/ml	EP	µg/ml			
A -	FA PC	10.9	24	15.9	100	3342	1170
B -	FA PC	5.5	24	7.1	100	3163	980
C -	FA IC	10.1	24	5.3	24	2916	1530
D -	FA IC	9.6	24	9.5	100	2456	584
E -	FA IC	9.2	24	6.0	100	1882	295
F -	FA IC	9.5	25	5.7	100	1553	233
G -	FA IC	15.0	100	3.0	100	1467	293
H -	FA IC	4.0	25	6.2	100	1200	465
I -	FA IC	9.0	100	4.5	100	1083	541
J -	FA IC	15.8	100	2.7	100	1031	176
K -	FA IC	11.2	100	7.6	100	854	580
L -	FA IC	6.5	100	nd	100	608	nd
M -	MF AE	16.9	24	10.3	100	3628	530
N -	MF AE	11.2	100	5.0	100	1191	531
O -	MF AE	9.7	100	4.0	100	525	217
P -	MF TC	4.1	100	1.6	100	305	119
Q -	MF QU	3.6	100	nd	100	243	nd
R -	NORM	10.7	100	3.3	100	649	200
S -	NORM	10.2	100	9.2	100	498	450
T -	NORM	11.7	100	nd	100	515	nd
U -	NORM	2.6	100	nd	100	281	nd

(FA=Fibroadenoma, IC=intracanalicular, PC=pericanalicular, MF=mastopatia fibroquística, AE=Adenosis Esclerosante, QU= enfermedad quística, TC= tubulos ciegos, NORM= tejido normal ,nd=no detectable, EGF= factor de crecimiento epidérmico)

*EP = (No.de colonias mayores a 60 µm x 100 / No. de células sembradas) - (eficiencia de plaqueo del control con EGF X=4).

**EP = (No.de colonias mayores a 60 µm x 100 / No. de células sembradas) - (eficiencia de plaqueo del control sin EGF X=0).

§ Una unidad de actividad transformante = eficiencia de plaqueo de 1

Actividad transformante específica= Unidades de actividad transformante por gramo de tumor = (EP)x(peso del extracto liofilizado mg)/(peso muestra ensayo mg)/(peso tumor g)

Para comprobar que EGF solo tiene este efecto de tipo interruptor, se realizó un ensayo utilizando cantidades progresivamente mayores de EGF y una cantidad fija de extracto plaquetario (fig 7). Se encontró que a partir de 2 ng / ml de EGF la eficiencia de plaqueo practicamente no aumenta. Se calculó en forma indirecta la actividad de tipo alfa de los tejidos procesados mostrandose los resultados en la tabla 7 y de acuerdo a la fórmula ahí descrita. Los resultados muestran una gran variabilidad sin diferencias significativas entre los diversos tipos de tejido y la actividad alfa.

El análisis que sigue se refiere al segundo principio, la actividad beta, medido en base a EP(EGF+).

El control EGF/ suero tiene una eficiencia de plaqueo promedio de 4 unidades, que son descontadas en las mediciones de EP(EGF+).

En relación al tipo de tejido, los fibroadenomas mostraron tener una actividad especifica significativamente mayor ($\bar{X}= 1796 \pm 947$ unidades) que los tejidos normales ($\bar{X}= 486 \pm 152$ unidades) ($p < .05$), sin embargo los tejidos con mastopatía no mostraron diferencia estadística resaltando su gran variabilidad ($\bar{X}=1178 \pm 1419$). Los fibroadenomas pericanaliculares manifestaron una mayor actividad que los intracanaliculares.

F.5 Mediciones morfométricas de los tejidos estudiados:

Con el objetivo de encontrar alguna relación con la celularidad del tejido , se procesaron histológicamente los

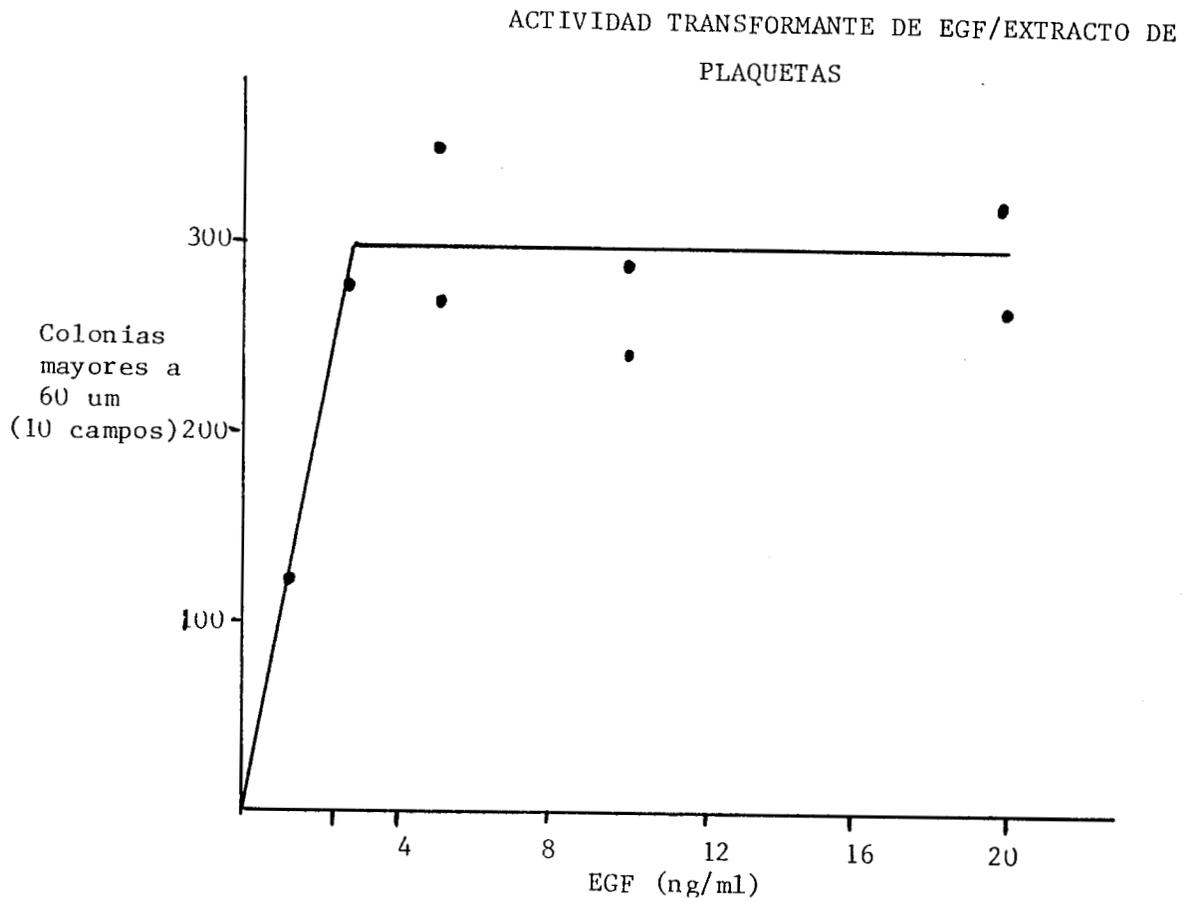


Fig 7.- Determinacion del efecto de EGF sobre la actividad transformante en ensayos de agar blando variando la cantidad de EGF y fijando la cantidad de extracto plaquetario (1 μ g/ml).

 TABLA 7

ACTIVIDAD TIPO EGF EN DIVERSOS TEJIDOS MAMARIOS

TEJIDO	TIPO	ACTIVIDAD ESPECIFICA TIPO EGF
A -	FA PC	97
B -	FA PC	160
C -	FA IC	131
D -	FA IC	55
E -	FA IC	29
F -	FA IC	23
G -	FA IC	73
H -	FA IC	108
I -	FA IC	225
J -	FA IC	42
K -	FA IC	194
L -	FA IC	nd
M -	MF AE	28
N -	MF AE	176
O -	MF AE	84
P -	MF TC	108
Q -	MF QU	nd
R -	NORM	70
S -	NORM	165
T -	NORM	nd
U -	NORM	nd

(FA=Fibroadenoma, IC=intracanalicular, PC=pericanalicular, MF=mastopatía fibroquistica, AE=Adenosis Esclerosante, QU=enfermedad quística,TC=tubos ciegos NORM= tejido normal ,nd=no detectable, EGF= factor de crecimiento epidermico)

La actividad tipo EGF(ng/g) = AT(sin EGF) x 3.75 x peso del extracto mg / (AT(con EGF) x peso tumor g)

3.75 ng/ml= cantidad de EGF que se uso para revelar la actividad maxima del extracto.

tejidos y fueron estimadas las cantidades de células mesenquimatosas (medidas como el número de núcleos en estroma por imagen capturada 0.2 mm^2) y de células epiteliales (medida como el % de area epitelial). Se procesaron cerca de 1000 imagenes para esta estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8 . En general, la celularidad del estroma, es mayor en los fibroadenomas ($\bar{X}=328\pm 72$), que en el tejido normal ($\bar{X}=83\pm 24$) ($p < .05$). Los tejidos de mastopatía mostraron una gran variabilidad ($\bar{X}=202\pm 129$), sin tener diferencia estadística con los otros dos grupos. La celularidad epitelial es mayor en los fibroadenomas ($\bar{X}=4.7\pm 1.4$) y en los tejidos con mastopatía ($\bar{X}=6.1\pm 3.1$) que en los tejidos normales ($\bar{X}=1.32\pm 0.7$) ($p < .05$). No hay diferencia estadística entre fibroadenomas y mastopatías.

F.6 Correlación entre la actividad transformante y la celularidad tisular.-

La relación entre las medidas morfométricas y la actividad transformante se resumen en la tabla 8, y figuras 9 a 12 . Con el objetivo de definir las relaciones e interacciones que guardan el tejido mesenquimatoso y epitelial con la actividad transformante se contemplan a todos los tejidos estudiados como un conjunto de tejidos mamarios cuya diferencia es su contenido de células epiteliales y mesenquimatosas , independientemente de su clasificación histopatológica. En la fig 8. se grafican las actividades

transformantes en relación al contenido de células de estroma ($r=.72$ $p<.05$) y en la fig 9 las actividades transformantes en relación al contenido de epitelio ($r=.63$ $p<.05$). Estas correlaciones pueden atribuirse mas que todo al principio beta ya que la actividad de tipo alfa no mostró correlación alguna con ninguno de los parametros histológicos o con la misma actividad beta fig (10 ,11 ,12).

F.7 Correlación con otros parametros

No fue encontrada ninguna relación entre la actividad transformante y alguna característica específica de los pacientes o su historia clínica.

La determinación de ácido glucurónico para estimar contenido de glicosaminoglicanos no mostró correlación alguna con la actividad transformante. En la fig 13 se muestran la relación de la cantidad de ácido glucurónico en relación a la actividad transformante. A pesar de que TGF beta esta' relacionado con la síntesis de proteoglicanos (34), en este estudio no muestra relación probablemente por un recambio relativamente lento de los glicosaminoglicanos.

 TABLA 8

RELACION DE RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD TRANSFORMANTE,
 CELULARIDAD EPITELIAL Y MESENQUIMATOSA OBTENIDA DE LOS
 DIFERENTES TEJIDOS MAMARIOS

TEJIDO TIPO	ACTIVIDAD TRANSFORMANTE (unidades)	CELULARIDAD ESTROMA (nucleos/ campo .2mm)	CELULARIDAD EPITELIAL (% area)
A -	FA FC	3342	5.60
B -	FA FC	3163	6.38
C -	FA IC	2916	4.99
D -	FA IC	2456	4.60
E -	FA IC	1882	3.75
F -	FA IC	1553	5.48
G -	FA IC	1467	2.84
H -	FA IC	1200	6.05
I -	FA IC	1083	6.37
J -	FA IC	1031	3.19
K -	FA IC	854	5.19
L -	FA IC	608	2.50
M -	MF AE	3628	11.50
N -	MF AE	1191	3.76
O -	MF AE	525	5.56
P -	MF TC	305	5.81
Q -	MF QU	243	3.82
R -	NORM	649	2.19
S -	NORM	498	1.53
T -	NORM	515	0.87
U -	NORM	281	0.70

(FA=Fibroadenoma, IC=intracanalicular, FC=pericanalicular,
 MF=mastopatía fibroquística, AE=Adenosis Esclerosante, QU=
 enfermedad quística, TC=tubos ciegos NORM= tejido normal
 ,nd=no detectable, EGF= factor de crecimiento epidérmico)

Fig 8.- Relacion de la actividad transformante
con la celularidad del estroma en tejidos mamarios

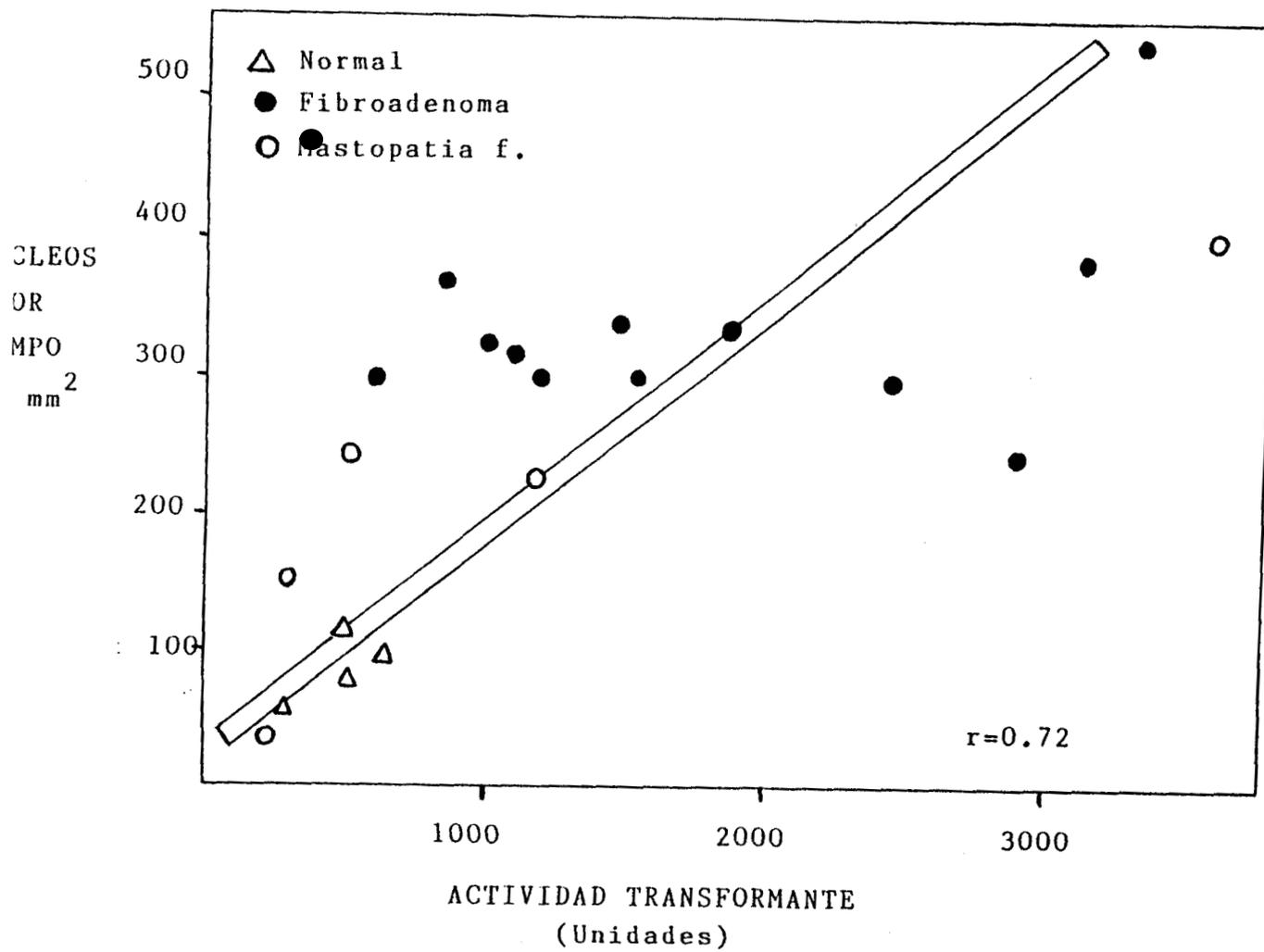
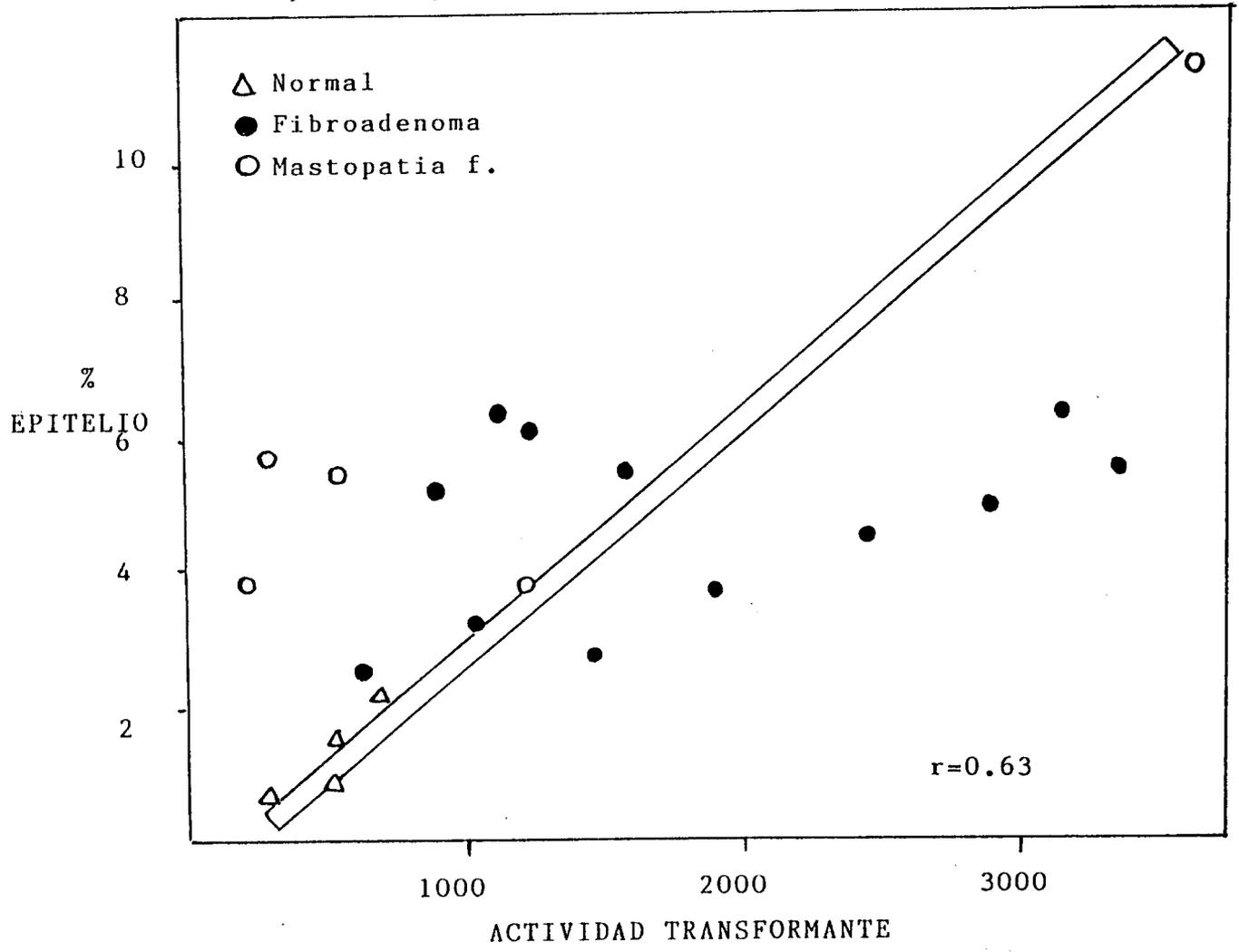


Fig. 9 Relacion de la actividad transformante con el porcentaje de epitelio en diversos tejidos mamarios



09-7092

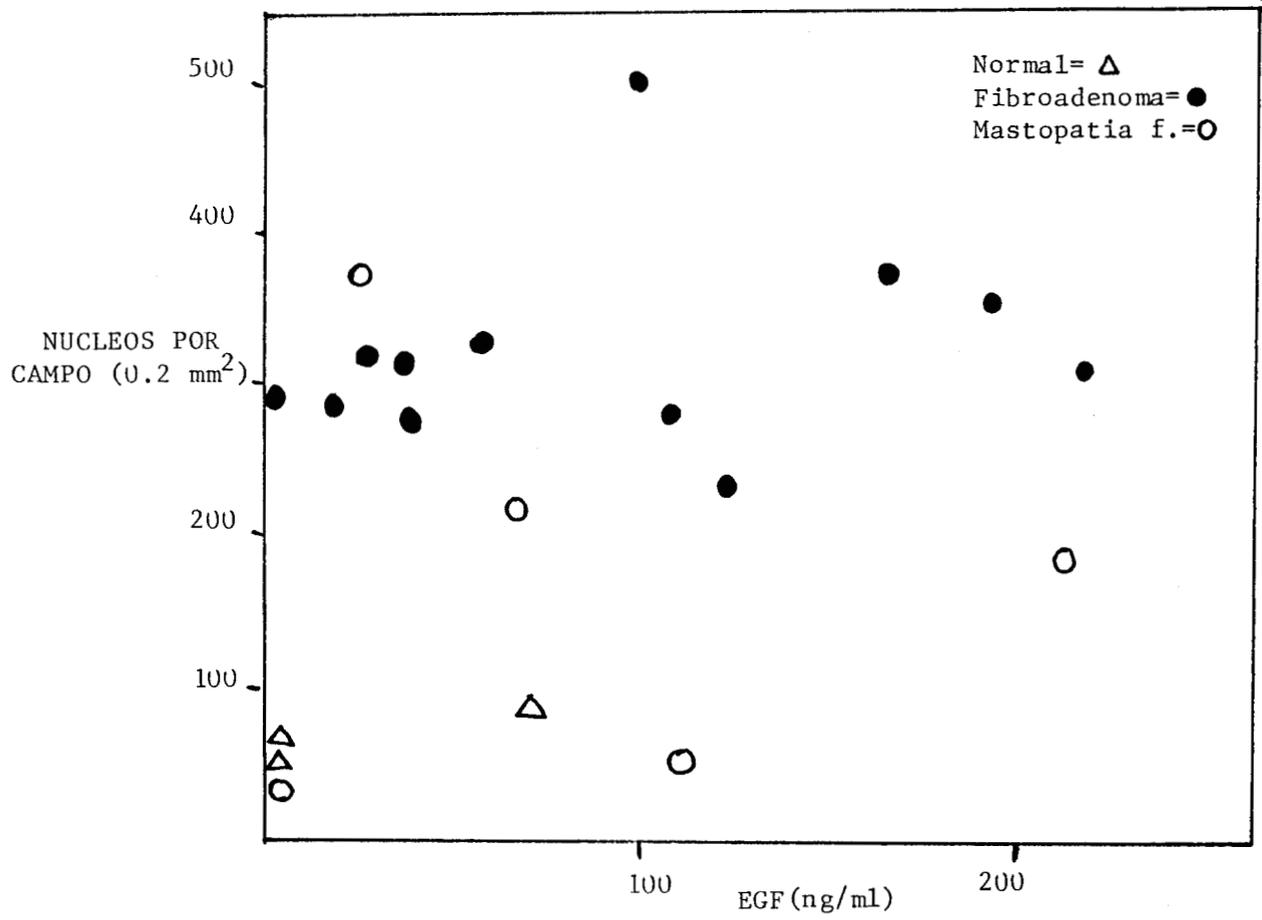


Fig 10.- RELACION DE LA CELULARIDAD DEL ESTROMA CON LA ACTIVIDAD TIPO EGF

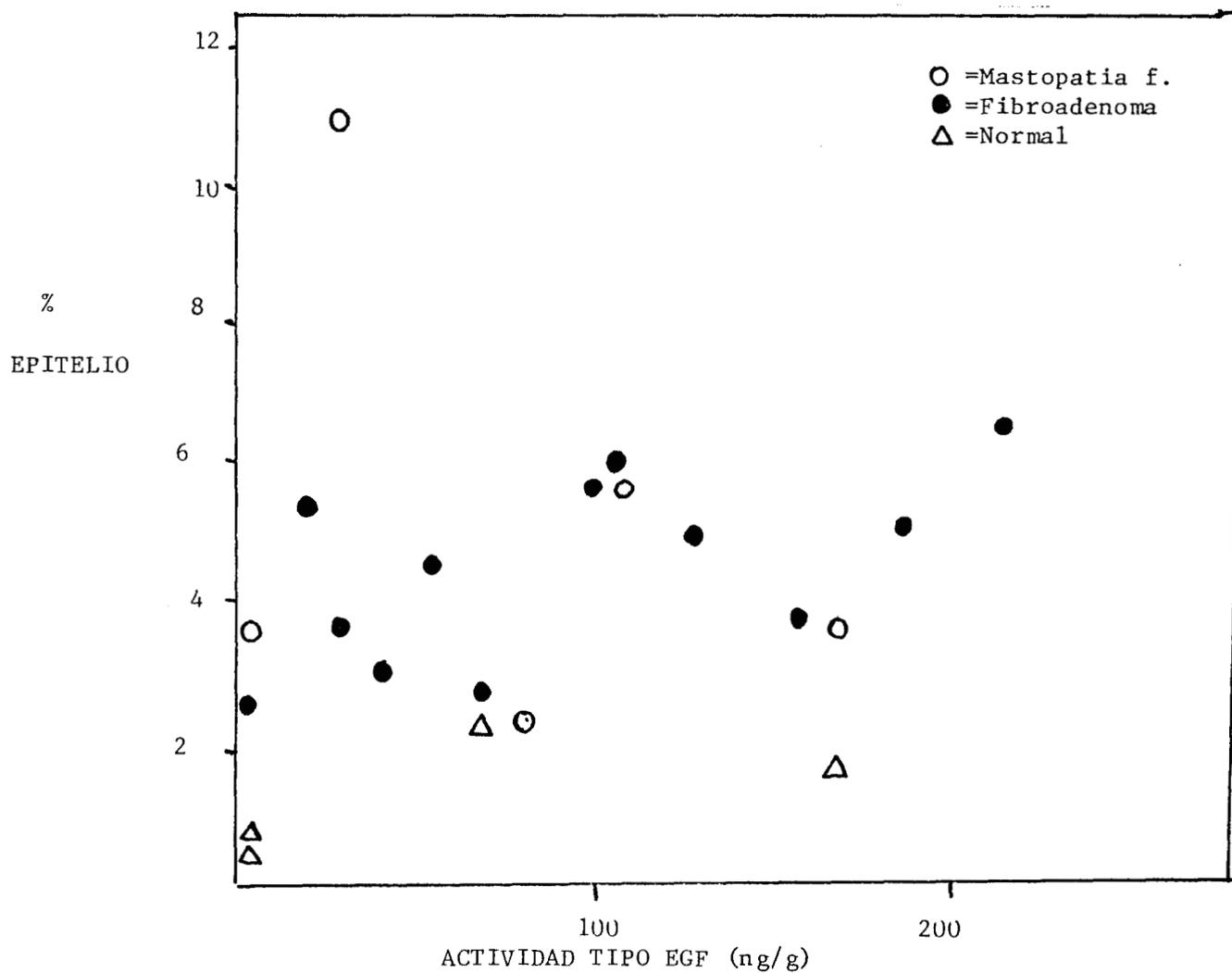


Fig 11.- RELACION DE LA CELULARIDAD EPITELIAL CON LA ACTIVIDAD TIPO EGF

Fig 12.- RELACION DE LAS ACTIVIDADES TIPO ALFA Y BETA

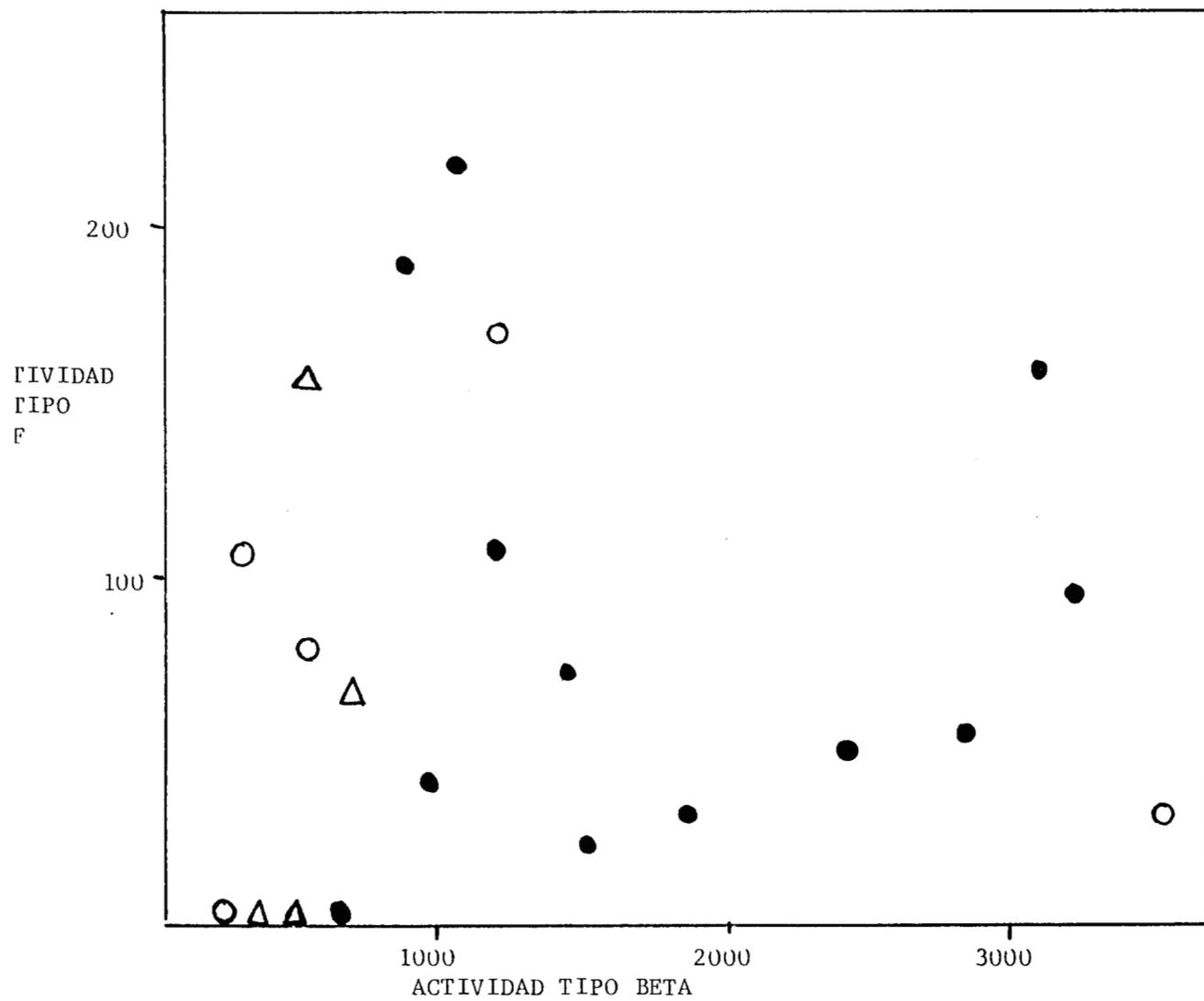
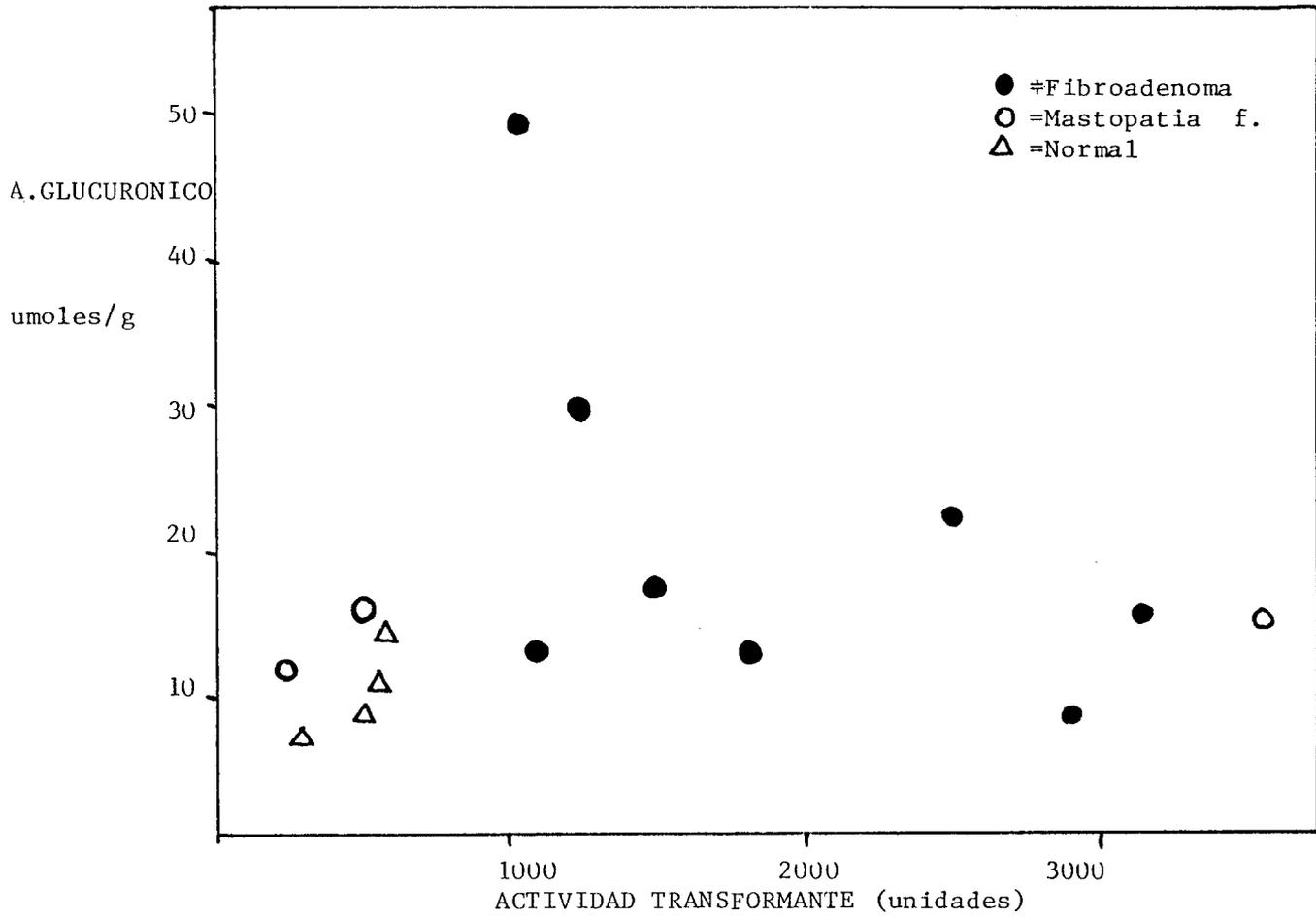


Fig 13.- RELACION DE LA CONCENTRACION DE A.GLUCURONICO CON LA
ACTIVIDAD TRANSFORMANTE DE TEJIDOS MAMARIOS



G.DISCUSION

Los factores de transformación han sido estudiados en varios sistemas y modelos biológicos. Existe una clara evidencia de que son peptidos que participan en la modulación del crecimiento celular. Algunos modelos de estudio in vitro han mostrado que líneas celulares mamarias transformadas producen y responden a estos factores y que a su vez estos están modulados por los niveles de éstrogenos. Tal es el caso de la línea celular de cáncer mamario humano mas estudiada, la línea MCF-7 (con receptores para estrogenos y progesterona), que responde a éstrogenos aumentando su producción y secreción de TGF alfa, que a su vez media en forma autócrina los efectos proliferativos de estradiol (77,65). Asi mismo se ha visto que los estrógenos disminuyen la secreción de TGF beta en éstas células impidiendo su acción inhibitoria(66). Sin embargo la acción de los factores parece ser mas compleja en otras líneas celulares y contrasta con los mecanismos de regulación en células mamarias normales(46). Las células epiteliales mamarias normales no responden a estradiol cuando son cultivadas solas, solo lo hacen en presencia de fibroblastos (43). De aqui que haya sido propuesto un mecanismo de acción indirecta de los estrógenos, siendo candidatos importantes los factores de crecimiento como mediadores de la respuesta celular(46). Su accion in vivo no

se conoce bien pero supone ser compleja por la capacidad de generar respuestas diferentes dependiendo del contexto de factores que lo acompañen(27). Hemos estudiado una serie de tejidos mamarios humanos con diversos grados de hiperplasia benigna con el objetivo de hallar datos que orienten nuestro conocimiento acerca de la acción de los factores de transformación in vivo. Para esto fueron estudiados un grupo de fibroadenomas mamarios, mastopatías fibroquísticas y tejidos normales. Se obtuvieron extractos etanol-ácido de estos tejidos para probar su actividad transformante. El extracto etanol ácido puede contener una gran cantidad de factores de crecimiento, como TGF beta, alfa, EGF, PDGF, IGF y FGF. Todos estos factores influyen sobre el estudio en agar blando, pero en las condiciones usadas, el ensayo es bastante específico para TGF beta y alfa (o factores tipo EGF): PDGF, a pesar de ser necesario para la acción transformante, es proporcionado al ensayo con el suero fetal de bovino y al agregar más PDGF no modifica el efecto de los factores de transformación, por lo que en estas condiciones no afecta al ensayo (74). Sucede lo mismo con IGF (75) mientras que FGF es desnaturalizado por el pH (76). Actividad tipo TGF alfa y TGF beta son pues, las que modifican el ensayo en estas condiciones y ambas pueden ser diferenciadas, como se describe más adelante.

La mayor parte de los tejidos muestran actividad transformante sin EGF, lo cual hace pensar de que existe

algun péptido tipo EGF, aunque en concentraciones bajas , ya que ninguno de los tejidos tiene potenciada su actividad transformante completamente antes de agregar EGF en el ensayo. Los niveles bajos de factores tipo EGF han sido encontrados en tejidos normales en comparación con tejidos de tumores malignos (15). Su acción supone ser muy importante en la glándula mamaria ya que las células epiteliales contienen receptores para este tipo de factores y aumentan su proliferación en presencia de EGF o TGF alfa (64). Esto resalta aún más en tumores malignos donde se supone una estimulación de tipo autócrino. En el presente estudio no se encontró alguna relación de este grupo de factores con el tipo de tejido o los niveles de celularidad mas allá de que no se les detecta en tejidos con niveles bajos de celularidad. Desde este punto de vista tal vez su presencia sea necesaria mas no suficiente para explicar la variabilidad en la celularidad. Existen algunos estudios que concuerdan en que estos factores no son suficientes para desencadenar una respuesta proliferativa por si mismos (78). La naturaleza de los factores de tipo EGF en tejidos normales (y probablemente en hiperplásicos benignos) no se conoce bien, ya que algunos estudios muestran que podría ser TGF alfa (64), mientras que otros no han podido ratificarlo (46).

La actividad transformante potenciada con EGF es atribuible a TGF beta principalmente (58). Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa de los

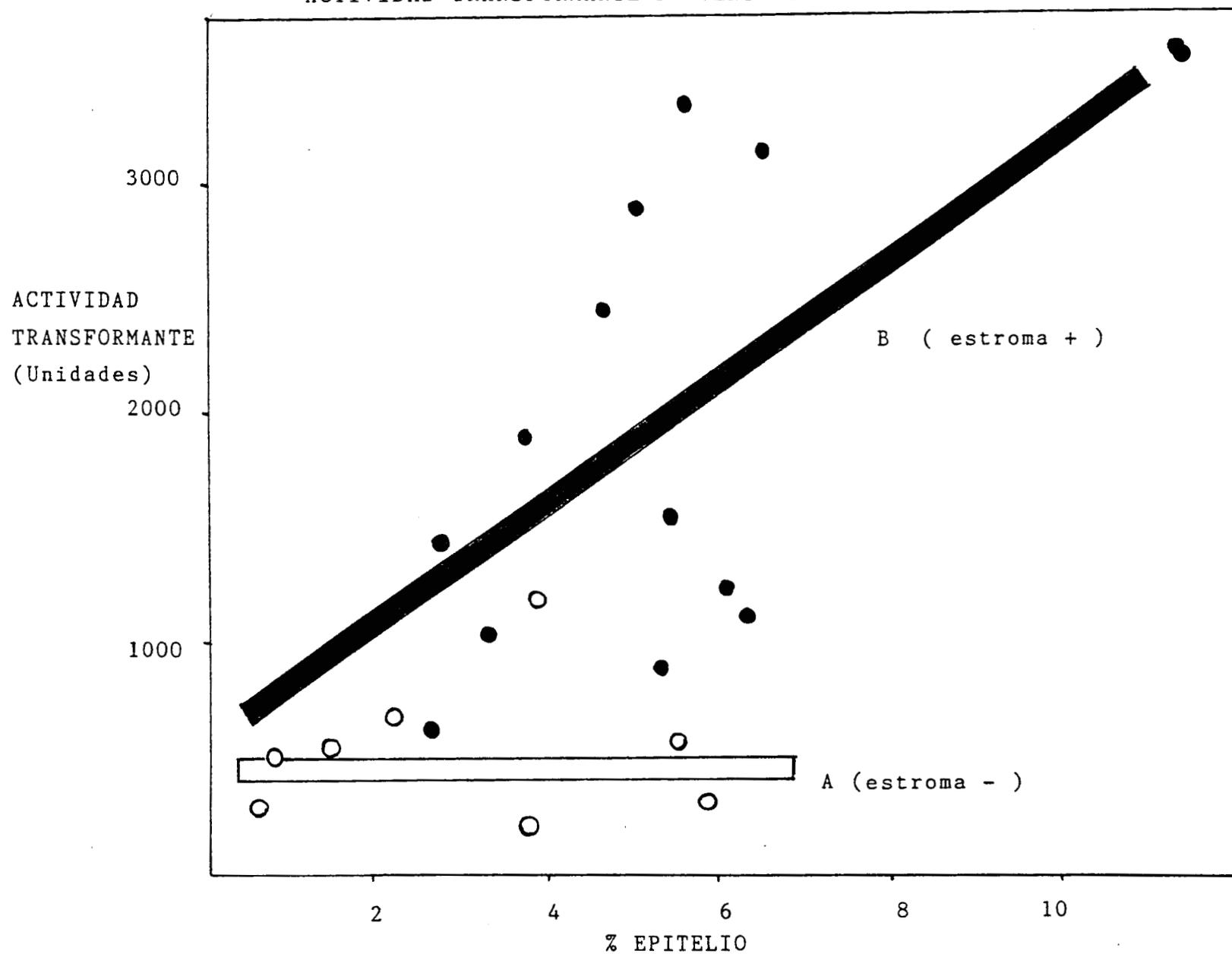
niveles de actividad transformante, celularidad mesenquimatosa y celularidad epitelial entre 3 y 6 veces mayor en los tejidos con fibroadenoma que en los tejidos normales en promedio. Las mastopatias fibroquísticas, al ser un grupo mas heterogeneo de cuadros histopatológicos mostraron tambien una mayor variabilidad, teniendo toda la amplitud de valores de actividad transformante. Las adenosis esclerosantes tuvieron una mayor actividad que los tejidos donde predominaron las formas quísticas.

Ya que la muestra de tejidos estudiada, independientemente de su patologia, corresponde a una serie hiperplasias mesenquimatosas y epiteliales de diversos grados, todas bien diferenciadas, se estudió la posibilidad de que las diferencias en las actividades transformantes pudieran explicarse, al menos en parte, por la celularidad. La correlación de la celularidad mesenquimatosa con la actividad transformante es buena y estadísticamente significativa pudiendose afirmar que los factores con actividad transformante participan de alguna forma en la estructuración del estroma. Aunque con menor fortaleza, existe tambien una correlación significativa con la cantidad de epitelio sugiriendo de igual forma una participación de los factores en el proceso de desarrollo epitelial. La naturaleza de esta participación, por el momento, queda por determinar.

Ha sido sugerido de que la células epiteliales interaccionan con los fibroblastos para desencadenar una

respuesta proliferativa o en la producción de receptores de progesterona en presencia de estrógenos(44). En este estudio se buscaron datos que apoyaran la interacción de los dos tipos celulares en relación a la actividad transformante. La interacción del epitelio y el estroma en relación a la actividad transformante se describe en la fig.14 . La muestra fue separada en dos conjuntos según la abundancia de células del estroma: aquellos tejidos con poca celularidad en estroma (por debajo del promedio) (estroma -) y aquellos con gran cantidad de células en estroma (por encima del promedio)(estroma +).Observamos que la línea A que define al estroma(-) se encuentra con menor actividad transformante que la línea superior de estroma(+), independientemente de si hay poco o mucho epitelio, lo cual significa que pesa mas el componente mesenquimatoso para generar la actividad transformante. Sin embargo el epitelio parece modular la actividad transformante relacionada con el estroma: cuando hay poco estroma no importa que exista una gran cantidad de epitelio, no se modifica la poca actividad, sin embargo cuando existe estroma alto (+), el ir aumentado el epitelio tiene como consecuencia la elevación concomitante de la actividad, definiendose una interacción positiva de ambos ($p < .05$) . En conclusión parece ser que la actividad transformante se presenta en la medida de que exista un mínimo de estroma sin que tenga que existir una gran cantidad de epitelio, pero que se incrementará por el aumento de ambos elementos epitelial y mesenquimatoso, y que

Fig.14 INTERACCION DEL EPITELIO Y EL ESTROMA EN RELACION A LA ACTIVIDAD TRANSFORMANTE PRESENTE EN DISTINTOS TEJIDOS MAMARIOS



el elemento epitelial en ausencia de células del mesénquima tiene poco efecto sobre la generación de actividad transformante.

Aunque la naturaleza de estas interacciones no se puede determinar con certeza, la presencia de actividad transformante (atribuible a TGF beta) en relación a la celularidad mesenquimatosa es congruente con los efectos estimuladores sobre fibroblastos hallados en otros estudios. Estos efectos probablemente sean indirectos (31), por ejemplo a través de la activación del proto-oncogen c-sis por TGF beta, cuyo producto es PDGF que es secretado para generar una respuesta proliferativa autócrina, exclusivamente sobre fibroblastos ya que el epitelio carece de este tipo de receptores(64) y de la secreción de fibronectina también estimulada por TGF beta, como componente de la matriz extracelular que favorece la proliferación de los fibroblastos (33).

Sin embargo, sería difícil explicar en el presente estudio la correlación de la actividad transformante con la cantidad de epitelio, tejido sobre el cual el factor ha demostrado ser francamente inhibidor tanto in vitro en células mamarias humanas (22) como in vivo en glándula mamaria de ratón (79). La explicación podría ser muy compleja, pero en vista de los datos obtenidos en este estudio y los hallazgos de otros grupos podrían sugerirse algunos mecanismos.

¿Como se podría explicar que el epitelio quedara exento de ser inhibido por TGF beta?¿ Como podría explicarse no solo su exención sino su correlación con la actividad transformante?.

TGF beta es un factor que parece secretarse mayormente como un precursor inactivo que necesita ser modificado para adquirir su funcion completa (20) dando pie al argumento de que la activación de TGF beta por parte de las células será uno de los principales mecanismos para controlar su acción (22) tal vez por proteasas como la catepsina D o plasmina, o por cambios de pH en el microambiente (22) .Es importante mencionar tambien de que no se acumula en la célula: una vez fabricado tiende a ser excretado y depositarse en la matriz extracelular(36). Se podrían explicar los hallazgos de este estudio en base a que el epitelio escape a la acción del factor simplemente porque no sea capaz de activarlo.

Aun teniendo capacidad de activación hay cierta evidencia (80) de que la presencia de una gran cantidad de fibroblastos podría secuestrar y degradar rapidamente el TGF beta activo reservando el efecto de este factor preferentemente para si mismos .En ese trabajo se demuestra que células epiltiales cocultivadas con fibroblastos necesitan una dosis 100 veces mayor de TGF beta para ser inhibidas y que la utilización y degradación del factor por parte de los fibroblastos es muy rápida.

Otra explicación sería la secreción de otros factores que contrarrestaran la acción de TGF beta. Esta tesis tendría apoyo en el hecho de que los fibroblastos y epitelio secretan IGF-I (81,82) que es estimulante para epitelio (46) y que está sometido a control estrogénico (64). De hecho existen estudios que muestran que IGF-I se expresa más en fibroblastos estimulados con PDGF (81) (a su vez estimulado por TGF beta(31)) y estudios realizados en el modelo de herida de piel, donde al administrar conjuntamente IGF-I y TGF beta se logra contrarrestar el efecto inhibitorio de TGF beta sobre epitelio sin afectar los efectos estimulatorios de este último sobre mesenquima(83). Esto explicaría no solo porqué el epitelio queda exento de inhibición sino también como queda estimulado indirectamente por TGF beta, como lo sugiere el presente estudio al hallar una correlación con pendiente positiva.

Una forma indirecta de estimulación sería a través de los productos que se forman en fibroblastos por la acción de TGF beta, en particular la colágena. Algunos estudios muestran esta tesis (44) donde se argumenta que al menos parte de la cooperación entre fibroblastos y epitelio se basa en la secreción de colágena por fibroblastos, que actúa estimulando a las células epiteliales. TGF beta es un colagenogénico muy potente (44,38).

Alternativamente, una deficiencia epitelial en la vía de respuesta a TGF beta podría explicar también el escape a

la inhibición, por ejemplo, receptores defectuosos. En la tabla 10 se dan algunos ejemplos. Al menos en el caso del fibroadenoma se cuenta con cierta evidencia de que puede tener un defecto en la fabricación de prostaglandinas y en la vía de respuesta a estas hormonas (57). Es interesante ver que TGF beta estimula la fabricación de prostaglandinas (84) y que estas a su vez inhiben la estimulación de colágena por el mismo TGF beta, sugiriendo la participación de ambos en un sistema de retroalimentación negativa, que tal vez en el caso del fibroadenoma, no funciona adecuadamente. Las prostaglandinas (al menos PGE2) resultan inhibitorias para el crecimiento epitelial (85).

La interacción positiva hallada entre epitelio y estroma plantea también que el epitelio debe mandar algún mensaje a estroma para una mayor producción de actividad transformante. Se ha demostrado que los estrógenos son capaces de estimular no solo a las células epiteliales sino a los fibroblastos que lo rodean probablemente a través de mecanismo indirectos ya que los fibroblastos no son estimulados por estrógenos en cultivos homotípicos(44). Aunque no se ha hallado el principio activo para esta interacción sería razonable pensar en algún factor que sea estimulado por estrógenos, como lo sería TGF alfa (65) o IGF-1 (64). TGF alfa así como el receptor de EGF se encuentran en tejidos mamarios normales y patológicos y responden proliferativamente en varios estudios(64). Algunos estudios muestran incluso una correlación entre los niveles

de receptores de estrógenos y el nivel de expresión de TGF alfa (86). En otros, la estimulación por los factores que actúan a través de este receptor, es insuficiente (78). En este mismo tipo de interacción podría hallarse la razón por la cual TGF beta queda elevada en estos tejidos al aumentar la cantidad de epitelio. Es decir, el epitelio envía algún mensaje a fibroblastos para estimular su proliferación y el aumento de la actividad transformante o alternativamente, ya que se ha sugerido que los fibroblastos pueden secretar constitucionalmente TGF beta(22), tal vez éste se encuentra elevado como manifestación de un aumento de fibroblastos y se va acumulando en el medio. Así en condiciones normales, alcanzando un cierto nivel de fibroblastos se llegaría a un nivel crítico de TGF beta que conduciría a una inhibición epitelial que a su vez suspendería la estimulación del fibroblasto. En condiciones patológicas este nivel crítico no se alcanzaría y se produciría una hiperplasia de ambos elementos epitelial y estromal acompañados del aumento de la actividad transformante(fig.15).

Cualesquiera que sean los mecanismos de acción, este estudio apoya la participación de los factores con actividad transformante en la proliferación celular epitelial y principalmente mesenquimatosa en los diversos tejidos mamarios estudiados.

Es necesario realizar mas estudios al respecto y que contemplen el estudio simultaneo de otros factores de crecimiento , asi como estudios in vitro de células hiperplásicas epiteliales y mesenquimatosas en cultivos únicos y en cocultivos para determinar los factores y condiciones necesarios para la generación de estas entidades fisiopatológicas.

TABLA 9

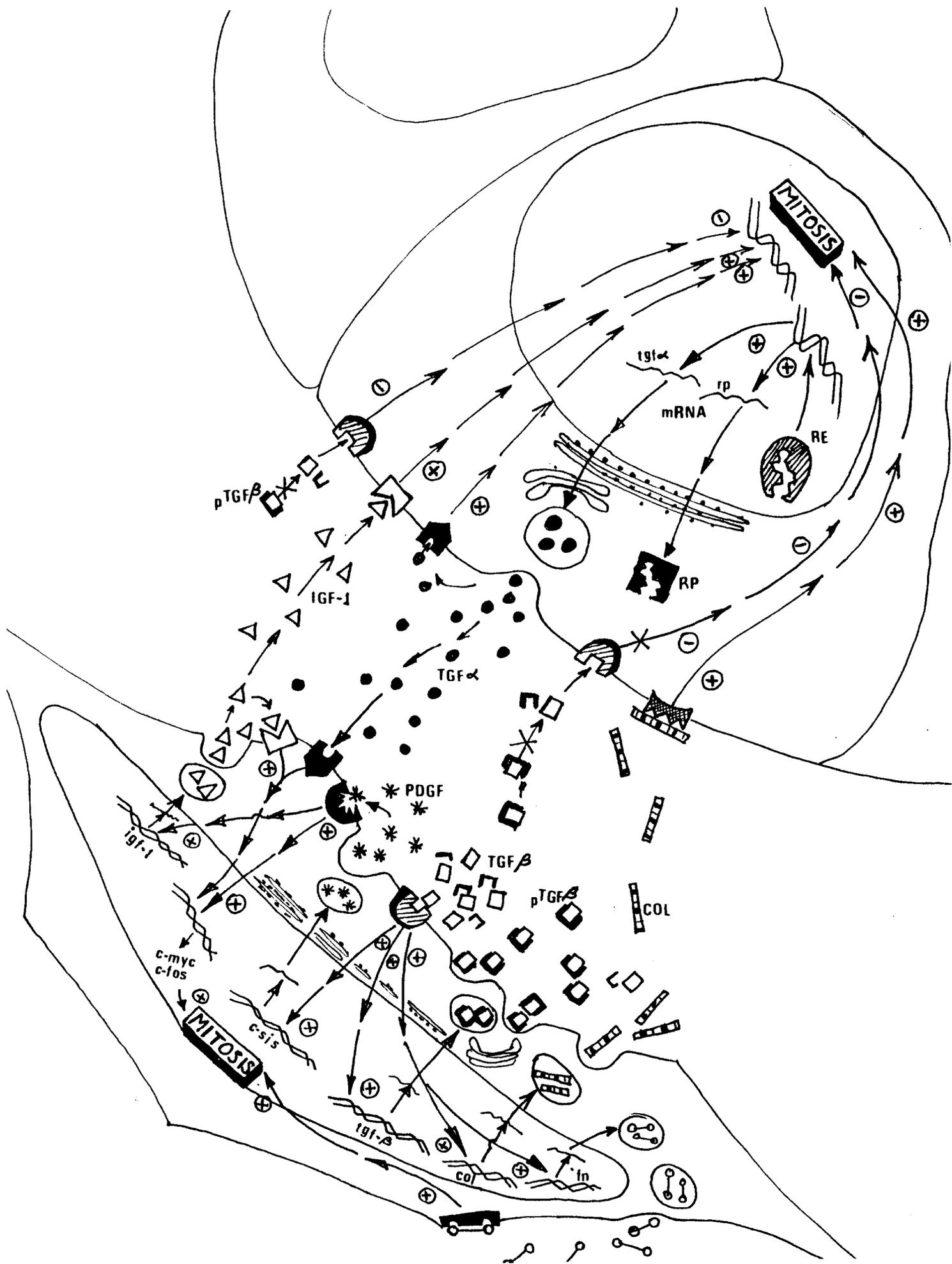
CELULAS CARCINOMATOSAS CON LESIONES EN EL CIRCUITO AUTCRINO DE TGF BETA(70)

TIPO CELULAR	LESION
A2380 Carcinoma de Pancreas	No secreta TGF beta
A549 Adenocarcinoma pulmonar	Inhabilidad de activar la forma latente
SSC-25 Carcinoma epidermoide de piel	Ausencia de receptores de TGF beta
CaLu 1 Carcinoma epidermoide pulmonar	Defecto post-receptor
HuT292 Carcinoma pulmonar	Defecto post-receptor
SW900 Carcinoma pulmonar	Defecto post-receptor

Fig.15 (Página siguiente).- Esquema de interacciones epitelio-fibroblastos. A través de un estímulo inicial con estrógenos a través de su receptor (RE) , el epitelio produce receptores de progesterona (RP) y alguna substancia (TGF alfa ?) que secretada estimula el crecimiento del fibroblasto el cual a su vez produce TGF beta, inicialmente como precursor (p TGF), desencadenando a su vez la producción de PDGF , IGF-1 , colagena (COL) y fibronectina (FN), que estimulan la proliferación del epitelio (COL e IGF-1) y de los fibroblastos (PDGF, IGF-1 y FN). En casos de hiperplasia el TGF beta podría perder su efecto inhibitorio sobre epitelio al ser activado solo por fibroblastos o siendo removido del medio rapidamente por ellos mismos.

= efecto inhibitorio

= efecto estimulatorio



H. REFERENCIAS

- 1.-HELDIN C.H., WESTERMARK B.,
Growth factors as transforming proteins.
Eur.J.Biochem.184:487-496,1989

- 2.-RUDDON R.W.,
Cancer Biology.
Ed.Oxford University Press, 1987

- 3.-DE LARCO J.E., TODARO G.J.,
Growth Factors from Murine Sarcoma Virus Transformed Cells.
Proc.Natl.Acad.Sci(USA) 75:4000-4005, 1978

- 4.-TODARO G.J., FRYLINS C, DE LARCO J.E.,
Transforming growth factors produced by certain human tumor cells:
Polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors.
Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 77:5258-5262,1980

- 5.-NICKELL K.A., HALPER J., MOSES H.L.,
Transforming Growth Factors in Solid Human Malignant Neoplasms.
Cancer Res. 43:1966-1971, 1983

- 6.-MOSES H.L., BRANUM E.L., PROPER J.A., ROBINSON R.A.,
Transforming Growth Factor production by Chemically Transformed Cells
Cancer Res. 41:2842-2848,1981

- 7.-MARQUARDT J., TODARO G.J.,
Human Transforming Growth Factor, Production by a Melanoma Cell Line,
Purification and Initial Characterization.
J.Biol.Chem.257:5220-5225,1982

- 8.-SPORN M.B.,ROBERTS A.B.,
Autocrine Growth Factors and Cancer.
Nature 313:745-747,1985

- 9.-ANZANO M.A., ROBERTS A.B., SMITH J.M., SPORN M.B.,DE LARCO J.E.,
Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells
is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors.
Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 80:6264-6268,1983

10. ROBERTS A.B., ANZANO M.A., LAMB L.C., SMITH J.M., SPORN M.B.,
New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth
factor: Isolation from non-neoplastic tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 78:5339-5343, 1981
11. DERYINK R.,
Transforming Growth Factor Alfa: Structure and Biological Activities.
J. Cell. Biochem. 32:293-304, 1986
12. DERYINK R., ROBERTS A.B., WINKLER M.E., CHEN E.Y., GOEDDEL D.V.,
Human Transforming Growth Factor Alfa: Precursor Structure and Expression
in E. coli
Cell 38:287-297, 1984
13. ROBERTS A.B., ANZANO M.A., CHESTER A. MEYERS, WIDERMAN J., BLACHER R., PAN Y.C
, STEIN S., LEHRMAN R., SMITH J.M., LAMB L.C., SPORN M.B.,
Purification and Properties of a Type beta Transforming Growth Factor from
Bovine Kidney
Biochem. 22:5692-5698, 1983
14. HAMBURGER A.W., WHITE C.P., DUNN F.E.,
Secretion of transforming growth factors by primary human tumour cells.
Br. J. Cancer 51:9-14, 1985
15. DERYINK R., GOEDDEL D.V., ULRICH A., GUTTERMAN J.U., WILLIAMS R.D.,
BRINGHAM T.S., BERGER W.H.,
Synthesis of mRNA for Transforming Growth Factor Alfa and Beta and the
EGF Receptors by Human Tumors.
Cancer Res. 47:707-712, 1987
16. FROLIK C.A., DART L.L., CHESTER A.M., SMITH D.M., SPORN M.B.,
Purification and initial characterization of a type beta transforming
growth factor from human placenta.
Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 80:3676-3680, 1983
17. ASSOIAN R.L., KOMORIYA A.K. MEYERS C.A., MILLER D.M., SPORN M.B.,
Transforming Growth Factor-beta in human Platelets.
J. Biol. Chem. 258:7155-7160, 1983

18. SPORN M.B., ROBERTS A.B., WAKEFIELD L.M., CROMBRUGGHE B.,
Some Recent Advancer in the Chemistry and Biology of Transforming Growth
Factor-Beta.
J.Cell.Biol. 105:1039-1045,1987
19. PIRCHER R., LAWRENCE D.A., JULLIEN P.,
Latent beta-Transforming Growth Factor in Nontransformed an Kirsten Sarcoma
virus-transformed Normal Rat Kidney Cells, Clone 49F
Cancer Res 44:5538-5543,1984
20. WAKEFIELD L.M., SMITH D.M., FLANDERS K.C., SPORN M.B.,
Latent Transforming Growth Factor-beta form Human Platelets.
J.Biol.Chem.263:7646-7654,1988
21. DERYINK R., JARRET J.A., ELLSON C.Y. DENNIS E.H., BELL J.R., ASSOIAN R.K.,
ROBERTS A.B., SPORN M.B., GOEDEL D.V.,
Human transforming fowth factor -beta complementary DNA sequence and
expression in normal and transformed cells.
Nature 316:701-704,1985
22. WAKEFIELD L., THOPSON N., O'CONNOR M., SPORN M.B.,
Transforming Growth Factor-beta: An Endogenous Inhibitor of Cell Growth.
23. MASSAGUE J., LIKE B.,
Cellular Receptor for Type beta Transforming Growth Factor
J.Biol.Chem., 260:2636-2645
24. CHEIFETZ S., ANDRES J.L., MASSAGUE J.,
The TGF beta Receptor Type III is a Membrane Proteoglycan
J.Biol.Chem., 263:16984-16991,1988
25. CHEIFETZ S., WHEATERBEE J.A., TSANG M.L., ANDERSON J.K., MOLE J.E., LUCAS R.L.,
MASSAGUE J.,
The TGF beta System, a Complex Pattern of Cross Reactive Ligands and
Receptors.
Cell 48:409-415, 1987

26. MASSAGUE J.,
The TGF-beta Family of Growth and Differentiation Factors.
Cell, 49:437-438, 1987
27. SPORN M.B., ROBERTS A.B.,
Peptide growth factors are multifunctional.
Nature 332:217-218, 1988.
28. ROBERTS A.B., ANZANO M.A., WAKEFIELD L.M., ROCHE N.S., STERN D.F., SPORN M.B.,
Type beta-transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular
growth.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:119-123, 1985
29. ASSOIAN R.K.,
Biphasic Effects of Type beta Transforming Growth Factor on Epidermal
Growth Factor Receptors in NRK Fibroblasts
J. Biol. Chem. 260:9613-9617, 1985
30. MASSAGUE J.,
TGF beta Modulates the High affinity Receptors for Epidermal Growth Factor
and TGF alfa.
J. Cell. Biol. 100:1508-1514, 1985
31. LEDF E.B., PROPER J.A., GOUSTIN A.S., SHIPLEY G.D., DICORLETO P.E.,
MOSES H.L.,
Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet derived growth
factor by transforming growth factor beta: A proposed model for indirect
mitogenesis involving autocrine activity.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 83:2453-2457, 1986
32. SPORN M.B., ROBERTS A.B., WAKEFIELD L.M., ASSOIAN R.K.,
Transforming Growth Factor-beta: Biological Function and Chemical Structure.
Science 233:532-534, 1986
33. IGNOTZ R.A., MASSAGUE J.,
Transforming Growth Factor beta Stimulates the Expression of Fibronectin
and Collagen in Their Incorporation into the Extracellular Matrix.
J. Biol. Chem. 261:4337-4345, 1986

34. BASSOLS A., MASSAGUE J.,
Transforming Growth Factor Beta Regulates the Expression and Structure of
Extracellular Matrix Chondroitin/Dermatan Sulfate Proteoglycans.
J. Biol. Chem. 263:3039-3045, 1988
35. KESKI-OJA J., RAGHOW R., SAWDEY M., LOSTUKOFF D.J., POTLEWAITE A.E., KANG A.H.,
MOSES H.L.,
Regulation of mRNA as for Type-1 Plasminogen Activator Inhibitor,
Fibronectin and Type I Procollagen by Transforming Growth Factor-Beta
J. Biol. Chem. 263:3111-3115, 1988
36. ROBERTS A.B., THOMPSON N.L., HEINE U., FLANDERS C., SPORN M.B.,
Transforming Growth Factor-Beta: Possible Roles in Carcinogenesis.
Br. J. Cancer 57:594-600, 1988
37. MIYAZONO K., HELLMAN U., WERNSTEDT C., HELDIN C.H.,
Latent High Molecular Weight Complex of Transforming Growth Factor beta-1
J. Biol. Chem. 263:6407-6415, 1988
38. ROBERTS A.B., SPORN M.B., ASSOIAN R.K., SMITH J.M., ROCHE N.S., WAKEFIELD L.M.,
HEINE U.I., LIOTTA L.A., FALANGA V., KEHRL J.H., FAUCI A.S.,
Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and
angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 83:4167-4171, 1986
39. ROBBINS S.L., COTRAN R.S., KUMAR V.,
The breast.
en Pathologic Basis of Disease, 3 ed. Ed. W.B. Saunders, 1984
40. HASLAM S.Z.,
Role of Sex Steroid Hormones in Normal Mammary Gland Function
en "The Mammary Gland" Ed. Neville M.C. and Daniel C.W. p 499-526, 1987
41. DEMBINSKI T.C., SHIU P.C.,
Growth Factors in Mammary Gland Development and Function
en "The Mammary Gland" Ed. Neville M.C. and Daniel C.W., Plenum Press,
pp. 355-382, 1987

42. PETERSEN D.W., HOYER P.E., VAN DEURS P.,
Distribution of Estrogen Receptor Positive-Negative Cells in Normal
Non-lactating Human Breast Tissue
Cancer Res. 47:5748-5751, 1987

43. MCGRATH C.M.,
Augmentation of the Response of Normal Mammary Epithelial Cells to
Estradiol by Mammary Stroma
Cancer Res. 43:1355-1360, 1983

44. HASLAM S.Z.,
Mammary Fibroblasts Influence on Normal Mouse Mammary Epithelial Cell
Responses to Estrogen in Vitro.
Cancer Res. 46:310-316, 1986

45. ENAMI J., ENAMI S., KOGA M.,
Growth of Normal and Neoplastic Mouse Mammary Epithelial Cells in Primary
Culture: Stimulation by Conditioned Medium from Mouse Mammary Fibroblasts.
Gann 74:845-853, 1983

46. LIPPMAN M.E., DICKSON R.B.,
Mechanisms of Growth Control in Normal and Malignant Breast Epithelium
Rec. Prog. Horm. Res 45:383:440, 1989

47. DANIELS C.W., SILBERSTEIN G.B., STRICKLAND P.,
Direct Action of 17- β -Estradiol on Mouse Mammary Ducts Analysed by
Sustained Release Implants in Steroid Autoradiography.
Cancer Res. 47:6052-6057, 1987

48. HUSEBY R.A., MALONEY T.M., MCGRATH C.M.,
Evidence of Direct Growth Stimulating Effect of Estradiol on Human MCF-7
Cells in Vitro.
Cancer Res. 44:2654-59, 1984

49. ROSEN P.P., MENENDEZ-BOTET C.J., NISSELBAUM J.S., URBAN J.A., MIKE V.,
FRACHIA A., SCHWARTZ M.K.,
Pathological Review of Breast Lesions Analyzed for Estrogen Receptor
Protein.
Cancer Res. 35:3187-3194, 1975

50. MARTIN P.M., KUTTEN F., SERMENT H., MAUVAIS-JARVIS P.,
Studies on Clinical Hormonal and Pathological Correlations in Breast
Fibroadenomas.
J.Steroid.Biochem. 9:1251-1255,1978
51. FEHERTY P., FARRER-BROWN G., KELLIE A.E.,
Oestradiol Receptors in Carcinoma and Benign Disease of the Breast: An
in vitro Assay.
52. KUTTEN F., FOURNIER S., DURAND J.C., MAUVAIS-JARVIS P.,
Estradiol and Progesterone Receptors in Human Breast Fibroadenomas
J.Clin.Endocr.Metab. 52:1225-1229,1981
53. CHARPIN C., MARTIN P.M., ANDRAC L., LAVAUT M.N., VACHERET H., HABIB M.C.,
TOGA M.,
D'etecion immunohistochemique des r'cepteurs oestrog'eniques et analyse
d'image (Samba 200) dans les carcinomes mammaires.
Ann.Pathol.3:196-210, 1988
54. HAAGENSEN J.,
Adenofibroma.
en Haagensen, Diseases of the Breast, ed.Saunders (p.267-283),1986
55. KOHLER G., BASSLER R.,
Der immunhistochemische Nachweis de Ostrogenrezeptors in Benignen Tumoren
de Mamma und in Formen de Mastopathie
Pathologe 8:325-333,1987
56. CARSTENS H.B.,
Ultrastructure of Human Fibroadenoma
Arch.Pathol. 98:23-32,1974
57. BALAKRISHNAN A., et.al.,
Differential Proliferative Response to Linoleate in Cultures of Epithelial
Cells from Normal Human Breast and Fibroadenomas.
Cancer Res. 49:857-862,1989

58. DICKSON R.B., BATES S.E., MCMANAWAY M.E., LIPPMAN M.E.,
Characterization of Estrogen Responsive Transforming Activity in Human
Breast Cancer Cell Lines.
Cancer Res. 46:1707-1713, 1986
59. SALOMON D.S., ZWIEBEL J.A., BANO M., LOSONCZY I., FEHREL P., KIDWELL W.R.,
Presence of Transforming Growth Factors in Human Breast Cancer Cells.
Cancer Res. 44:4069-4077, 1984
60. ZWIEBEL J.A., DAVIS M.R., KOHN E., SALOMON D.S., KIDWELL W.R.,
Anchorage-independent Growth-conferring Factor Production by Rat Mammary
Tumor Cells.
Cancer Res. 42:5117-5125, 1982
61. ZWIEBEL J.A., BANO M., NEXO E., SALOMON D.S., KIDWELL W.R.,
Partial Purification of Transforming Growth Factors from Human Milk
Cancer Res. 46:933-939, 1986
62. NODA K., UMEDA M., ONO T.,
Transforming Growth Factor Activity in Human Colostrum.
Gann 75:109-112, 1984
63. ECKERT K., LUBBE L., SCHON R., GROSSE R.,
Demonstration of Transforming Growth Factor Activity in Mammary Epithelial
Tissues.
Biochem. Int. 11:441-451, 1985
64. MC GUIRE W.L., DICKSON R.B., OSBORNE K.E., SALOMON D.,
The role of growth factor in breast cancer.
Breast Cancer Res. Treat. 12:159-166, 1988
65. BATES S.E., DAVIDSON N.E., VALVERIUS E.M., FETER C.E., DICKSON R.B., TAM J.P.,
KUDLOW J.E., LIPPMAN M.E., SALOMON D.S.,
Expression of Transforming Growth Factor alpha and its messenger Ribonucleic
Acid in Human Breast Cancer: Its Regulation by Estrogen and its Possible
Functional Significance.
Mol. Endocrinol. 2:543-555, 1988

66. KNABBE C., LIPPMAN M.E., WAKEFIELD L.M., FLANDERS K.C., KASID A., DERYNCK R.,
DICKSON R.B.,
Evidence that Transforming Growth Factor beta is a Hormonally Regulated
Negative Growth Factor in Human Breast Cancer Cells.
Cell 48:417-428, 1987

67. VAN DEN HOOF A.,
The part played by the Stroma in Carcinogenesis
Persp. Biol. Med. 27:498-509, 1984

68. ROBERTS A.B., LAMB L.C., NEWTON D.L., SPORN M.B., DE LARCO J.E., TODARO G.J.
Transforming growth factors: Isolation of polypeptides from virally and
chemically transformed cells by acid/ethanol extraction
Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 77:3494-3498, 1980

69. MORITA H., NODA K., UMEDA M., ONO T.,
Activities of Transforming Growth Factors on cell lines and their
Modifications by other Growth Factors.
Gann 75:403-409, 1984

70. VACCA L.L.,
Laboratory Manual of Histochemistry.
Ed. Raven Press, 1985

71. RABINOVITZ I., VILLARREAL M.L.,
Sistema economico de procesamiento de imagenes: Aplicación al estudio de
tumores
Memorias del II Simposio Nacional de Microscopia Optica y Electronica,
Ed. O. Guzman y P. del Angel, pp. 59-66, 1988

72. RABINOVITZ I.,
Montaje de un sistema sencillo para procesamiento de imagenes para
Microscopia optica. I. Procesamiento Bitonal
UAM, 1989

73. DAVIDSON E.A.,
Analysis of Sugars Found in Mucopolysaccharides
Methods of Enzymology 8:52-60, 1963

74. ASSOIAN R.K., et.al.,
Cellular Transformation by Coordinated Action of Three Peptide Growth
Factors from Human Platelets.
Nature 309:804-806, 1984
75. MASSAGUE J., KELLY B., MOTTOLA C.,
Stimulation by Insulin Like Growth Factors is required for Cellular
Transformation by Type Beta Transforming Growth Factor Beta
J.Biol.Chem. 260:4551-4554, 1985
76. GOSPODAROWICZ D., BIALECKI H., GREENBERG G.,
Purification of the Fibroblast Growth Factor Activity from Bovine Brain.
J.Biol.Chem. 25:3736-3743, 1978
77. LIPPMAN M.E., HUFF K.K., JAKESZ R., HECHT T., KASID A., BATES S., DICKSON R.B.,
Estrogens Regulate Production of Specific Growth Factors in Hormone
Dependent Human Breast Cancer.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 244:11-15, 1985
78. CLARKE R. BRUNNER N., KATZ D., GLANZ P., DICKSON R.B., LIPPMAN M.E.,
The Effects of a Constitutive Expression of TGF alpha on the Growth of MCF-7
Human Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo
Mol.Endocr. 3:372-380, 1989
79. SILBERSTEIN G.B., DANIEL C.W.,
Reversible Inhibition of Mammary Gland Growth by Transforming Growth Factor
Beta.
Science 237:291-293, 1987
80. ROLLINS B., O'CONNELL T., VENNET G., BURTON E., STILES C., RHEINWALD J.,
Environmental Dependent Growth Inhibition of Human Epidermal Keratinocytes
by Recombinant Human Transforming Growth Factor Beta.
J.Cell.Phys., 139:455-462, 1989
81. CLEMMONS D.R., SHAW D.S.
Purification and Biologic Properties of Fibroblast Somatomedins
J.Biol.Chem. 261:10293-10298, 1986

82. HUFF K.K., KAUFFMAN D., GABBAY K.H., SPENCER E.M., LIPPMAN M.E., DICKSON R.B.,
Secretion of Insulin Like Growth Factor-I Related Protein by Human Breast
Cancer Cells.
Cancer Res. 46:4613-4619, 1986

83. LYNCH A.S., COLVIN R., ANTONIADES H.E.,
Growth Factors in Wound Healing: Single and Synergistic Effects on Partial
Thickness Porcine Skin Wounds
J. Clin. Invest. 84:640-646, 1989

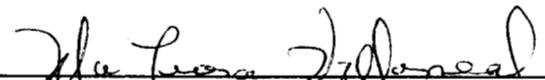
84. FINE A., POLIKS C., DONAHUE P., SMITH B., GOLDSTEIN R.,
Differential Effects of PGE-2 on TGF beta and Insulin Induced Collagen
Formation in Lung Fibroblasts.
J. Biol. Chem. 264:16988-16991, 1989

85. FULTON A.M.,
Prostaglandins in Breast Cancer
en "Cellular and Molecular Biology of Mammary Cancer" ed. Medina D. et.al.,
pp. 253-274, 1987

86. KIDWELL W.R., MOHANAM S., SALOMON D.S.,
Growth Factor Production by Mammary Tumor Cells.
en "Cellular and Molecular Biology of Mammary Cancer" Ed. Plenum Press,
pp. 239-252, 1987

87. YAMANE T.,
Estadística
Harla, 3 ed., 1973

EL JURADO DESIGNADO POR LA DIRECCION DE LA DIVISION DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA DE IZTAPALAPA APROBO EL PRESENTE TRABAJO EL
DÍA DE DE 1990


M. EN C. MARIA LUISA VILLARREAL O.


DR. MIGUEL BETANCOURT R.


M. EN C. JOAQUIN HERRERA M.