



CASA ABIERTA AL TIEMPO

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

128273

ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FACTORES HEMATOPOYETICOS HUMANOS
IL-3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF E IL-2 SOBRE LA PROLIFERACION DE LAS
CELULAS EPITELIALES WRL-68, HEP, T3, 5637, CaLo Y DE LOS
FIBROBLASTOS FibCer, L-929 Y CCD-16LU

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

REBECA LOPEZ MARURE

MEXICO, D. F.

1993

152 4-V-93

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

128273

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FACTORES HEMATOPOYETICOS HUMANOS IL-3,
GM-CSF, G-CSF, M-CSF E IL-2 SOBRE LA PROLIFERACION DE LAS CELULAS
EPITELIALES WRL-68, HEP, T3, 5637, CaLo Y DE LOS FIBROBLASTOS
FibCer, L-929 Y CCD-16Lu.**

TESISTA:

BIOL. REBECA LOPEZ MARURE

TUTOR:

M. EN C. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCON

ASESORES:

**DR. BENNY WEISS STEIDER
DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la tutela del M. en C. Jorge F. Mendoza Rincón y la asesoría del Dr. Benny Weiss Steider y el Dr. J. Miguel Betancourt Rule.

A mis padres:

Con amor y respeto, agradeciéndoles su
apoyo para alcanzar otra meta más.

**A mi esposo
y a mi hijo Miguel Angel:**

Con todo mi amor.

A mis hermanos:

Con cariño.

A mis compañeros y amigos.

La Maestría en Biología Experimental se encuentra registrada dentro del Padrón de Excelencia de Programas de Posgrado del CONACyT, y es financiada por éste a través del Convenio PFPN/66/91.

I N D I C E

Página

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MARCO TEORICO	
- <i>Las células hematopoyéticas</i>	4
- <i>Los factores de proliferación hematopoyéticos (HGFs)</i> ..	5
EGF	7
IL-2	7
M-CSF	8
G-CSF	8
GM-CSF	9
IL-3	9
PDGF	10
- <i>Las células no-hematopoyéticas</i>	11
<i>Líneas de células estromales</i>	12
- <i>Interacciones celulares en hematopoyesis: Relación entre células hematopoyéticas y no-hematopoyéticas</i>	12
<i>Interacciones célula-célula</i>	13
<i>Interacciones matriz-célula</i>	13
<i>Mediadores solubles</i>	14
- <i>Efectos de los HGFs en células estromales</i>	15
<i>En células normales</i>	17
<i>En células tumorales</i>	17
- <i>Uso clínico de los HGFs en células malignas</i>	19
G-CSF	20
GM-CSF	20
M-CSF	21
IL-3	21
IL-2	22
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y METODO	
- <i>Ratones</i>	26
- <i>Células epiteliales y fibroblastos</i>	26
- <i>Condiciones del cultivo celular</i>	27
- <i>Obtención y cultivo de epitelios y fibroblastos de ratón</i>	27
- <i>Cinéticas de proliferación</i>	27
- <i>Determinación de la proliferación celular</i>	28
- <i>Ensayo con los factores de proliferación hematopoyéticos</i>	28
- <i>Análisis estadístico</i>	30

RESULTADOS

- Coeficiente de variación	31
- Curvas patrón	31
- Cinéticas de proliferación	32
- Efecto de los HGFs sobre la proliferación de epitelios	32
- Efecto de IL-2 sobre la proliferación de epitelios	34
- Efecto de los HGFs sobre la proliferación de fibroblastos	34
- Efecto del PDGF y G-CSF sobre la proliferación de fibroblastos	35

DISCUSION	36
-----------------	----

REFERENCIAS	40
-------------------	----

APENDICES

- Apéndice I	
Regresión lineal	52
Tiempo de doblaje	52
- Apéndice II	
Preparación del cristal violeta	53
- Apéndice III	
Coeficiente de variación	53
Prueba de t de Student	54

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

HGFs	Factores de proliferación hematopoyéticos
CSFs	Factores estimuladores de colonias
CSA	Actividad estimuladora de colonias
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
EGF	Factor de proliferación epidermal
PDGF	Factor de proliferación derivado de plaquetas
aPDGF	Anticuerpo monoclonal dirigido contra PDGF
rh	Molécula recombinante humana
WRL-68	Línea celular de epitelios de hígado humano
HEP	Línea celular de carcinoma de laringe humano
T3	Células de carcinoma de cérvix humano
CaLo	Células de carcinoma de cérvix humano
5637	Línea celular de carcinoma de vejiga humano
FibCer	Fibroblastos de cérvix normal humano
L-929	Línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón
CCD-16Lu	Línea celular de fibroblastos de pulmón adulto humano
ng	Nanogramos
u	Unidades
KDa	Kilodaltones

RESUMEN

Los factores de proliferación hematopoyéticos (HGFs), tienen un importante papel en la hematopoyesis al producir la proliferación, diferenciación y activación de las células sanguíneas. Son producidos principalmente por estas células, aunque también se ha podido comprobar que son secretados por células de origen no-hematopoyético. Debido a la actual aplicación clínica de los HGFs principalmente de G-CSF, GM-CSF e IL-2 en pacientes con padecimientos hematológicos, inmunológicos y oncológicos, ha aumentado el interés en estudiar el efecto de los HGFs sobre la proliferación de células tumorales.

En este trabajo se evaluó el efecto de la IL-3, G-CSF, GM-CSF, M-CSF e IL-2 recombinantes humanos sobre la proliferación de células epiteliales estromales: WRL-68, HEP, T3, 5637, CaLo y epitelio de riñón de ratón, y de estos HGFs y PDGF en los fibroblastos: FibCer, L-929, CCD-16Lu y de pulmón de ratón, por medio de una técnica basada en la incorporación del colorante cristal violeta al núcleo celular y cuantificada por espectrofotometría. Como control negativo se utilizó un cultivo sin factor, IL-2 como control recombinante negativo y como control positivo EGF.

Los resultados para las células epiteliales muestran que en WRL-68, HEP y T3, ninguno de los HGFs indujo proliferación, mientras que en las células 5637 y CaLo, todos los HGFs estimularon su proliferación. En cuanto a los fibroblastos, en las células FibCer no se observó aumento en la proliferación con ninguno de los HGFs; sin embargo, el anticuerpo contra PDGF (aPDGF) resultó un potente mitógeno para estas células. En L-929 todos los HGFs indujeron su proliferación y el aPDGF fué uno de los mitógenos más potentes. El PDGF, M-CSF, GM-CSF y aPDGF estimularon la proliferación en CCD-16Lu, mientras que en fibroblastos normales de pulmón de ratón la proliferación fue inducida por el GM-CSF, PDGF, G-CSF, M-CSF e IL-3. En todos los ensayos el aumento en la proliferación tuvo una significancia estadística de $P < 0.05$.

De los resultados obtenidos se puede concluir que los HGFs estimulan la proliferación de algunas células epiteliales y fibroblastos tanto normales como tumorales de origen no hematopoyético, por lo que en la aplicación de estos factores a nivel clínico, sobre todo en pacientes con tumores sólidos, se debe tener mucho cuidado y determinar más detalladamente el efecto de estos factores sobre la proliferación de células tumorales *in vitro* e *in vivo*, antes de ser administrados a los pacientes.

I N T R O D U C C I O N

Los precursores hematopoyéticos pueden ser identificados en un gran número de tejidos, pero la médula ósea es el único sitio en los mamíferos adultos normales en el cual la mielopoyesis, eritropoyesis y linfopoyesis proceden simultáneamente (1). Estos eventos se llevan a cabo en la médula ósea a través de complicados mecanismos de regulación, muchos de los cuales están a cargo de moléculas glicoproteicas que controlan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, y que son conocidas genéricamente como factores de proliferación hematopoyéticos o HGFs (Hematopoietic Growth Factors) (2). Entre estos factores se encuentran los factores estimuladores de colonias (CSFs) de granulocitos (G-CSF), de macrófagos (M-CSF), y de ambos tipos celulares (GM-CSF); la eritropoyetina (Epo), las interleucinas (IL-1 a IL-12), el factor de proliferación epidermal (EGF), el factor de proliferación de fibroblastos (FGF), los interferones (IFNs) y el factor de proliferación transformante (TGF), entre otros.

Dentro de la cavidad medular existen interacciones entre las células sanguíneas y elementos del tejido circundante, colectivamente referidos como células estromales, que contribuyen a la regulación de la hematopoyesis (3). Estudios morfológicos demuestran una fuerte asociación entre las células sanguíneas y elementos del tejido estromal (4). Así por ejemplo se tiene, que el GM-CSF es producido por células epiteliales y el M-CSF por fibroblastos (5), dando en consecuencia indicios que la producción de los HGFs son célula-específica. Un gran avance en la última década, que permite el desarrollo de técnicas de cultivo celular, hace posible mantener en cultivo células estromales seleccionadas, estudiar su capacidad para soportar hematopoyesis e identificar y clonar genes que codifican factores de diferenciación (6, 7). Las citocinas, que son modificadores biológicos, algunas derivadas de células estromales, han sido usadas en varios regímenes terapéuticos por su capacidad de inducir la proliferación de leucocitos (8). En consecuencia, el estudio de los efectos de las células estromales en la hematopoyesis proveen un excelente modelo para estudiar los procesos de desarrollo y la regulación de la producción de células sanguíneas.

Hasta hace poco se creía que los HGFs tenían solo efectos sobre células sanguíneas (9); sin embargo, recientemente se ha demostrado que estos factores pueden estimular la proliferación de células no-hematopoyéticas (10, 11). Un ejemplo es el efecto que tiene el GM-CSF de producir la incorporación de timidina tritiada (actividad mitogénica) en carcinomas de células pequeñas de pulmón (10, 11). Por otro lado, resultados experimentales obtenidos por nuestro grupo de trabajo, han demostrado que el G-CSF es un potente estímulo proliferador para fibroblastos de pulmón de ratón (12) al igual que la IL-3 y el M-CSF; este último también fue capaz de producir la proliferación de células epiteliales de riñón de ratón (datos no publicados). Asimismo hemos obtenido datos recientes que nos permiten suponer que el efecto mitogénico de los HGFs sobre las células estromales puede estar mediado por más de un factor, ya que encontramos que la actividad inductora del G-CSF para fibroblastos de pulmón de

ratón, era inhibida por anticuerpos contra el factor de proliferación derivado de plaquetas (PDGF).

Los HGFs están siendo actualmente utilizados en la terapia de pacientes con cáncer como carcinomas y sarcomas, con la finalidad de rescatar a estos pacientes de la citorreducción que experimenta su médula ósea al ser tratados con quimioterapia o radioterapia, obteniéndose resultados muy alentadores. Sin embargo, existen reportes que demuestran que estos factores también son capaces de inducir la proliferación de algunas células tumorales *in vitro* (13). En consecuencia a pesar de la gran importancia que ha tomado este campo de la terapéutica, consideramos de gran importancia el estudio del efecto proliferador de los HGFs en células tumorales *in vivo*, ya que no se tienen resultados experimentales a este respecto.

En este trabajo, con la finalidad de evaluar el posible efecto proliferador de los HGFs en células estromales de tipo tumoral, se determinó *in vitro* el efecto que tienen los HGFs: IL-3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF e IL-2, sobre la proliferación de líneas tumorales humanas de tipo epitelial, utilizando células normales epiteliales y fibroblastos de humano y de ratón como controles comparativos.

M A R C O T E O R I C O

LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS

La contribución normal de la médula ósea diariamente en el humano, es de aproximadamente 2.5 billones de células rojas, 1 billón de granulocitos y 2.5 billones de plaquetas por kilogramo de peso corporal (14). Estas células hematopoyéticas maduras se derivan de células progenitoras, cada una de las cuales está determinada a diferenciarse a solamente uno o dos linajes celulares, pero todas las células progenitoras se originan de la misma célula tallo pluripotencial. Asimismo se considera que las células tallo hematopoyéticas se diferencian a partir de 2 tipos de células tallo comprometidas: unas operacionalmente definidas como CFU-GEMm (Unidad formadora de colonias-granulocito, eritrocito, macrófago y megacariocito) y las otras llamadas CFU-L (Unidad formadora de colonias linfoides) o células tallo linfoides (15) (Figura 1).

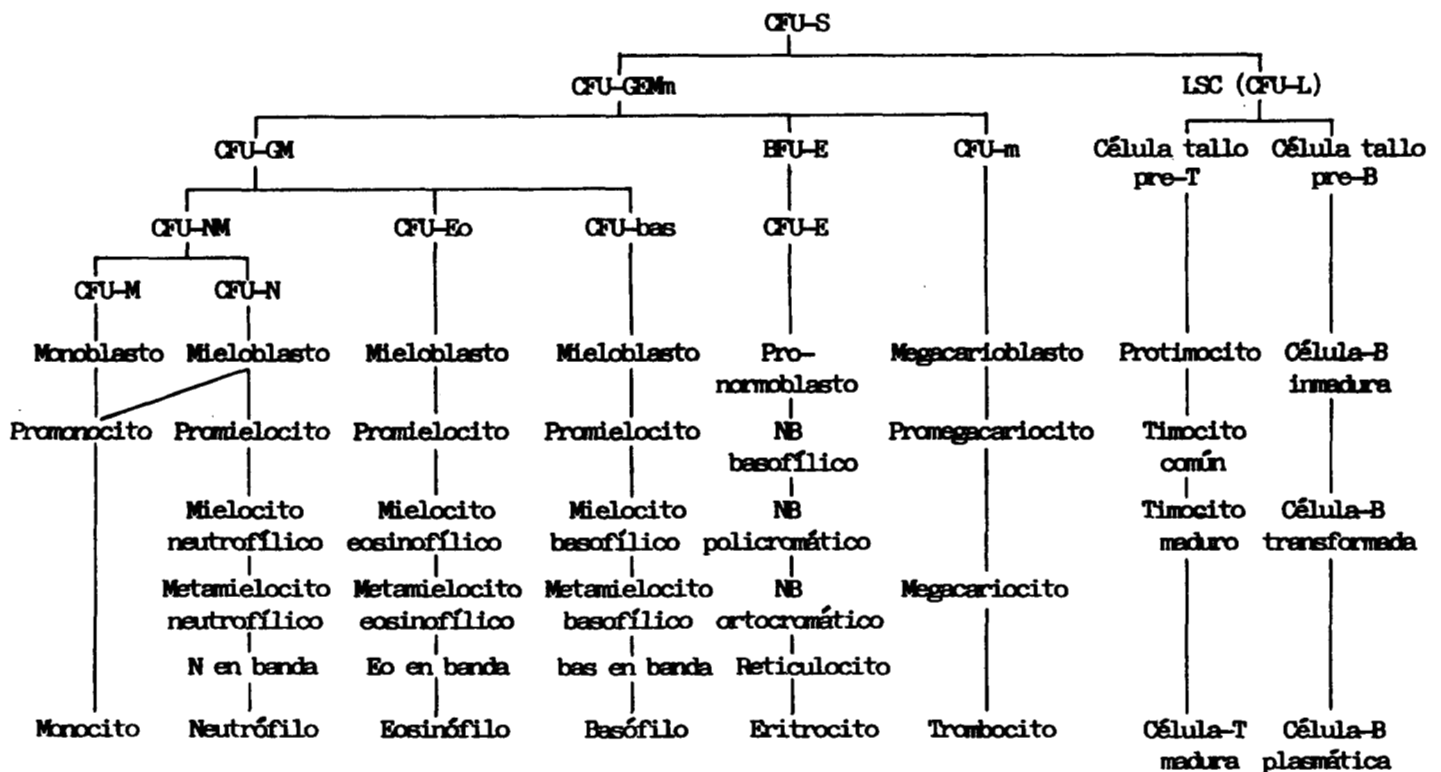


Figura 1. Representación esquemática de la hematopoyesis. CFU, unidad formadora de colonias; LSC, célula tallo linfoide; BFU, unidad formadora de grupos; S, bazo; G, granulocito; E, eritrocito; M, macrófago; m, megacariocito; L, linfocito; N, neutrófilo; Eo, eosinófilo; bas, basófilo; NB, normoblasto. Tomado de Ref. 15.

La formación de las células sanguíneas, comienza durante la embriogénesis y se lleva a cabo a partir de un pequeño número de células tallo hematopoyéticas pluripotenciales. Debido a su habilidad para autorrenovarse, una gran cantidad de células tallo son generadas no solamente para mantener su población a través de la vida adulta, sino también para producir, por diferenciación, a los progenitores de todas las células hematopoyéticas. Por lo que es evidente que la hematopoyesis requiere de un balance entre la autorrenovación y diferenciación (16, 17). Por otra parte la regulación de la hematopoyesis involucra interacciones celulares con el microambiente en el sitio de formación de las células sanguíneas (18).

LOS FACTORES DE PROLIFERACION HEMATOPOYETICOS (HGFs)

Las células progenitoras, la progenie inmediata de las células tallo, son reconocidas por su habilidad para proliferar *in vitro* en medio de gel suave y producir colonias maduras de linajes determinados. Por muchos años ha sido conocido que la sobrevivencia, proliferación y desarrollo de estas células "formadoras de colonias", requiere de la continua presencia de moléculas específicas reguladoras del proliferación. Estas proteínas, también conocidas como citocinas, factores humorales, factores estimuladores de colonias y hematopoyetinas, mejor conocidas como factores de proliferación hematopoyéticos (HGFs) (Ver Cuadro 1), han sido identificadas, purificadas, molecularmente clonadas y caracterizadas con funciones específicas a diferentes niveles en las vías de desarrollo de más, sino todas, las células sanguíneas y sus progenitores (19, 20, 21). Los HGFs pueden ser clasificados en dos grandes grupos: 1) los estimuladores y 2) los inhibidores de la hematopoyesis. En el presente trabajo se analizarán solamente a algunos de los primeros.

Cuadro 1. LOS FACTORES DE PROLIFERACION HEMATOPOYETICOS.

Nombre	Nombres Alternativos	Fuente Celular
GM-CSF	CSF-alfa	Linfocito T, macrófagos, epitelios, fibroblastos, células NK
G-CSF	CSF-beta	Macrófagos, fibroblastos y endotelio
M-CSF	CSF-1	Macrófagos, fibroblastos y endotelio
Interleucina 1-alfa	LAF, EP, MCF	Múltiple
Interleucina 1-beta	Catabolina	Múltiple
Interleucina 2	TCGF-1, TRF, KHP	Linfocitos T
Interleucina 3	Multi-CSF, BPA, HCGF, MCGF-1, PSF	Linfocitos T

Interleucina 4	BSF-1, BCGF-1, TCGF-2, MCGF-2	Linfocitos T
Interleucina 5	EDF, TRF, BCGF-2	Linfocitos T
Interleucina 6	H-PGF, HSF, BSF-2	Múltiple
Interleucina 7	IFN-beta, hemopoyetina LP-1, factor de proliferación de células pre-B	Células estromales, bazo y timo, riñón y líneas PV-34, MR-6, MRC-5, SV-4, TPA30-1
Interleucina 8	MDNCF, NAP, NAF, GCP, TCF, LAI	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos, fibroblastos dérmicos, queratinocitos, células endoteliales vasculares, melanocitos, hepatocitos, líneas celulares tumorales
Interleucina-9	TCGF-3, P40, MEA, factor de proliferación megacarioblástico	Líneas celulares MLS4.2, HTLV-1, C5MJ-2, células T
Interleucina 10	CSIF	Células T auxiliares, líneas celulares mast MC/9 y MM3
Interleucina 11		Células estromales, línea celular PV-34
Interleucina 12	CLMF	Línea linfoblastoide B humana NC-37
SCF	KL, ligando c-kit, MCGF	Células estromales, placenta, fibroblastos, cerebro, pulmón
PDGF	PDGF I, PDGF II	Múltiple
TNF	Cachectina, MCT, CTX, necrosina, TNF-alfa, factor hemorrágico, MCF, DIF	Múltiple
TGF	CIF-A, CIF-B, DIF, EIF, GI, TGI, poliergina, panregulina	Múltiple
EGF	Urogatrona	Cerebro, riñón, médula adrenal; glándula: salival, duodenal, gástrica y pilórica de estómago
Epo	Hemopoyetina, ESF, EP	Riñón adulto, hígado fetal y adulto, carcinomas de riñón, hemangioblastomas, líneas celulares de hepatomas

Tomado de Ref. 190.

Abreviaturas

GM-CSF, colony stimulating factor-granulocyte/macrophage; **G-CSF**, colony stimulating factor-granulocyte; **M-CSF**, colony stimulating factor-macrophage; **SCF**, stem cell factor; **TNF**, tumor necrosis factor; **TGF**, transforming growth factor; **EGF**, epidermal growth factor; **LAF**,

lymphocyte-activating factor; **EP**, endogenous pyrogen; **MCF**, mononuclear cell factor; **TCG 1,2,3**, T-cell growth factor; **TRF**, T-cell replacing factor; **KHF**, killer helper factor; **BPA**, burs promoting activity; **HCGF**, hematopoietic cell growth factor; **MCGF-1,2**, mast-cell growth factor 1, 2; **PSF**, persinting-cell-stimulating factor; **BSF-1,2**, B-cell stimulatory factor 1, 2; **BCGF-1,2**, B-cell growth factor 1, 2; **EDF**, eosinophil differentiation factor; **H-PGF**, hybridom plasmacytoma growth factor; **HSF**, hepatocyte-stimulating factor; **IFN-beta**, Interferon beta; **LP-1**, lymphopietin-1; **MDNCF**, monocyte-derived neutrophil chemotactic factor; **NAP**, neutrophil-activating peptide; **NAF**, neutrophil-activating factor; **GCP**, granulocyte chemotactic protein; **TCF**, T-lymphocyte chemotactic factor; **LAI**, leukocyte adhesion inhibitor, **P40**, protein 40 KDa; **MEA**, mast cell growth enhancing activity; **CSIF**, cytokine synthesis inhibitory factor; **CLMF**, cytotoxic lymphocyte maturation factor; **KL**, c-Kit ligand; **MGF**, mast cell growth factor; **SLF**, steel locus factor; **PDGF I,II**, platelet-derived growth factor I, II; **MCT**, Macrophage cytotoxin; **CTX**, cytotoxin; **TNF-alfa**, tumor necrosis factor-alpha; **MCF**, macrophage cytotoxic factor; **DIF (TNF)**, differentiation-inducing factor; **CIF A,B**, cartilage-inducing factor A, B; **DIF (TGF)**, differentiation-inhibiting factor; **EIF**, Epstein-Barr virus inducing factor; **GI**, BSC-1 cell growth inhibitor; **TGI**, tissue-derived growth inhibitor; **ESF**, erythropoietic-stimulating factor; **Epo**, **EP**, erythropoietin.

EGF

El factor de proliferación epidermal (EGF), una proteína pequeña de 6 KDa fue originalmente definida como una molécula que puede estimular precozmente la erupción de dientes y abertura de párpados en ratones neonatos (22).

El EGF es expresado por células en varios tejidos, por ejemplo: cerebro, riñón, médula adrenal, glándula salival, glándula duodenal de Brunner, y glándulas gástrica y pilórica de estómago (23).

Entre sus efectos *in vivo* destacan el desarrollo postnatal y prenatal (22), la inhibición de la secreción de ácido gástrico (24), cicatrización de heridas (25), regeneración de hígado (26), angiogénesis (27), psonosis (28), y tumorigénesis (29).

IL-2

Interleucina-2 (IL-2), fue originalmente definida como una factor de proliferación de células-T, producido después de estimulación a un antígeno o mitógeno de células linfoides (30), que permite la propagación a largo plazo en cultivo en suspensión de células-T de una variedad de fuentes.

Solamente limitados tipos celulares producen IL-2 como son células-T ($CD4^+$ y $CD8^+$), linfocitos granulares grandes (NK, LAK), algunos tumores de células pre-B y pre-T, la línea humana de células

pre-T (BSM), tumores de células-T murinas (EL-4), humanas (Jurkat) y de primate (MLA-144) (31).

Afecta a una limitada variedad de diferentes tipos celulares: linfocitos-T, linfocitos granulares grandes, monocitos, células-B, células oligodendrogliales.

Sus efectos *in vivo* son antitumorales, antibacteriales y antivirales, además de participar en autoinmunidad, tener efectos en infección parasitaria, rechazo en injertos y en respuestas inmunes. Ha sido usada clínicamente en el tratamiento del cáncer y en trasplantes, ya que aumenta la reactividad inmune e inmunización, y por otra parte también ha sido usada en pacientes con problemas de hipertensión (32).

M-CSF

Los factores estimuladores de colonias (CSFs), fueron originalmente definidos como factores que estimulaban a células progenitoras hematopoyéticas, en suspensiones de células de médula ósea, a proliferar y diferenciarse a colonias de granulocitos maduros y/o macrófagos cuando se cultivaban en un medio semisólido (33, 34). El primero de estos CSFs descrito, fue el factor estimulador de colonias-1 o de macrófagos (CSF-1 o M-CSF). Ha sido mostrado que el M-CSF selectivamente estimula la formación de colonias de macrófagos (35, 36).

Los tipos celulares productores de M-CSF son muy diversos, y van desde células malignas como las leucémicas, linfomas, mielomas, carcinomas, hasta células normales estromales como fibroblastos y endotelios, además de células hematopoyéticas (37).

El M-CSF humano es activo sobre células de ratón y rata y el M-CSF de ratón es activo sobre células de rata pero inactivo sobre células humanas.

Sus principales células blanco son monocitos, macrófagos, células microgliales, células progenitoras de macrófagos, células hematopoyéticas primitivas. Entre sus efectos *in vivo* destacan la producción de fagocitos mononucleares, regulación de la función placentar, resorción de hueso, actividad antitumoral y la reducción de colesterol en el plasma (37, 38). También tiene significancia clínica en humanos como marcador tumoral, recuperación hematopoyética en tratamientos de quimioterapia, inflamación, tratamiento de infecciones y de leucemia (38, 39).

G-CSF

El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), fue originalmente definido en un sistema de ratón como un factor capaz de generar, predominantemente colonias de granulocitos en cultivos semisólidos de progenitores hematopoyéticos y diferenciación de células leucémicas mielomonocíticas (40, 41).

Varios tipos celulares son conocidos para producir G-CSF como células estromales, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, la línea celular de carcinoma de vejiga 5637 y el carcinoma escamoso CHU2 humanos (19, 42).

El G-CSF humano no parece ser especie-específico en sus efectos biológicos. G-CSF afecta una gran variedad de diferentes tipos celulares *in vitro* como progenitores hematopoyéticos tempranos (43), progenitores mieloides, neutrófilos (44), células leucémicas (45, 46) líneas de células tumorales y células endoteliales. *In vivo*, actúa sobre el linaje granulocítico, sobre otros linajes hematopoyéticos como monocitos y linfocitos, tejidos como el bazo, hígado y nudos linfoides (47). Reduce la mortalidad en enfermedades infecciosas (48).

La habilidad de G-CSF para modular la producción y funcionalidad de neutrófilos es potencialmente muy importante en la medicina clínica en el tratamiento del cáncer, en neutropenia severa crónica y en la neutropenia de enfermedades infecciosas (47).

GM-CSF

El factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) fue inicialmente definido en ensayos *in vitro*, como un factor de proliferación capaz de producir el desarrollo clonal de progenitores granulocito-macrófago normales (49). Un número de diferentes tipos celulares son conocidos para producir GM-CSF, predominantemente después de estimulación de un antígeno o endotoxinas. Así se tienen a las células-T activadas, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales (49).

El GM-CSF parece ser específico para algunas especies en sus efectos. Tiene diversas acciones entre las que sobresalen la de factor de sobrevivencia para células sanguíneas maduras, como factor de proliferación para células progenitoras hematopoyéticas y células leucémicas primarias, como factor de diferenciación en líneas de células leucémicas (HL-60) y como activador de células sanguíneas maduras (49). Aparte de aumentar o producir citotoxicidad, fagocitosis, adhesión celular, de liberar mediadores y funcionar como quimioatrayente (49).

Ha sido aplicado frecuentemente a nivel clínico en la quimioterapia del cáncer, en el trasplante de médula ósea, en la mielodisplasia, en anemia aplásica, en leucemia mieloide aguda y SIDA, y sobre todo en la neutropenia ocasionada por estos padecimientos (49).

IL-3

Interleucina-3 (IL-3), fue originalmente definida en ratón como un factor liberado por una leucemia monocítica (WEHI-3B) o por células-T activadas, que estimulaba la proliferación y diferenciación de células mast, y los precursores de todos los linajes hematopoyéticos (50).

La mayor fuente de IL-3 es el linfocito-T activado, además puede ser producida por células mast y células NK activadas por antígenos o mitógenos. En el ratón, ciertas leucemias mieloides o sarcomas exhiben rearrreglos patológicos del gen de IL-3, resultando en su producción. Normalmente IL-3 es sintetizada solamente después de un estímulo inmunológico, y puede por tanto, ser considerada como una molécula de stress o emergencia (50).

Sus efectos *in vitro* son la estimulación la proliferación y diferenciación de células tallo hematopoyéticas pluripotenciales, estimular la función de células mast maduras, basófilos, eosinófilos y macrófagos, e *in vivo*, funciona como un ligando entre el sistema inmune y el hematopoyético, estimulando la generación y la función de células sanguíneas (50).

Su importancia a nivel clínico radica en que estimula la hematopoyesis. Es usado en leucemia y en enfermedades infecciosas y alérgicas (51).

PDGF

El principal papel del factor de proliferación derivado de plaquetas (PDGF) es estimular la proliferación de células y mantener su viabilidad. El PDGF es sintetizado por células normales y transformadas y su expresión inapropiada en células transformadas por el virus de sarcoma de simio (SSV) establece mecanismos similares de transformación neoplásica y de factores de proliferación iniciados por el aumento en el número celular (52). Su expresión anormal puede también ser importante en enfermedades caracterizadas por una respuesta celular proliferativa o por fibrosis (52).

El PDGF fue identificado como el principal mitógeno en suero para células de origen mesenquimal. Por si mismo, es sintetizado como una proteína heterodimérica en megacariocitos, almacenado en los gránulos de las plaquetas, y liberado de plaquetas activadas a los sitios de daño en los vasos sanguíneos (52).

Se ha encontrado que el PDGF es un fuerte quimioatrayente para monocitos humanos y neutrófilos, y también para fibroblastos y células de músculo de boca. Induce activación de leucocitos polimorfonucleares humanos y monocitos, produce un incremento en la liberación de colagenasa por fibroblastos en cultivo, una actividad que es esencial para la reparación del tejido (52).

Las principales fuentes de PDGF son plaquetas, megacariocitos, monocitos, células endoteliales, células vasculares de músculo de boca, fibroblastos, células gliales, astrocitos del tipo 1, mieloblastos, células mesangiales, células epiteliales de riñón, citotrofoblastos placentales, gliomas, glioblastomas, carcinomas mamarios, meningiomas y algunas líneas celulares (52).

Entre sus principales efectos destacan la síntesis de DNA y la de mitógeno, diferenciador del sistema nervioso, vasoconstricción y quimiotracción, entre otros (53).

LAS CELULAS NO-HEMATOPOYETICAS

Las células estromales, estan organizadas dentro de un microambiente hematopoyético que soporta el desarrollo de las células sanguíneas.

Células estromales, es un término genérico usado para referir a las células no hematopoyéticas que conforman las células fijas del tejido en la cavidad medular. Múltiples tipos celulares han sido considerados componentes del estroma. Las células endoteliales forman parte de esta población celular. La hematopoyesis ocurre en los espacios intersinusoidales, y las células sanguíneas maduras entran a la circulación sistémica cuando pasan a través de ellos y la delgada membrana basal presente sobre el lado abluminal (54). Esto implica una fuerte interacción entre células sanguíneas y endoteliales, ya que el endotelio puede selectivamente retener poblaciones defectuosas o inmaduras dentro de la médula (55). En adición, las células endoteliales pueden secretar factores que pueden afectar a las células hematopoyéticas (56, 57). Estas células presentes en los espacios intersinusoidales, tienen interacciones extensivas con células sanguíneas en desarrollo, y por su localización, pueden ser consideradas como el mayor tipo de células estromales que regula la hematopoyesis (54). Otro tipo de células estromales son las reticulares, que tienen grandes extensiones citoplasmáticas que hacen posible un íntimo contacto con las células hematopoyéticas (58). Las células reticulares están en contacto con las endoteliales en la membrana basal y ha sido propuesto que el grado de asociación regula la emigración de células a los sinusoides. El endotelio y la cubierta reticular, forman lo que ha sido referida como la barrera entre médula ósea-sangre (59). Esto puede influir la entrada de mediadores solubles producidos en otra parte dentro de la cavidad medular (60), en adición de regular la migración celular. Otras células del tejido conectivo están también presentes en la médula. Los fibroblastos son componentes del endosteo, la capa adventicia de vasos medularmente largos y vainas nerviosas. La otra prominente célula de la médula es el adipocito, en donde la médula amarilla no hematopoyética, está formada principalmente por estas células. Ciertas poblaciones definidas por su localización y morfología pueden afectar la producción de células sanguíneas y son clasificadas como células estromales (54). Las células estromales contribuyen al ambiente hematopoyético, pero no todas las células microambientales, son células estromales.

Las células estromales estan organizadas dentro de compartimentos especializados que determinan la vía por la cual una célula tallo hematopoyética pluripotente se diferencia (61). Permanece sin aclarar si las células estromales actúan directamente en la inducción de la diferenciación y comprometimiento de células tallo pluripotenciales o, proveen las señales necesarias para permitir el desarrollo de un precursor que ha sido comprometido azarosamente a un linaje particular, a través de su propia programación genética intrínseca (62).

Líneas de células estromales

Es relativamente fácil generar capas adherentes puras depletadas de células hematopoyéticas (63). Sin embargo, el análisis de la heterogeneidad de células, la evaluación de las citocinas producidas por ellas y la clonación de los genes que codifican estos factores, requieren el uso de líneas de células estromales. Estas células son generalmente no fagocíticas y pueden ser distinguidas de los macrófagos por las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I donde son fuertemente expresadas, además de que los marcadores característicos de las células hematopoyéticas están ausentes. Todas estas líneas secretan varios componentes de la matriz extracelular y mediadores solubles que actúan sobre blancos hematopoyéticos. El uso de cultivos de médula ósea a largo plazo y la clasificación de líneas de células estromales, permiten conocer acerca de la regulación de producción de células sanguíneas. Los mecanismos por los cuales las células estromales regulan la hematopoyesis son similares a los operativos en otros sistemas de desarrollo e incluyen interacciones célula-célula, matriz-célula y mediadores solubles (54).

INTERACCIONES CELULARES EN HEMATOPOYESIS: Relación entre células hematopoyéticas y no-hematopoyéticas.

Las células estromales de la médula ósea, desempeñan un papel muy importante en la regulación de la hematopoyesis a través de interacciones célula-célula y de la liberación de HGFs (64, 65).

Recientemente ha sido demostrado, que los cultivos de células estromales, elaboran actividades de colonias como la de macrófagos, granulocitos/macrófagos y megacariocitos (66), por lo que estos resultados implican que el ambiente estromal, así como provee importantes interacciones celulares, puede secretar factores de proliferación en el medio de cultivo.

El desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* de médula ósea a largo plazo, en los cuales las células tallo hematopoyéticas se encuentran bajo proliferación y renovación prolongadas sobre una capa estromal adherente como microambiente, ha permitido el estudio de interacciones célula estromal-célula tallo (67, 68). En este tipo de cultivos la proliferación y el desarrollo de las células hematopoyéticas, solamente ocurre en íntima asociación con las células estromales. Si las células tallo son separadas físicamente de las estromales usando una barrera que permite la difusión de moléculas reguladoras solubles (por ejemplo, geles de agar), las células tallo mueren rápidamente. Esto indica, que la proximidad física con las células estromales es insuficiente para mantener la sobrevivencia y proliferación de las células tallo (69).

En las interacciones directas membrana-membrana (tales como las que ocurren durante la hematopoyesis) en asociación con células estromales de la médula), las moléculas que se enlazan a los factores de proliferación se encuentran en el extremo de la periferia celular. La capacidad de la matriz extracelular para enlazar IL-3 y GM-CSF se

lleva a cabo por componentes de la matriz asociados a la membrana (pero no intercelular) (70).

Interacciones Célula-Célula

Análisis morfológicos dan evidencia que las interacciones celulares ocurren entre las células estromales y hematopoyéticas. La examinación de secciones de médula o de hematopoyesis en cultivos de médula ósea a largo plazo han demostrado que están íntimamente asociadas. En estos últimos cultivos los precursores hematopoyéticos inmaduros se asocian con la capa adherente (71). Una evidencia experimental de esta interacción está basada sobre resultados con cultivos en cámara de difusión (72, 73). Las células estromales y hematopoyéticas interactúan a través de proyecciones citoplasmáticas (74), que pueden ser los sitios de adhesión de moléculas a la membrana plasmática.

Interacciones Matriz-Célula

La matriz extracelular influye en la migración, proliferación, forma y funciones metabólicas de células en desarrollo. El componente más abundante de esta matriz es el colágeno, además de la fibronectina y laminina que también son producidos por el estroma (75). Las moléculas más complejas de la matriz extracelular son los proteoglicanos, que consisten de una proteína central a la cual se unen covalentemente varios glicosaminoglicanos (76).

Experimentos en donde la matriz asociada a la membrana es digerida con heparitinasa, la habilidad de la matriz para enlazarse al factor de proliferación en las células blanco se reduce. Esto indica que el heparin sulfato, uno de los proteoglicanos sulfatos en mayor proporción presente sobre la membrana de células estromales, tiene un papel importante en el enlace al factor de proliferación. Por lo tanto, estos resultados indican posibles mecanismos para hematopoyesis que involucran: a) producción de un estímulo promotor de proliferación por células estromales, b) exportación a la superficie celular, c) captura por el heparin sulfato que se enlaza a la superficie de la membrana y d) presentación a las células hematopoyéticas "blanco" (Figura 2).

La matriz extracelular juega un papel muy importante en la regulación de la producción de células sanguíneas (77). Ciertos reportes muestran que las células hematopoyéticas pueden unirse a los componentes de ésta (78) y otras evidencias sugieren que la matriz extracelular puede liberar un estímulo proliferativo en las células hematopoyéticas. Los factores de proliferación activos se presentan en estas últimas en asociación con la membrana de células estromales (79).

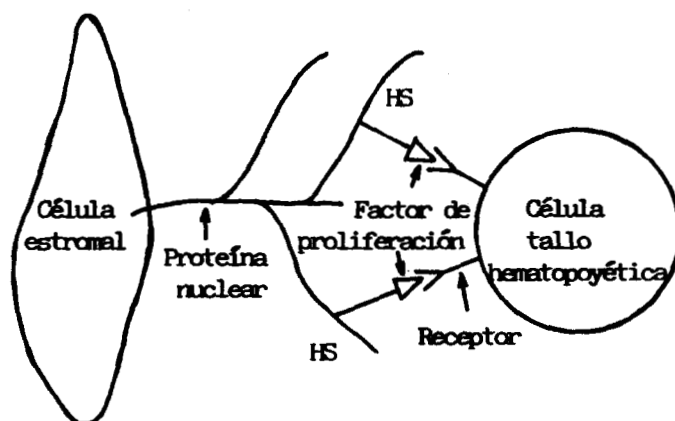


Figura 2. Representación hipotética del papel que tienen las células estromales en la presentación de factores de proliferación por elementos celulares del estroma de la médula ósea. HS, heparin sulfato. Tomado de Ref.79.

Mediadores Solubles

Es conocido que las células estromales producen múltiples factores. Así tenemos, que una fuente importante de citocinas que regulan la proliferación y diferenciación de células mieloides es el estroma (7).

Los linfocitos T, monocitos o macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, representan la mayoría de las fuentes celulares de los HGFs (80). Estudios realizados sobre tipos celulares y el microambiente estromal hematopoyético, incluyendo fibroblastos de piel humana o de pulmón embrionario, células endoteliales de cordón umbilical humano, y monocitos de sangre periférica, han mostrado que estas células secretan constitutivamente y/o expresan mRNAs que codifican para los HGFs (81). Las capas de células adherentes de cultivos de médula ósea a largo plazo tanto de ratón como de humano sin estimular, muestran la liberación de actividad estimuladora de colonias (CSA) (82). Más recientemente, ciertos clones de células estromales de ratón, han sido descritos para producir HGFs (83, 84, 85).

Ciertos estudios indican que fagocitos mononucleares, producen un factor o factores solubles que estimulan a fibroblastos (86) y células endoteliales (87) para producir CSA de macrófagos y granulocitos *in vitro*. Puesto que los monocitos pueden estimular la producción de HGFs por células fibroblásticas de médula ósea normal y debido a que los fibroblastos y células endoteliales son componentes del microambiente hematopoyético, los fagocitos mononucleares juegan un papel pivote regulador en hematopoyesis, ya que estimulan a las células del microambiente a producir HGFs (88).

Fibroblastos y células endoteliales sintetizan M-CSF constitutivamente (81, 89). Capas adherentes heterogéneas de células en cultivos a largo plazo, o líneas de células estromales producen GM-CSF

y posiblemente G-CSF (65, 90). Se ha demostrado que células estromales como las epiteliales tímicas humanas, son capaces de secretar factores de proliferación como IL-6, GM-CSF y el factor inhibidor de leucemias (LIF), lo que indica que estas células son importantes para la proliferación y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas que migran al timo (91).

Hay al menos dos factores derivados de células estromales; la IL-6 que ha sido detectada en altas concentraciones en los sobrenadantes de cultivos primarios de médula a largo plazo (aunque la mayoría es secretada por macrófagos) (92), y la IL-4 que puede actuar como un factor regulador para células progenitoras que expresan receptores para esta citocina (93, 94).

Factores linfopoyéticos también son producidos por las células estromales, como lo es la IL-7 (95), que estimula la proliferación de progenitores de células-B, al igual que la de las células-T y timocitos. Otros factores conocidos como reguladores negativos se incluyen entre los secretados por las células estromales. El TGF-beta es un potente inhibidor de algunas células hematopoyéticas (96), y hay evidencia que es secretado por algunas líneas de células estromales (6). Existen algunos factores que se enlazan a células estromales e inhiben su diferenciación (97) y factores derivados de éstas que inhiben la proliferación de células leucémicas (98).

El PDGF y el factor de proliferación de fibroblastos básico (bFGF), afectan la producción de HGFs tales como el M-CSF. Ambos tienen una amplia especificidad para un gran número de células, incluyendo fibroblastos, células endoteliales microvasculares y células de músculo de boca, resultando en su proliferación y diferenciación (99, 100, 101). El PDGF y el bFGF estimulan la inducción de los niveles del mRNA para el M-CSF y la liberación de M-CSF en una línea de células estromales TC-1 y son potentes mitógenos para estas células (102).

Por otra parte se sabe, que las células estromales tienen la habilidad de soportar la proliferación de líneas celulares dependientes de IL-3, éstas observaciones abren la posibilidad que las células estromales produzcan factores todavía no caracterizados que regulan etapas tempranas de la mielopoyesis (103).

EFFECTOS DE LOS HGFs EN CELULAS ESTROMALES

La proliferación celular, migración y síntesis de proteínas, pueden ser estimuladas por factores de proliferación que actúan sobre células responsivas, que expresan receptores para factores de proliferación específicos.

Recientemente se ha encontrado que los HGFs son capaces de estimular *in vitro* el crecimiento y función de una variedad de células no-hematopoyéticas (Ver Cuadro 2), tales como células pequeñas de carcinoma de pulmón y líneas celulares de carcinoma de ovario, fibroblastos de médula ósea normal, y células endoteliales (10, 104, 105, 106). La importancia de estos efectos *in vivo*, particularmente en el uso clínico de los HGFs después de quimioterapia para neoplasia, no han sido bien definidos.

**Cuadro 2. EFECTOS DE LOS FACTORES DE PROLIFERACION
HEMATOPOYETICOS EN CELULAS NO-HEMATOPOYETICAS**

Factor	Célula blanco	Efectos
IL-1	Hepatocitos	Induce proteínas y respuestas de fase aguda
	Mesénquima	Producción de CSFs
	Tumorales	Citostático
	Endoteliales	Estimula su actividad
	Osteoclastos	Reabsorción, estimula su actividad
IL-3	Células sinoviales	Estimula su actividad
	Células estromales	Secreción de CSFs
	Líneas celulares malignas	Proliferación
IL-4	Fibroblastos	Secreción de HGFs
IL-6	Melanoma	Proliferación
	Plasmacitomas	Soporta su proliferación
	Hibridomas	Soporta su proliferación
	Hepatocitos	Induce proteínas de fase aguda
GM-CSF	Epitelios	Proliferación
	Carcinoma de células pequeñas de pulmón	Antiproliferación y diferenciación
	Mieloma	Proliferación
	Sarcoma	Proliferación
	Cáncer de mama	Proliferación
	Líneas celulares malignas	Proliferación
G-CSF	Fibroblastos	Proliferación
	Epitelios tumorales	Proliferación
	Líneas celulares malignas	Proliferación
PDGF	Tejido conectivo	Quimioatrayente
	Fibroblastos	Síntesis de colágeno y proliferación
TNF	Cáncer de mama	Proliferación
	Células estromales	Afectan su función
	Cáncer pulmonar humano	Antiproliferación
TGF alfa, beta	Células epiteliales	Proliferación
	Cáncer pulmonar humano	Antiproliferación
IFN	Cáncer de células pequeñas de pulmón	Antiproliferación

Tomado de Ref. 190.

En células normales

El PDGF ha sido sugerido para jugar una importante función en la cicatrización de heridas. Es un potente mitógeno y quimioatrayente para células de tejido conectivo y un estimulador de síntesis de colágeno en fibroblastos, por lo que el PDGF puede contribuir a la reparación y reconstrucción del tejido conectivo. No tiene un efecto directo sobre células epiteliales normales puesto que no expresan receptores de superficie para PDGF; aunque el daño ocasionado en tejidos compuestos por estas células puede inducir la expresión de mRNAs que codifican a un mitógeno potente y su receptor (107).

El TNF, la IL-1 y la endotoxina bacteriana, que son producidos durante una respuesta inflamatoria, pueden afectar la función de células estromales. Las células endoteliales, incluyendo la línea sinusoidal de médula, pueden ser estimuladas a secretar IL-1 adicional y CSFs (56, 57, 108), y la IL-1 induce la secreción de CSFs por las células estromales (109). Otras células estromales de médula con receptores para IL-1, TNF, EGF y PDGF, pueden ser estimuladas a secretar factores que incluyen los CSFs, IL-4 e IL-6 (110, 111). Las células normales epiteliales de tráquea de rata en cultivo producen los péptidos reguladores de proliferación TGF-alfa y TGF-beta y son responsivas a ellos aumentando su proliferación (112).

La suma de factores producidos en los tejidos por células endoteliales y estromales pueden actuar solos, aditivamente o sinérgicamente sobre precursores mieloides (113).

Las respuestas de células estromales a varios mediadores, indica que los receptores para estas citocinas son expresados por las células. También es interesante el que las células estromales sean sensitivas a un gran número de citocinas que ellas secretan (110). Por ejemplo, existen reportes que el GM-CSF puede estimular la proliferación de CFU-F (Unidad formadora de colonias de fibroblastos) de médula (106). Tales mecanismos autócrinos proveen un medio para sobrerregular o suprimir una respuesta particular a través de inhibición por retroalimentación.

En células tumorales

Hasta hoy, se ha creído que los HGFs tienen especificidad restringida para células hematopoyéticas. Sin embargo, más recientemente, hay resultados que indican que los HGFs podrían tener efectos promotores del crecimiento sobre tumores sólidos, es concebible que un mecanismo autócrino o parácrino similar puede ser operable para estos factores de proliferación (114).

Ha sido postulado que células estromales tales como fibroblastos y células endoteliales, y los factores producidos por éstas, son importantes en la regulación del comportamiento de las células tumorales, tales como la inhibición de la proliferación, diferenciación, metástasis e invasión (115). Una considerable cantidad de evidencias revelan el papel de las células estromales y sus factores en la neoplasia epitelial de glándula salival (116), mamaria (117), vejiga urinaria (118) y piel (119). Ha sido descrito (120), que

fibroblastos co-inoculados con tumores epiteliales humanos aceleran su crecimiento *in vivo*. Sin embargo, los fibroblastos de pacientes con cáncer de mama se comportan anormalmente *in vitro* (121, 122). Por lo tanto, es probable que fibroblastos estromales en tejidos con cáncer afecten la proliferación, diferenciación, invasión o metástasis de células cancerosas. Por otra parte se sabe que la línea de carcinoma Shionogi es estimulada por factores de proliferación de fibroblastos (123).

Existe una fuerte relación entre las células cancerosas y estromales, ya que las células humanas cancerosas secretan factores difusibles que estimulan a fibroblastos humanos a producir factores los cuales vuelven a promover la proliferación de las primeras, creando un circuito parácrino (124). Las células de cáncer de mama humano, elaboran una variedad de factores de proliferación bajo diversas condiciones en cultivo de tejidos a largo plazo (125). Por análisis de Northern blot e hibridización *in situ*, ha sido mostrado que transcritos de sis/PDGF-beta están presentes en las células epiteliales de lesiones malignas y benignas de la mama (126). Recientemente se mostró, que las células epiteliales normales de mama humana, constitutivamente expresan cantidades significantes de PDGF-AA y poco de PDGF-BB (129). En dos líneas celulares de cáncer de mama humano (T47D y MCF-7), se obtiene acción mitogénica cuando se adiciona exógenamente PDGF (128).

Hay algunas evidencias sobre efectos en la proliferación de CSFs sobre otras células tumorales de malignidades no-hematológicas. Otros trabajos, describen enlace específico de GM-CSF a líneas celulares de cáncer de células pequeñas de pulmón (129). Se ha estudiado al GM-CSF en este tipo de células, pero que expresan marcadores de superficie para macrófagos y otras células hematopoyéticas tales como Leu-M3, Leu-7 y HLA-RD (130). En estas células el GM-CSF tuvo efectos antiproliferativos y de diferenciación, lo que se determinó por incorporación de timidina tritiada y proliferación clonal en agar. El GM-CSF también induce expresión aumentada de marcadores hematopoyéticos en estas líneas celulares. Otros investigadores (131); sin embargo, no han mostrado ningún efecto de GM-CSF sobre la proliferación clonal de las líneas de cáncer de células pequeñas de pulmón ya analizadas (130). También se sabe que el rhGM-CSF es un potente estimulador de la proliferación de células de mieloma *in vitro* por aumentar la respuesta de IL-6 en éstas células, que es el mayor factor de proliferación para células de mieloma humano y de ratón (132, 133). Aunque también se ha mostrado que el GM-CSF está involucrado en la proliferación espontánea de células de mieloma (132). Estos resultados deben tomarse en cuenta cuando se considere el uso terapéutico de GM-CSF en pacientes con mieloma múltiple.

En un trabajo reciente (106), se ha mostrado la presencia de receptores para CSFs y la capacidad proliferativa de GM-CSF sobre células de sarcoma y cáncer de mama. Estudios pioneros por otra parte, describen que líneas celulares tumorales liberan factores estimuladores para colonias hematopoyéticas mixtas (134, 135), así como G-CSF en sus sobrenadantes (136), y ha sido también hipotetizado que células tumorales productoras de CSFs podrían facilitar el proceso metastásico *in vivo* (137).

Los HGFs recombinantes humanos tales como IL-3, GM-CSF y G-CSF, puede estimular la proliferación de células clonogénicas de algunas líneas celulares malignas no-hematopoyéticas *in vitro* (10, 138). Se ha

examinado la modulación de la proliferación clonal de células de 15 líneas de cáncer pulmonar humano por co-cultivo con diferentes linfocinas recombinantes, monocinas y ciertos agentes que inducen diferenciación en otros sistemas de células malignas. Los autores describen inhibición por TNF-alfa e IFN (interferon). IL-1, IL-2 y GM-CSF no tuvieron efecto (131). En otros trabajos se han reportado efectos antiproliferativos de IFN-gamma y GM-CSF en cáncer de células pequeñas de pulmón (130).

A pesar de lo importante de los estudios clínicos con HGFs en progreso, solo se poseen escasos datos sobre la interacción de éstos con tejidos tumorales no-hematopoyéticos.

USO CLINICO DE LOS HGFs EN CELULAS MALIGNAS

El aislamiento de los cDNAs que codifican los HGFs facilita la biosíntesis de suficientes cantidades de proteína recombinante para permitir la investigación de estos agentes como herramientas terapéuticas (80).

Así, cantidades suficientes de 5 de estos factores (Epo, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3), son producidas para su uso en muestreos preclínicos. Muchos agentes citotóxicos, muestran una relación dosis-respuesta en términos de sus efectos anticáncer, pero su mayor toxicidad es la mielosupresión. Debido a la mielosupresión causada por regímenes de quimioterapia convencional, muchos pacientes requieren hospitalización con terapia prolongada de antibióticos después de la cual desarrollan septicemias y mueren. Es probable que los HGFs mieloides puedan reducir la incidencia y severidad de tales eventos, y por lo tanto, las drogas citotóxicas podrían ser dadas a mayores dosis y frecuencia de los métodos convencionales, con el objetivo de aumentar la sobrevivencia de pacientes con cáncer (139).

En general, el uso clínico de los HGFs puede ser clasificado en 4 estrategias (140):

- 1) Estimulación de la respuesta inmune para aumentar el ataque a neoplasmas (Ejemplo: IL-2).
- 2) La disminución del daño de la terapia del cáncer, la inmune y mielosupresión relacionada con el cáncer y aumento de los mecanismos no-específicos de la resistencia del hospedero (Ejemplo: GM-CSF, G-CSF, Epo).
- 3) Mejoramiento indirecto de la respuesta antitumoral y sobrevivencia al reducir toxicidad y por lo tanto, alteración de la definición de las dosis toleradas máximas de regímenes quimioterapéuticos convencionales (Ejemplo: CSFs).
- 4) Influencia directa sobre la proliferación de las células del tumor y diferenciación vía citotóxica, mecanismos citostático o regulatorio (Ejemplo: TNF).

Por lo tanto, los HGFs pueden ser particularmente usados para disminuir el efecto mielotóxico de la quimioterapia, reduciendo potencialmente la morbilidad y mortalidad del tratamiento y permitiendo la administración de dosis óptimas de quimioterapia, o para aumentar la

respuesta inmune e iniciar un ataque en contra de las células tumorales.

G-CSF

En los estudios encaminados a reducir la mielotoxicidad en la quimioterapia del cáncer, se ha mostrado un efecto benéfico consistente del G-CSF, con efectos colaterales tolerables. Una reducción en la duración de la neutropenia, fue inicialmente descrita en un pequeño grupo de pacientes con carcinoma de células pequeñas de pulmón que recibieron G-CSF después de la administración de adriamicina, ifosfamida y etópsido (141). En adición a un mejoramiento en el conteo de neutrófilos 15 días después de la quimioterapia, hay una reducción en episodios febriles, días de antibióticos y de hospitalización (142). Resultados similares se han descrito en estudios con pacientes recibiendo quimioterapia de melfalan para una gran variedad de neoplasmas (143), y en pacientes bajo combinación intensiva de quimioterapia para cáncer de vejiga (144, 145).

En cada uno de estos estudios, una reducción dosis-dependiente en la neutropenia se ha observado. El incremento de células de sangre periférica es acompañada por un aumento en la celularidad de médula ósea desde células mieloides a eritroides (145). Solamente a muy altas dosis de G-CSF se observa un incremento en el número de monocitos o linfocitos. Los neutrófilos producidos por G-CSF son principalmente células maduras con movilidad y capacidad bactericida normales (146). En estos estudios, existe una protección aparente de eventos febriles (141, 144) y una incidencia reducida de enfermedades ocasionadas por hongos (144). Un importante resultado ha sido la habilidad para librar el ciclo subsecuente de quimioterapia en todos los pacientes que reciben G-CSF en el cáncer de vejiga. En contraste, más del 70% de los controles que no reciben G-CSF fueron forzados a demorar la quimioterapia por la mielosupresión (144). Sin embargo, este resultado en el mejoramiento de la proporción de respuestas y sobrevivencia entre pacientes con cáncer que reciben G-CSF no ha sido determinado, pero los datos son alentadores con respecto a la reducción de la toxicidad producida por la quimioterapia. La preocupación teórica con respecto a si el G-CSF induce crecimiento del tumor no ha sido clínicamente evidente (80).

GM-CSF

Resultados de un ensayo de la administración de GM-CSF después de quimioterapia para sarcoma, fueron similares a los estudios realizados con G-CSF (147). El periodo de neutropenia y el intervalo entre ciclos de quimioterapia son reducidos en pacientes recibiendo GM-CSF. Sin embargo, la septicemia ocurre. Por lo tanto, aun no ha sido determinado si hay una diferencia significativa en la habilidad del GM-CSF y G-CSF para reducir la proporción de severidad de infecciones después de la

quimioterapia del cáncer. La experiencia en la respuesta hematológica cuando se administra GM-CSF es un incremento en los neutrófilos sin eosinofilia (147).

En modelos animales con tumores sólidos, tanto el G-CSF como el GM-CSF incrementan la velocidad de recuperación después de la administración de drogas citotóxicas. Estudios de laboratorio, han sugerido que unos pocos tumores sólidos y líneas celulares son moderadamente estimulados por GM-CSF; sin embargo, otros son inhibidos y algunos no se ven afectados (9, 148), aunque existen reacciones asociadas a malignidad que tienen altos niveles del factor de proliferación, presumiblemente de origen tumoral (149).

Múltiples estudios de G-CSF y GM-CSF después de quimioterapia para tumores específicos o malignidades mezcladas, sugieren un decremento en la duración de la neutropenia (147). El GM-CSF o G-CSF sin quimioterapia, generalmente resultan en un aumento dosis-dependiente en el conteo de células sanguíneas blancas y granulocitos.

El GM-CSF recombinante humano es actualmente usado para elevar los niveles circulantes de granulocitos a nivel clínico en pacientes con una variedad de desórdenes hematopoyéticos y tumores no-hematopoyéticos (150, 151). Puede actuar sobre células no-hematopoyéticas tales como células pequeñas de cáncer de pulmón (152), líneas celulares de osteosarcoma, una línea celular de cáncer de mama (9) y líneas celulares de cáncer de colon (10).

M-CSF

El M-CSF también tiene algún efecto sobre la citopenia inducida por la quimioterapia (153). El papel del M-CSF recombinante en este punto es indefinido; sin embargo, un papel diferente para el M-CSF ha sido sugerido por estudios en primates, en donde se observa un incremento en el número de monocitos y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en monocitos (154). También ha sido utilizado en líneas celulares de melanoma humano (155). El M-CSF puede por lo tanto, ser usado en la terapia del cáncer cuando se aplica en conjunción con anticuerpos monoclonales. Ciertos estudios describen a 12 pacientes con melanoma metastásico tratados con M-CSF a diferentes concentraciones. Un incremento en los monocitos de sangre periférica fue observado (156), y también un incremento en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo a través del monocito en pacientes tratados con altas dosis.

A pesar de estos resultados alentadores, los efectos antineoplásicos del rhM-CSF aun se encuentran bajo estudio.

IL-3

La IL-3 ha sido aplicada en pacientes con tumores sólidos en etapa avanzada como el carcinoma de células renales, adenocarcinoma de colon, páncreas, pulmón y mama, y todos los pacientes han respondido a la

administración de rhIL-3 con un incremento en los conteos totales de células sanguíneas blancas, aumentando el número de leucocitos de manera dosis-dependiente (157).

La introducción de rhIL-3 ha revelado posibilidades para estimular la producción de múltiples líneas celulares, pero las toxicidades y su potencial para promover efectos en tumores necesita ser cuidadosamente evaluado (155).

IL-2

IL-2 tiende a establecer la inmunoterapia como la cuarta modalidad del tratamiento del cáncer. La utilización clínica fue grandemente acelerada por la disponibilidad de IL-2 recombinante (rIL-2). El diseño de los primeros protocolos clínicos se basaron sobre investigaciones en sarcomas murinos de inmunogenicidad variable en el Instituto Nacional de Cáncer de Bethesda. El interés fue estimulado en particular por 3 reportes de respuestas objetivas en pacientes con cánceres refractarios tratados con rIL-2 con y sin células asesinas activadas por linfocinas (LAK) (158, 159, 160).

El futuro más importante de rIL-2 en la inmunomodulación es el potencial incrementado en citotoxicidad. Algunos estudios muestran la inducción de la actividad de células asesinas (NK) y particularmente actividad LAK en sangre periférica de pacientes en los que ésta actividad estaba ausente (161, 162). El uso de IL-2 sola, tiene actividad anti-cáncer en humanos. Esto ha sido observado en algunos pacientes con cánceres resistentes: melanoma maligno, carcinoma renal, sarcoma, linfoma maligno y adenocarcinomas de una variedad de sitios (colon, pulmón, mama, etc.). Se han descrito respuestas tumorales en 3 de 6 pacientes con melanoma, quienes recibieron altas dosis de rIL-2 (163). Subsecuentemente, un número de reportes de administración intravenosa de IL-2 sola, han confirmado esta actividad, principalmente en carcinoma metastásico de células renales y melanoma maligno (164, 165).

La IL-2 puede ser administrada sola localmente dada a altas concentraciones en el sitio del tumor, disminuyéndose la toxicidad de la terapia sistémica (166). También es administrada con quimioterapia (167, 168, 169), o en combinación con otros agentes biológicos como el TNF, anticuerpos monoclonales e interferones (170, 171). En muchos de estos tratamientos rIL-2, ha demostrado actividad importante en pacientes con cáncer quienes fueron resistentes previamente a todas las modalidades de tratamientos disponibles, por lo que el uso de rIL-2, da a la medicina del cáncer una nueva oportunidad para tratar malignidades previamente resistentes (172).

Desde que se ha incrementado el uso de HGFs recombinantes para reconstituir la médula ósea de pacientes con tumores que reciben quimioterapia, los efectos que modulan el crecimiento de HGFs sobre células tumorales empieza a ser de gran importancia.

Los efectos de los HGFs sobre el crecimiento tumoral *in vivo* aun no han sido determinados, pero la utilización de G-CSF o GM-CSF en

tumores sólidos, debe ser estudiada con gran detalle para poder tomar en consideración tales efectos.

H I P O T E S I S

Se sabe que las células sanguíneas son capaces de producir factores de regulación que no solo afectan la proliferación y diferenciación de ellas mismas, sino de células estromales a través de la producción de IL-1, G-CSF y PDGF, que ha sido demostrado estimulan la proliferación de fibroblastos. Por otra parte, es conocido que estos factores de regulación hematopoyética también actúan en algunas células no-hematopoyéticas de origen tumoral. Si se toma en consideración que los diferentes factores de regulación hematopoyética actúan mediante un mismo mecanismo de inducción a la proliferación de sus células blanco, se considera probable que G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3 e IL-2, puedan inducir la proliferación de epitelios y fibroblastos de origen tumoral y normal, respectivamente.

Por otra parte también es conocido que algunos factores de regulación hematopoyética no ejercen su efecto directamente, sino a través de la producción de algún factor secundario. Nuestro grupo de trabajo ha encontrado evidencias de que uno de estos factores, el G-CSF, induce la proliferación de fibroblastos de pulmón de ratón normales, y que probablemente este efecto no sea directo, ya que es inhibido por anti-PDGF. Por lo que se pretende demostrar que en fibroblastos, este efecto del G-CSF y de otros factores hematopoyéticos pueda estar mediado por el PDGF.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar el efecto de los factores de regulación hematopoyética recombinantes humanos en células no-hematopoyéticas de diverso origen.
2. Determinar si la proliferación inducida por G-CSF en fibroblastos es en forma directa o es mediada a través del PDGF.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Determinar la cinética de proliferación de los epitelios y fibroblastos de ratón y humanos.
- 1.2 Evaluar el efecto de IL-3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF e IL-2 recombinantes humanos sobre la proliferación de epitelios y fibroblastos normales y tumorales.
- 2.1 Evaluar el efecto mitogénico de G-CSF y PDGF en fibroblastos, para determinar si la proliferación inducida por G-CSF en fibroblastos es mediada por el PDGF.

M A T E R I A L Y M E T O D O

RATONES

Para la obtención de epitelios de riñón y fibroblastos de pulmón, se utilizaron ratones de la cepa CD-1 de ambos sexos entre 5 y 56 días de edad.

CELULAS EPITELIALES Y FIBROBLASTOS

Las epitelios utilizados fueron el carcinoma de vejiga humana 5637, los carcinomas de cérvix humano T3 y CaLo, el carcinoma de laringe humano HEP y la línea de hígado fetal humano WRL-68 (Ver Cuadro 3).

Por otra parte, se emplearon los fibroblastos de la línea de pulmón de ratón L-929, los fibroblastos de pulmón adulto humano CCD-16Lu, y los fibroblastos de cérvix normal humano FibCer (Ver Cuadro 3).

Cuadro 3. ESTIRPES Y LINEAS CELULARES DE EPITELIOS Y FIBROBLASTOS.

LINEA	ORIGEN	TIPO CELULAR	TUMORAL	NORMAL
5637	Vejiga humana	Epitelios	+ (carcinoma)	-
T3	Cérvix humano	Epitelios	+ (carcinoma)	-
CaLo	Cérvix humano	Epitelios	+ (carcinoma)	-
HEP	Laringe humana	Epitelios	+ (carcinoma)	-
WRL-68	Hígado fetal humano	Fibroblastos	-	+
L-929	Pulmón de ratón	Fibroblastos	-	+
CCD-16Lu	Pulmón humano	Fibroblastos	-	+
FibCer	Cérvix humano	Fibroblastos	-	+

CONDICIONES DEL CULTIVO CELULAR

Todas las células fueron cultivadas bajo una atmósfera de CO₂ al 10%, 37°C y humedad saturante. Los fibroblastos de pulmón y los epitelios de riñón de ratón, al igual que las células T3, CaLo, HEP, WRL-68 y FibCer fueron cultivadas en Medio Mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co, USA) y las células 5637, L-929 y CCD-16Lu en RPMI 1640 (Sigma); todas en presencia de Suero Fetal de Bovino (SFB) (Microlab, México) al 10%. Las células fueron cultivadas en cajas de 60 x 15 mm (Costar, USA) para su expansión y en placas de 96 micropozos (Nunc, Dinamarca) para los ensayos experimentales; para ello, se despegaron las células de las cajas de cultivo con una solución de tripsina pancreática tipo II (Sigma) al 0.1% en verseno durante 10 min y se determinó la concentración celular con una cámara de Neubauer.

OBTENCION Y CULTIVO DE EPITELIOS DE RATON

Los animales de 2 meses de edad fueron sacrificados mediante dislocación médulo-encefálica, a los más pequeños se les cortó la cabeza con unas tijeras. Posteriormente se realizaron dos incisiones dorso-laterales para extraer los riñones y una incisión ventral para extirpar los pulmones, los órganos se colocaron en cajas Petri con Solución Amortiguadora de Fosfatos (SAF) y después en un matríz Erlenmeyer agregando 20 ml de tripsina pancreática tipo II al 0.25% en SAF. Se agitó la solución utilizando una parrilla magnética durante 10 min en baño de agua a 37°C, se retiró el sobrenadante para eliminar células sanguíneas, se agregó nuevamente tripsina durante 30 min o hasta la completa disgregación del tejido. Posteriormente, la solución se pasó a través de una malla de nylon para separar el tejido no disgregado. El filtrado se colectó en un tubo conteniendo SFB para desactivar la enzima, por último fue centrifugado a 500 g durante 5 min para colectar las células. Estas fueron sembradas en cajas de cultivo de 60 x 15 mm en DMEM al 10% de SFB durante 2 días al término de los cuales se les cambió el medio de cultivo. Las células utilizadas en los ensayos experimentales fueron las de las subcultivos 1 a 3. Para ello se sembraron 5000 epitelios/pozo y 2500 fibroblastos/pozo en placas de 96 micropozos con 100 microlitros (μ l) de DMEM al 10% de SFB en presencia y ausencia de los factores de proliferación hematopoyéticos.

CINETICAS DE PROLIFERACION CELULAR

Para determinar algunos parámetros cinéticos como el tiempo de doblaje (TD) de las células utilizadas en los ensayos, se realizó una cinética de proliferación de cada tipo celular empleado.

Para ello se sembraron por quintuplicado 1200 células/pozo de las líneas 5637, T3, CaLo, HEP, WRL-68 y L-929; 2500 células/pozo de las

líneas CCD-16Lu, FibCer y fibroblastos de pulmón de ratón; y 5000 células/pozo de epitelios de riñón de ratón en 100 μ l de medio de cultivo al 10% de SFB en placas de 96 micropozos. La densidad celular fue determinada cada 24 horas durante 8 días para los epitelios y 10 días para los fibroblastos por medio de la técnica colorimétrica basada en la incorporación del colorante cristal violeta (173).

El tiempo de doblaje se determinó interpolando dos puntos en la fase exponencial de proliferación, al graficar en papel semilogarítmico los datos obtenidos para cada cinética (Apéndice I).

DETERMINACION DE LA PROLIFERACION CELULAR

La proliferación celular fue determinada por una técnica colorimétrica basada en la incorporación al núcleo de la célula del colorante cristal violeta. Esta técnica es útil para células que se adhieren a la superficie de cultivo.

Después de concluido el tiempo del cultivo celular, el medio fue decantado y se agregó a las células una solución de glutaraldehído al 1.1% en DMEM hasta cubrirlas completamente. Después de 10 min el glutaraldehído fue retirado, se lavaron las células ligeramente con agua bidestilada evitando desprenderlas y se procedió a secar las placas a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó una solución de cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6 durante 20 min en agitación, después se retiró el cristal violeta y se lavó exhaustivamente hasta retirar completamente el colorante no incorporado. Se dejó secar perfectamente. (Apéndice II).

Al momento de la evaluación, se agregaron a las células 100 μ l/pozo de ácido acético al 10% durante 20 min para remover el colorante incorporado por el núcleo celular, se resuspendió y se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad, modelo 3550). Para conocer las concentraciones celulares, los valores obtenidos fueron extrapolados en una curva patrón realizada para cada línea celular, en la que se sembraron 1000, 2000, 4000, 8000, 16000 y 32000 células/pozo, a los que se les determinaron sus valores de absorbancia correspondientes. A la línea recta obtenida, se le realizó una regresión lineal (Apéndice I).

ENSAYO CON LOS FACTORES DE PROLIFERACION HEMATOPOYETICOS

Para determinar el efecto de los factores de proliferación hematopoyéticos sobre la proliferación de las células epiteliales en la primera etapa del trabajo experimental, se utilizaron las concentraciones descritas a continuación:

Factor hematopoyético recombinate	Concentración (ng/ml)
EGF	4
G-CSF	1000
M-CSF	500
GM-CSF	1000
IL-3	2000
IL-2	100 u/ml

ng = nanogramos u = unidades ml = mililitro

En las células donde se observó un incremento sobre la proliferación, se realizaron dosis-respuesta para cada factor hematopoyético utilizando las siguientes concentraciones:

Factor hematopoyético recombinate	Concentración (ng/ml)
G-CSF	1, 10, 100 y 1000
M-CSF	0.5, 5, 50 y 500
GM-CSF	1, 10, 100 y 1000
IL-3	2, 20, 200 y 2000
IL-2	1, 10, 100 y 1000 u/ml

Teniendo en cuenta las concentraciones óptimas obtenidas con los epitelios, en la segunda etapa del trabajo en donde se evaluó el efecto de los HGFs sobre la proliferación de fibroblastos, se emplearon además otros factores hematopoyéticos y las siguientes concentraciones:

Factor hematopoyético recombinate	Concentración (ng/ml)
EGF	4
G-CSF	5
M-CSF	5
GM-CSF	10
IL-3	200
IL-2	10 u/ml
PDGF	3
aPDGF	20000

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y por lo menos 2 veces de manera independiente.

ANALISIS ESTADISTICO

Con la finalidad de que el error obtenido en los experimentos no fuera mayor al 10%, se determinó el coeficiente de variación de los datos (174). (Apéndice III).

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó la prueba de t de Student (175), por medio de la cual se comparan las medias y las desviaciones normales de grupos de datos para determinar si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas. En este caso, se comparó el valor del control negativo (-) (sin inductor), con el obtenido con el inductor (con factor hematopoyético), y se tomó una probabilidad significativa de $P < 0.05$ y muy significativa de $p < 0.01$, valor que representa la probabilidad de que la diferencia entre las muestras sea debida al azar. (Apéndice III).

Por otra parte, para la determinación de la proliferación celular, se realizó una regresión lineal de las curvas patrón obtenidas previamente, y para determinar el tiempo de doblaje de las células se obtuvo el logaritmo de las concentraciones celulares correspondientes a las cinéticas de proliferación (176) (Apéndice I).

RESULTADOS**COEFICIENTE DE VARIACION**

El coeficiente de variación (CV) (**Apéndice III**), que relaciona la media y la desviación estándar, se determinó con el objetivo de obtener la variabilidad existente entre el número de pozos sembrados en cada ensayo. Por su fácil proliferación *in vitro*, se utilizó a la línea L-929 como modelo, se sembró diferente número de pozos con 10000 células cada uno y una vez adheridas a la superficie de cultivo, las células fueron fijadas, se determinaron las absorbancias, los números celulares y el CV correspondiente (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Determinación del coeficiente de variación en la línea fibroblástica L-929.

Número de pozos sembrados	Coeficiente de Variación (CV)
2	11.15 %
3	9.05 %
5	8.59 %
10	4.84 %

Para la realización de este trabajo se consideró pertinente una variación entre los ensayos menor al 10 %. Se encontró que el número mínimo de pozos para obtener estas condiciones fue de 3, por lo que todos los experimentos se realizaron por triplicado.

CURVAS PATRON

Para determinar la pertinencia de evaluar la proliferación celular por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta, se determinó el coeficiente de correlación (r) (**Apéndice I**) en curvas patrón con números celulares conocidos y sus respectivas absorbancias. Se evaluaron asimismo los valores de A y B en la recta de ajuste mediante la fórmula $y = A + Bx$, en donde los valores de "y" corresponden al número celular, y los de "x" a la absorbancia. Se muestran los valores de A, B y r para cada curva patrón, obteniéndose una muy alta correlación, y por lo tanto, alta confiabilidad en la técnica de evaluación (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Valores de correlación obtenidos de las curvas patrón de los epitelios y fibroblastos.

Células	Coeficiente de correlación (r)	Término constante (A)	Coeficiente de regresión (B)
WRL-68	0.998	-196.68	71709.6
HEP	0.997	595.96	58777.65
5637	0.995	-1022.79	45276.0
CaLo	0.973	1677.78	41818.06
T3	0.990	-2356.51	79854.12
L-929	0.999	-732.91	84036.79
FibCer	0.990	1005.42	115388.82
CCD-16Lu	0.996	321.66	49658.49
Epitelio de ratón	0.999	-3300.49	23998.07
Fibroblasto de ratón	0.994	-1891.43	15139.81

CINETICAS DE PROLIFERACION

Para conocer algunos parámetros cinéticos tales como el tiempo de duplicación (TD), la densidad de saturación (DS) y el tiempo en que el número celular alcanza la mitad del valor de DS ($(TDS_{\frac{1}{2}})$) en nuestras condiciones de cultivo, se realizaron las cinéticas de proliferación de todos los tipos celulares (Cuadro 6). Se utilizó el $TDS_{\frac{1}{2}}$ como el tiempo adecuado para evaluar el efecto que sobre la proliferación celular pudieran tener los diferentes HGFs, pues las células se encuentran en su fase exponencial sin haber llegado todavía a saturación.

EFFECTO DE LOS HGFs SOBRE LA PROLIFERACION DE EPITELIOS

Para conocer el efecto de los HGFs sobre la proliferación de células de origen no-hematopoyético, se cultivaron epitelios de procedencia humana como la línea de hígado fetal WRL-68, el carcinoma de laringe HEP, los carcinomas de cérvix T3 y CaLo y el carcinoma de vejiga 5637, en presencia de G-CSF, M-CSF, GM-CSF e IL-3. EGF se empleó como control positivo debido a su efecto proliferador descrito sobre epitelios (177), y por otra parte se realizó un ensayo sin factor como control negativo.

Las concentraciones utilizadas para todos los factores se describen en el apartado de material y métodos.

Los resultados demuestran que en las células WRL-68, HEP y T3, ninguno de los factores utilizados tuvo efecto inductor a la proliferación (Figuras 3, 4, 5). Sin embargo, en las células 5637, se

observó aumento en la proliferación con G-CSF e IL-3 con una significancia estadística de $P < 0.01$ y con GM-CSF con una $P < 0.05$ (Figura 6). Debido a que esta línea se vio estimulada en su proliferación al ser cultivada con los HGFs y con la finalidad de evaluar dosis-respuesta, se utilizaron 4 concentraciones diferentes de IL-3, GM-CSF, M-CSF y G-CSF. Se observó que también el M-CSF induce la proliferación y que las concentraciones óptimas de activación son de 20, 10, 5 y 1 ng/ml para IL-3, GM-CSF, M-CSF y G-CSF, respectivamente, con una $P < 0.01$ (Figura 7).

En las células CaLo, se observó un fenómeno similar al de la línea 5637, ya que todos los HGFs indujeron su proliferación (Figura 8). Se realizaron dosis-respuesta con los mismos factores y a las mismas concentraciones utilizadas para 5637, encontrándose concentraciones óptimas de 20, 1, 5 y 5 ng/ml para IL-3, GM-CSF, M-CSF y G-CSF, respectivamente. Las concentraciones utilizadas para todos los factores fueron estadísticamente significativas con $P < 0.05$ (Figura 9).

Por último cabe mencionar que el EGF no resultó ser un buen inductor para los epitelios tumorales, ya que en ningún caso mostró tener efecto mitogénico.

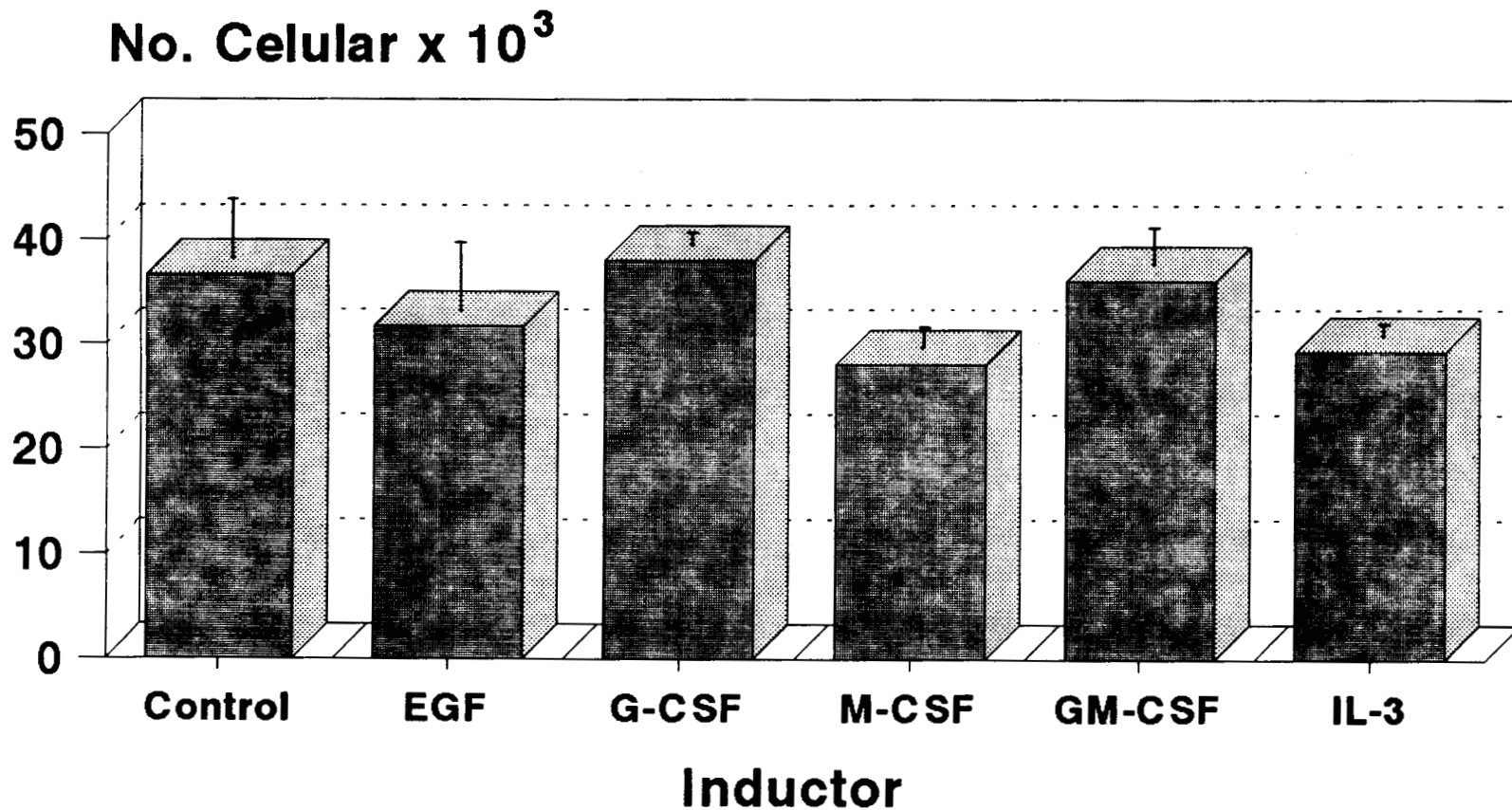
Para evaluar el posible efecto inductor de los HGFs sobre epitelios normales, se utilizaron epitelios de riñón de ratón en cultivos primarios entre los pasajes 1 y 2, bajo las mismas condiciones empleadas para las líneas de epitelios tumorales. En este caso el EGF fue el inductor más potente, aunque también el G-CSF y M-CSF con $P < 0.01$, y el GM-CSF y la IL-3 con $P < 0.05$ (Figura 10).

Cuadro 6. Parámetros obtenidos en las cinéticas de proliferación para los epitelios y fibroblastos.

Células	Número inicial de células/pozo	TD (hrs)	DS (células)	TDS $\frac{1}{2}$ (días)
WRL-68	1200	35.63	59124	5
HEP	1200	44.67	34023	4-5
5637	1200	29.25	23634	4
CaLo	1200	29.88	45692	3
T3	1200	36.28	61127	4-5
L-929	1200	27.96	118767	5
FibCer	2500	56.02	39159	4
CCD-16Lu	2500	54.15	38479	6
Epitelio de ratón	5000	57.65	21824	3
Fibroblasto de ratón	2500	47.68	9418	5

Figura 3

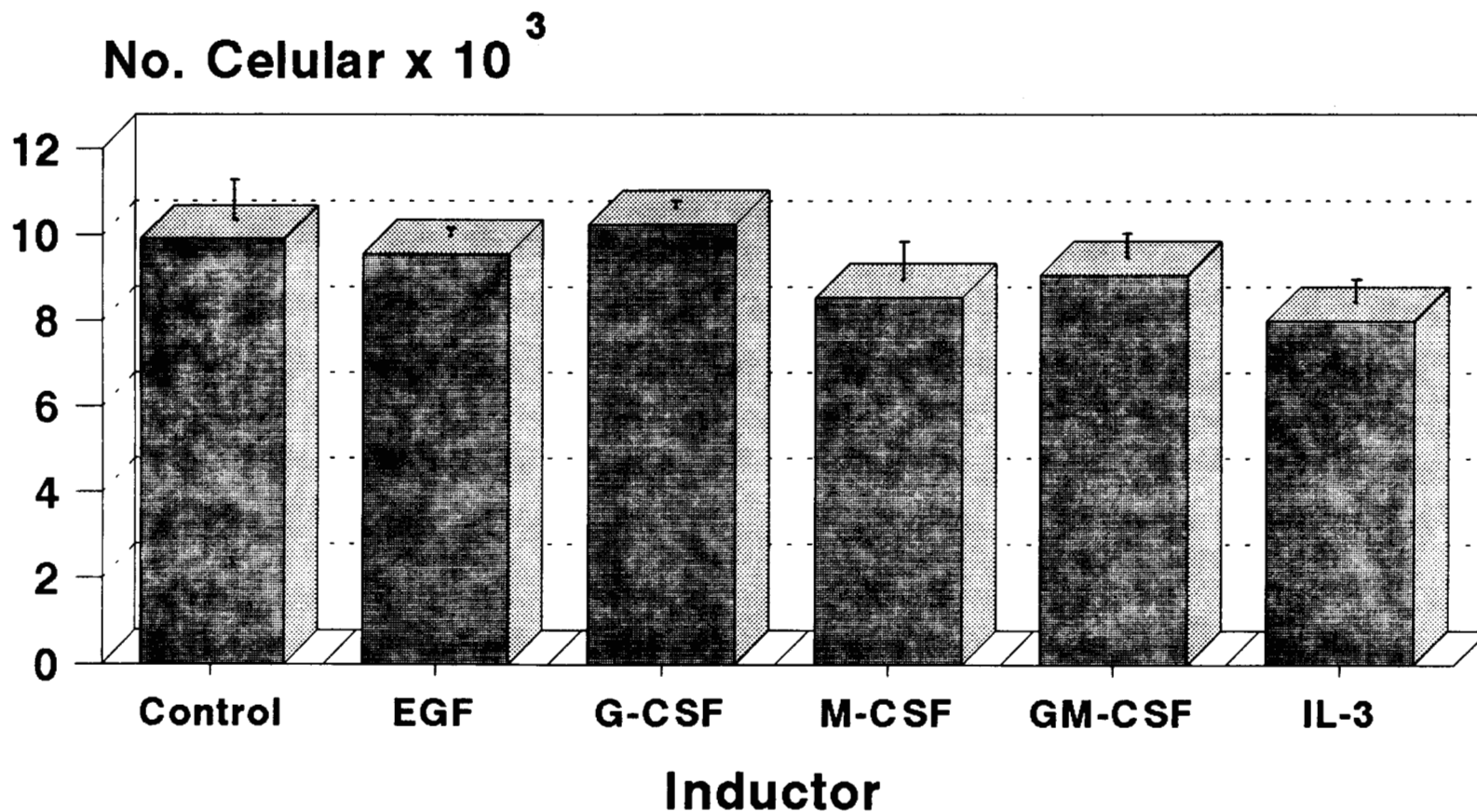
EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA CELULAR WRL-68



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
No hubo diferencias estadísticamente significativas.
Se sembraron 1200 células/pozo en DMEM al 10% de SFB durante 5 días.

Figura 4

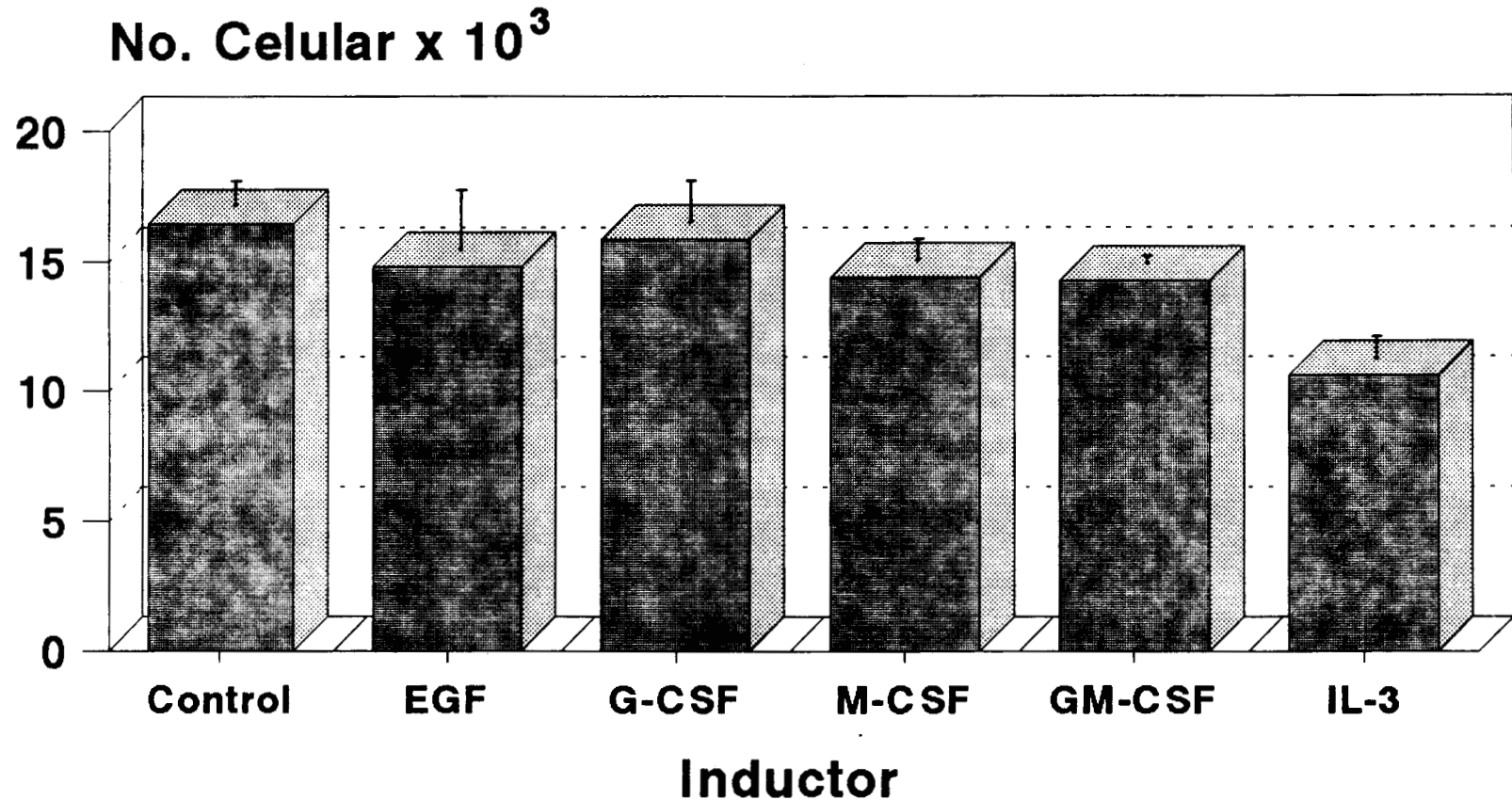
EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA CELULAR HEP



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
No hubo diferencias estadísticamente significativas.
Se sembraron 1200 células/pozo en DMEM al 10% de SFB durante 4 días.

Figura 5

EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE LAS CELULAS T3



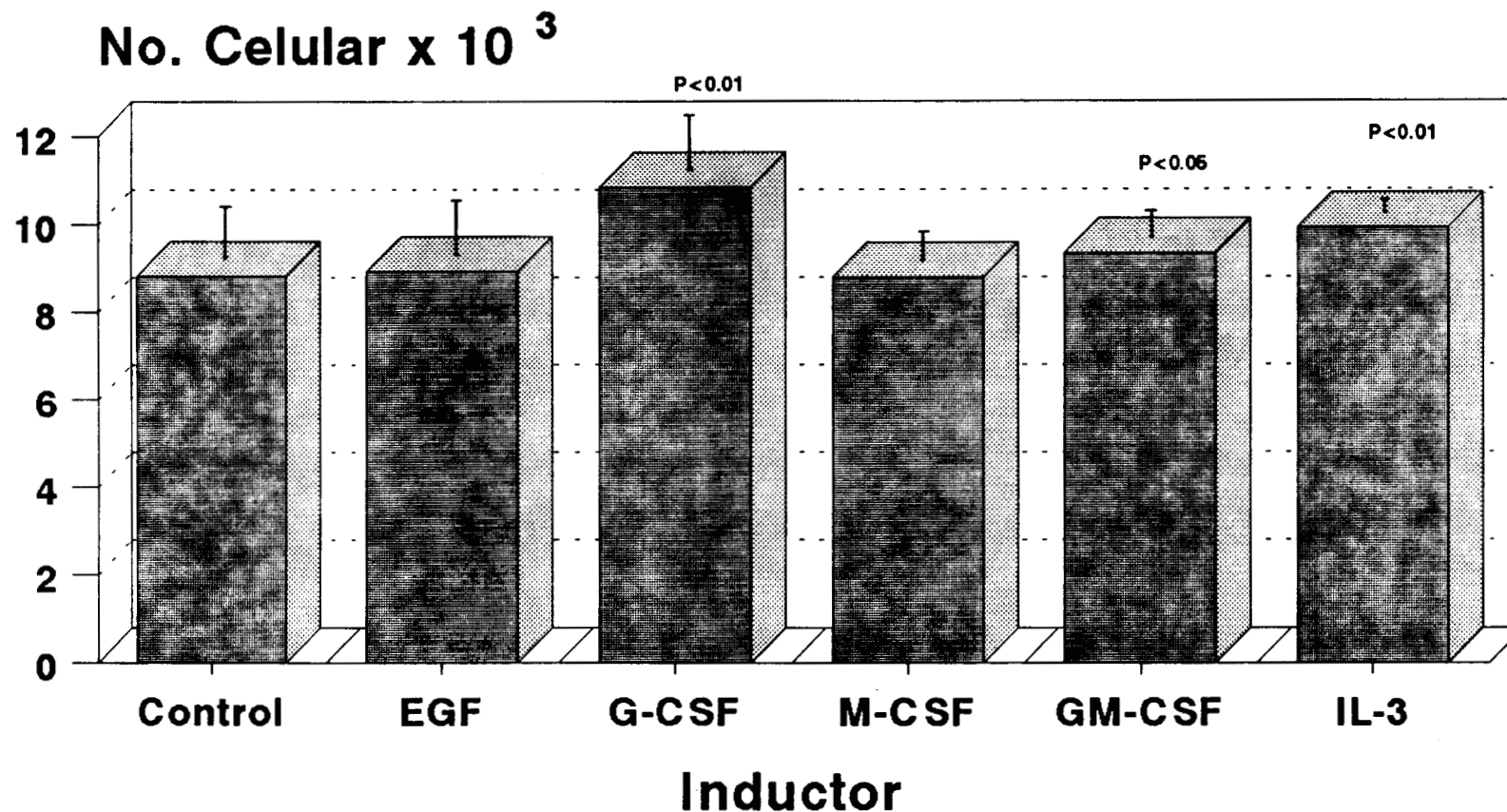
Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.

No hubo diferencias estadísticamente significativas.

Se sembraron 1200 células/pozo en DMEM al 10% de SFB durante 4 días.

Figura 6

EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA CELULAR 5637



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con P < 0.05 y P < 0.01.
Se sembraron 1200 células/pozo en RPMI al 10% de SFB durante 4 días.

Figura 7

DOSIS-RESPUESTA DE LOS HGFs EN LAS CELULAS 5637

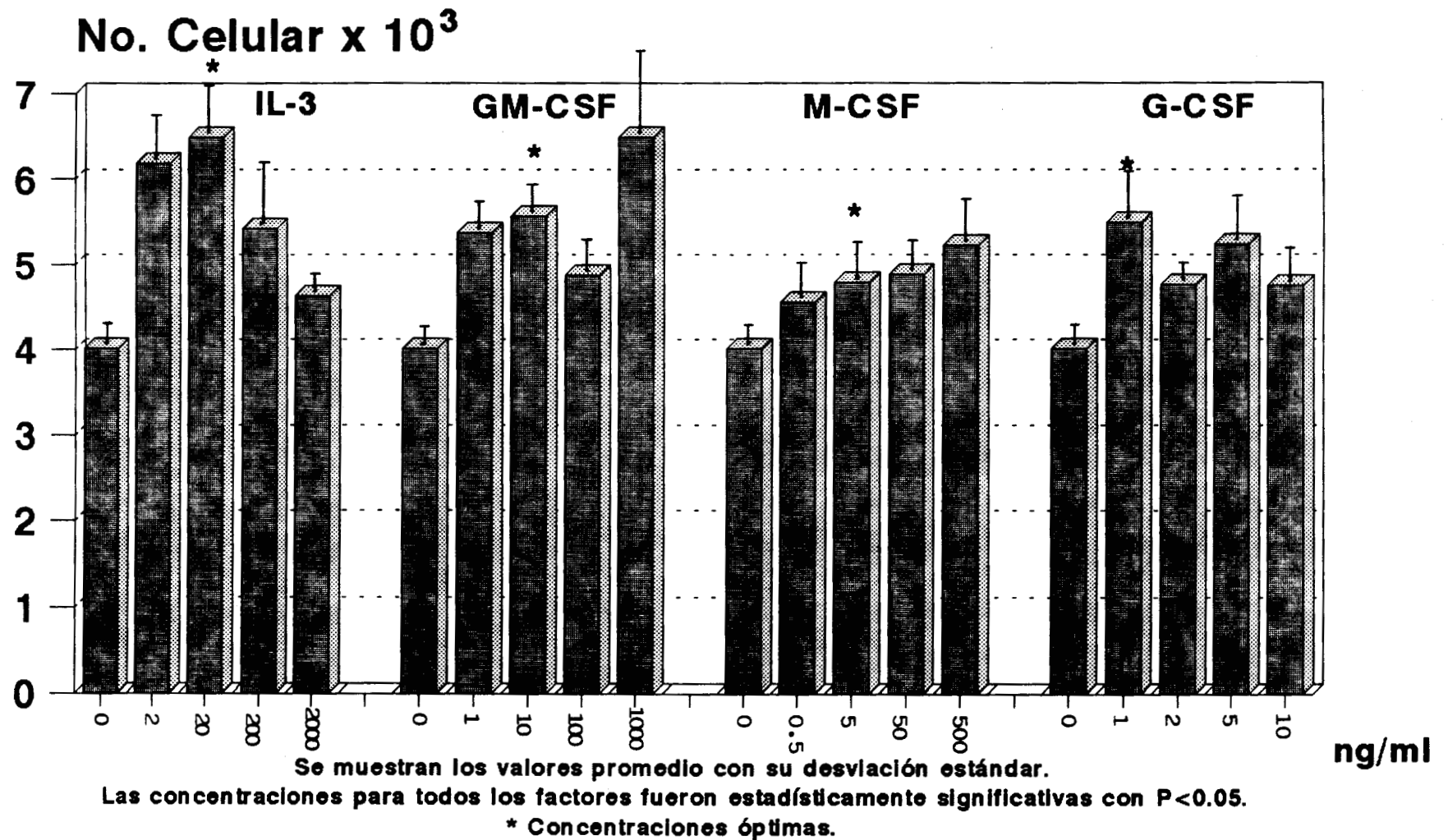
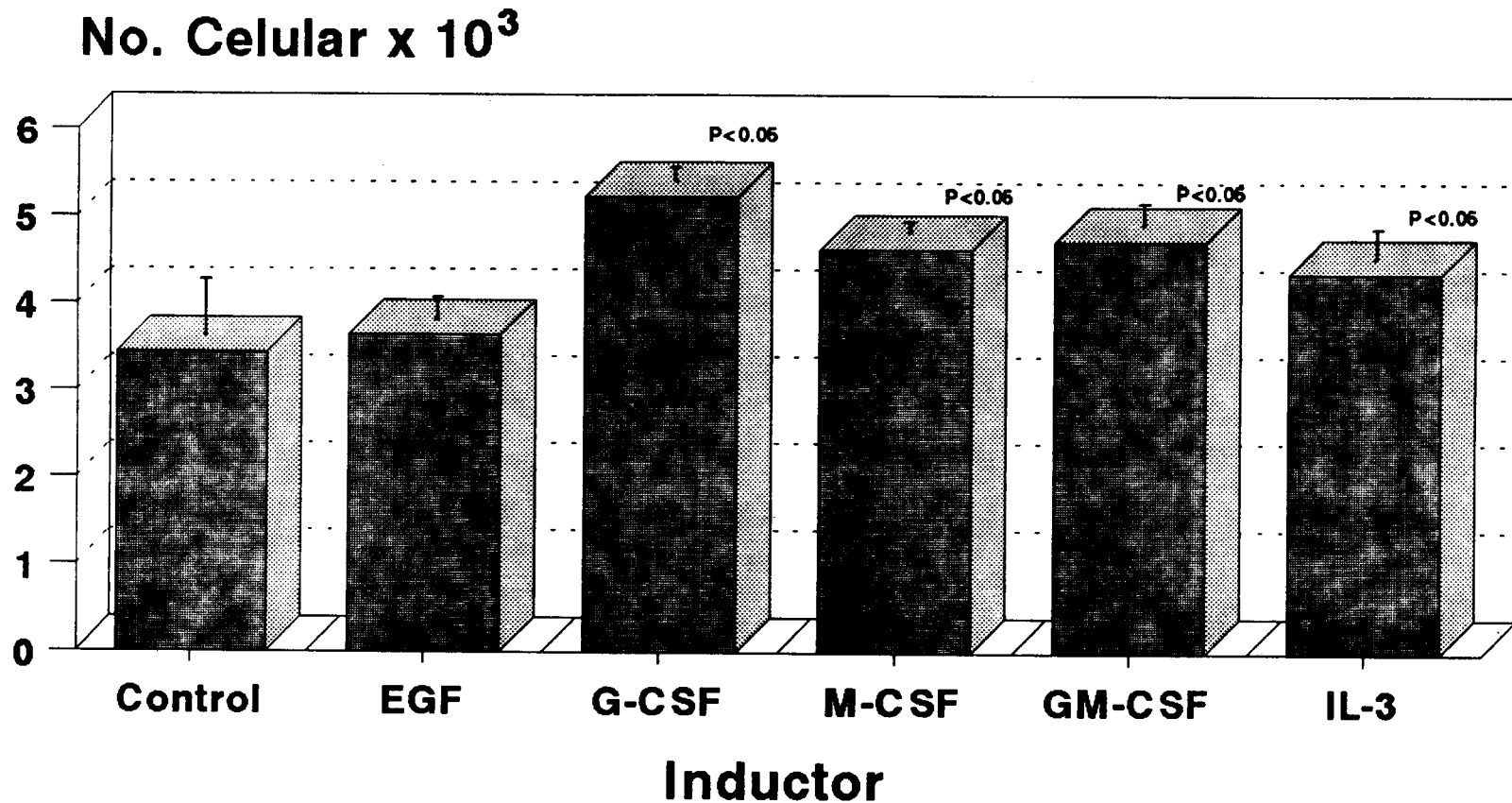


Figura 8

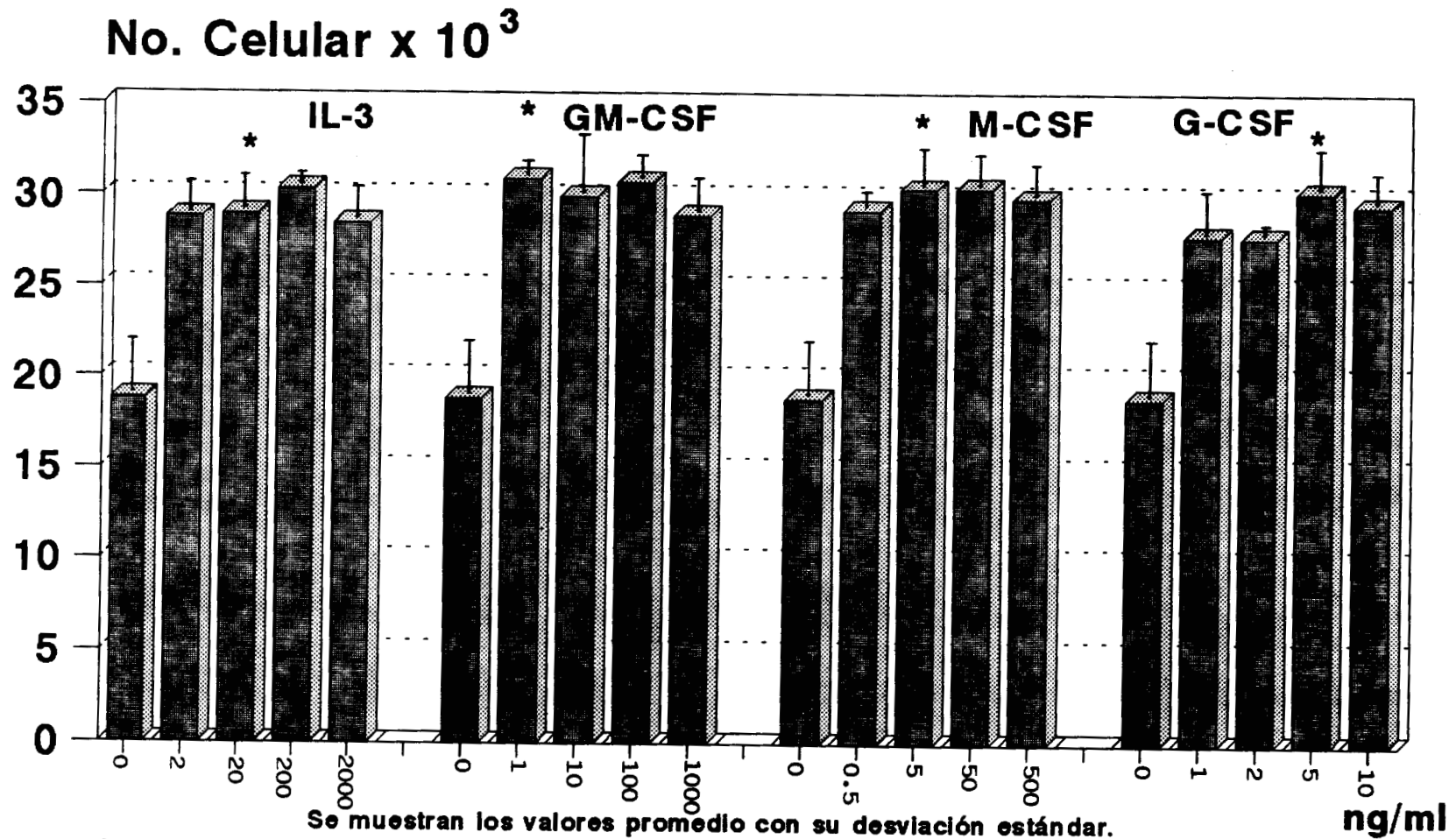
EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE LAS CELULAS CaLo



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con P < 0.05 y P < 0.01.
Se sembraron 1200 células/pozo al 10% de SFB durante 3 días.

Figura 9

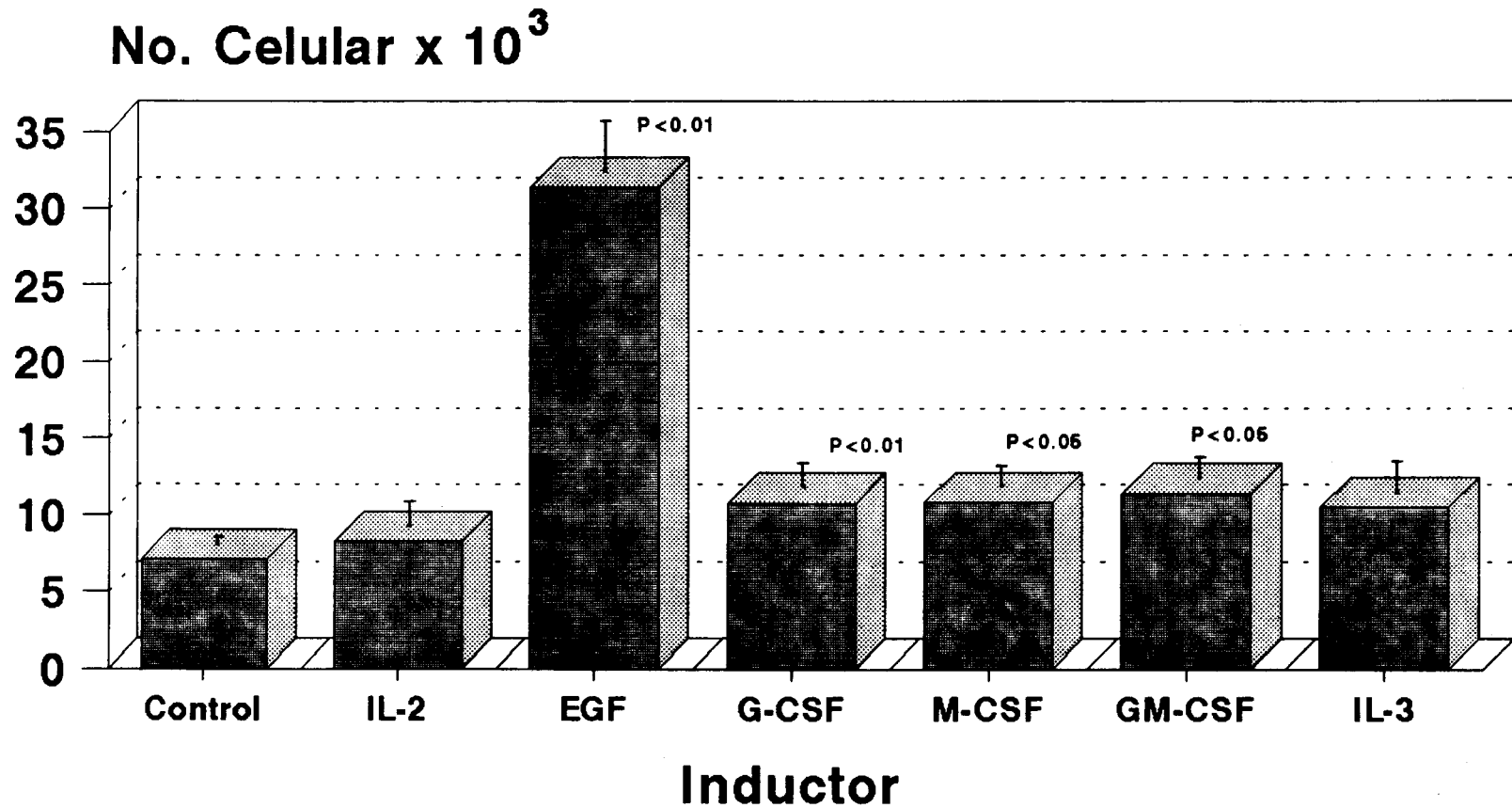
DOSIS-RESPUESTA DE LOS HGFs EN LAS CELULAS CaLo



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Las concentraciones para todos los factores fueron estadísticamente significativas con $P < 0.05$.
* Concentraciones óptimas.

Figura 10

EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE EPITELIOS DE RIÑON DE RATON



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con $P < 0.05$ y $P < 0.01$.
Se sembraron 5000 células/pozo en DMEM al 10% de SFB durante 3 días.

EFEECTO DE IL-2 SOBRE LA PROLIFERACION DE EPITELIOS

Debido a que IL-2 esta siendo actualmente empleada en la terapia de pacientes con cáncer, se consideró pertinente evaluar si este HGF inducía la proliferación de epitelios tumorales y normales. Se observó que IL-2 (100 u/ml) estimula fuertemente la proliferación de las células CaLo y en menor proporción las 5637 con $P < 0.01$ (Figura 11). En las células normales de ratón y en las demás células tumorales no mostró inducción. Para determinar la dosis-respuesta a este inductor se emplearon diferentes concentraciones de IL-2. Para ambos tipos celulares se obtuvo una concentración óptima de activación de 10 u/ml, aunque todas las concentraciones mostraron diferencia significativa con $P < 0.05$ (Figura 12).

EFEECTO DE LOS HGFs SOBRE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS

Dado que en dos líneas de epitelios se observó un efecto mitogénico de los HGFs, se procedió a evaluar si también pudieran tener actividad proliferativa en otro tipo de células no-hematopoyéticas. En este caso se usaron los fibroblastos de cérvix normal humano FibCer, los fibroblastos de pulmón de ratón L-929 y de pulmón adulto humano CCD-16Lu; además se emplearon fibroblastos normales de pulmón de ratón en cultivos primarios. En todos los ensayos se agregó un cultivo con IL-2 como control recombinante negativo ya que no existen datos de que presente algún efecto sobre la proliferación de fibroblastos, así como EGF y G-CSF como controles positivos pues es conocido que inducen la proliferación en fibroblastos (11, 177), además de M-CSF, GM-CSF e IL-3 y un control sin HGFs.

Todas las concentraciones de los factores se describen en el apartado de material y métodos.

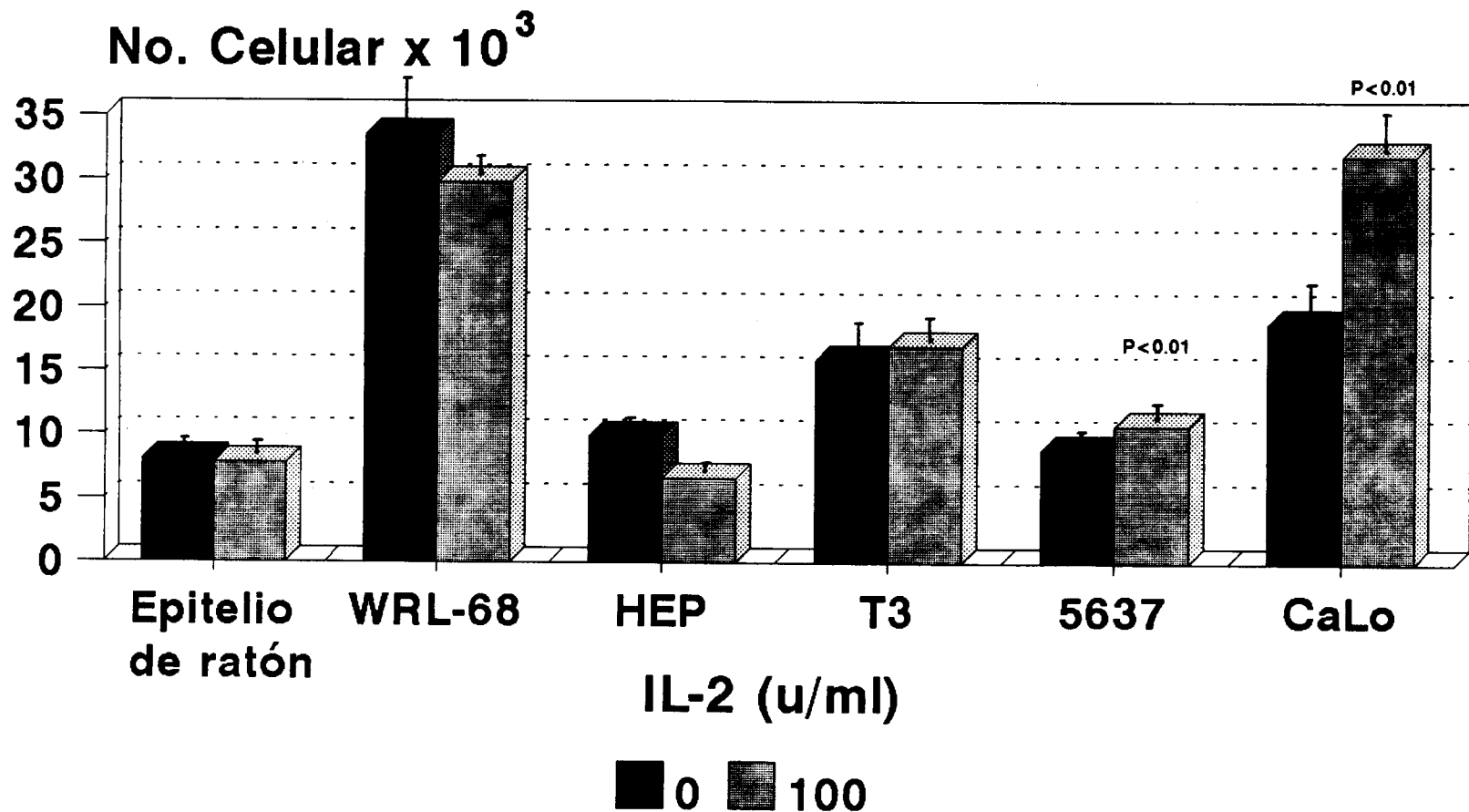
Para las células FibCer, ninguno de los HGFs mostró efecto sobre la proliferación (Figura 13), mientras que en las células L-929, el G-CSF indujo su proliferación con $P < 0.05$ y M-CSF, GM-CSF e IL-3 con $P < 0.05$ (Figura 14). Se evaluó la dosis-respuesta con IL-3, GM-CSF, M-CSF y G-CSF a 4 diferentes concentraciones de cada factor, encontrándose que la IL-3 induce proliferación únicamente a la concentración de 20 ng/ml con $P < 0.05$. Por otra parte, las concentraciones óptimas para GM-CSF, M-CSF y G-CSF, respectivamente, son de 10, 5 y 2 ng/ml con $P < 0.01$ (Figura 15). En ambos tipos celulares, el EGF no resultó tener un efecto mitogénico.

En la línea CCD-16Lu los más potentes inductores de la proliferación fueron el EGF y el PDGF con $P < 0.01$, y los menos potentes el M-CSF, GM-CSF e IL-3 con $P < 0.05$ (Figura 16).

En fibroblastos normales de pulmón de ratón el EGF, GM-CSF y PDGF, fueron los inductores más potentes con $P < 0.01$, y los factores más débiles en su efecto fueron el G-CSF, M-CSF e IL-3 con $P < 0.05$ (Figura 17).

Figura 11

EFFECTO DE IL-2 EN LA PROLIFERACION DE EPITELIOS NORMALES Y TUMORALES



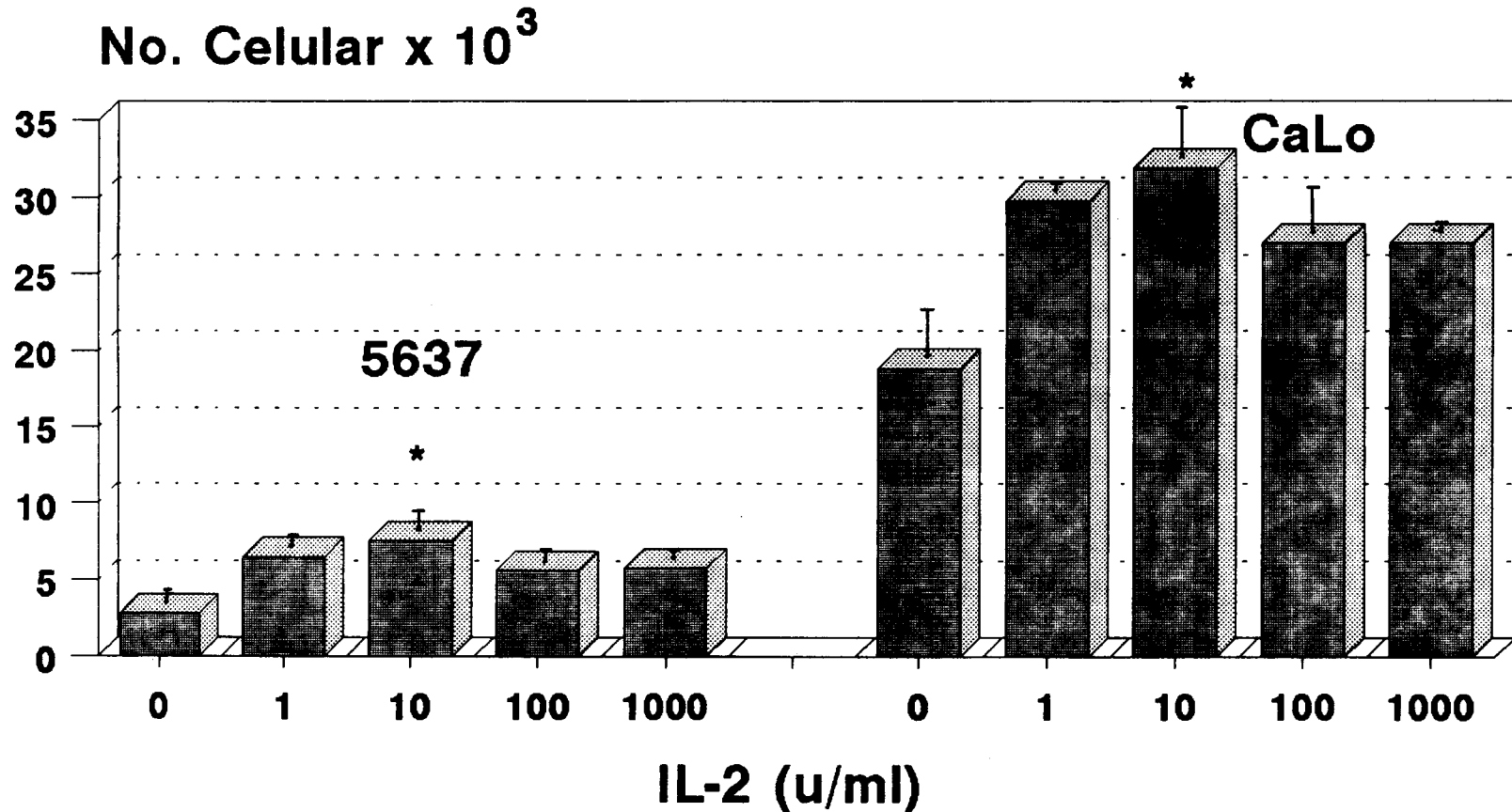
Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.

Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con P < 0.05 y P < 0.01.

Se sembraron 5000 y 1200 células/pozo para epitelios normales y tumorales, respectivamente, en DMEM.

Figura 12

DOSIS-RESPUESTA DE IL-2 EN LAS CELULAS 5637 Y CaLo

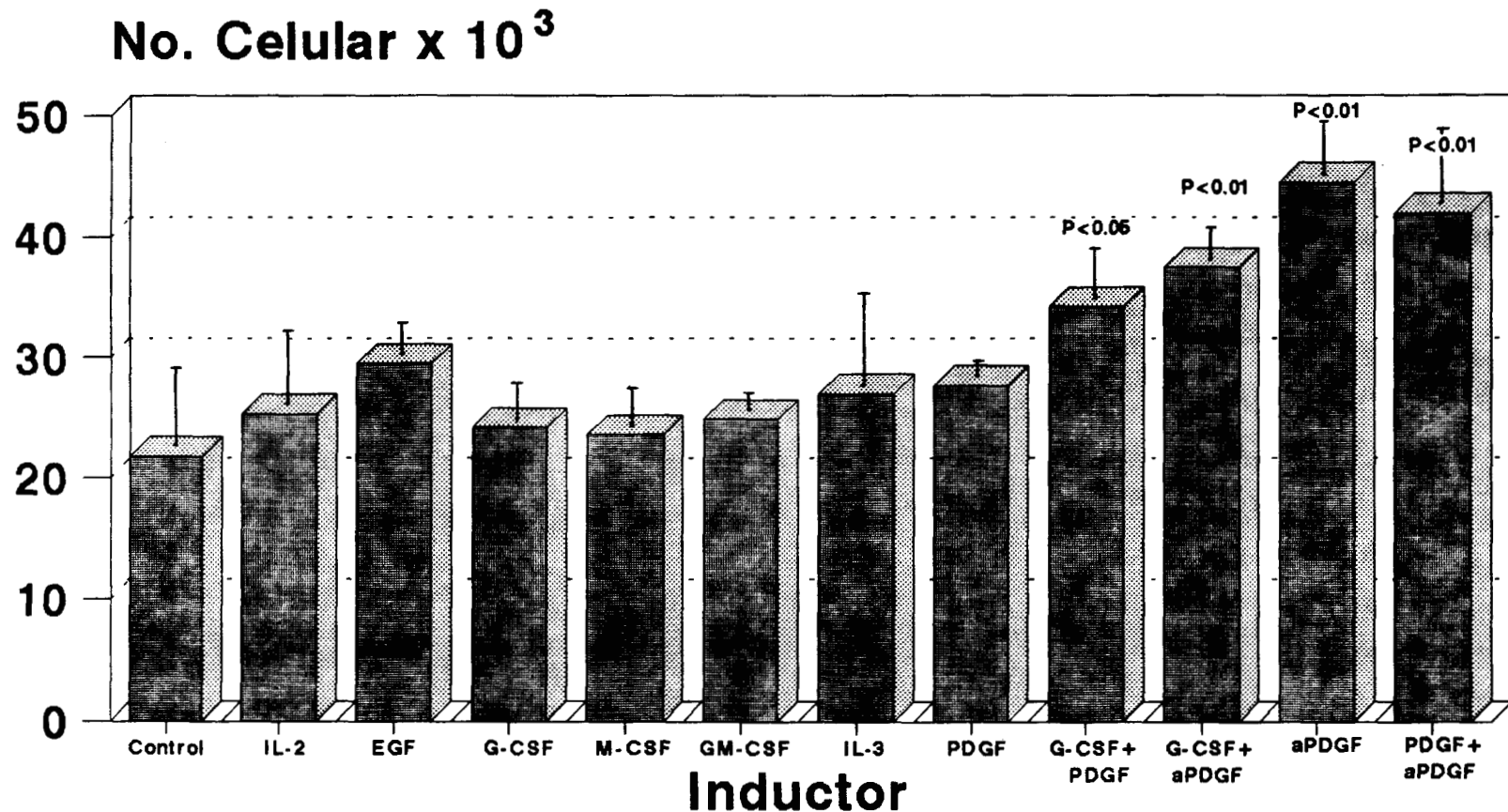


Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Todas las concentraciones para 5637 y CaLo fueron estadísticamente significativas con $P < 0.05$.

* Concentraciones óptimas

Figura 13

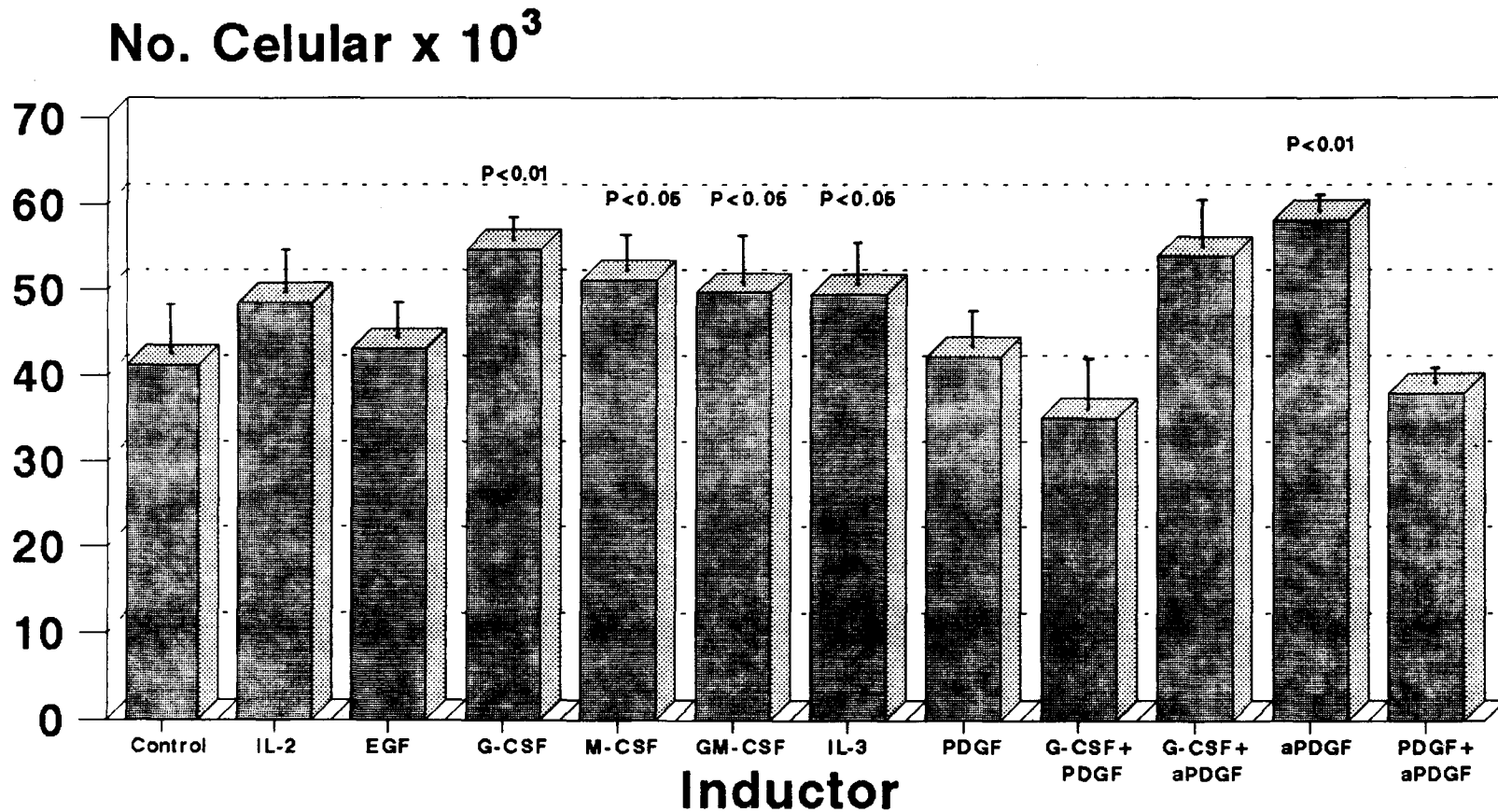
EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE LAS CELULAS FibCer



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con P<0.05 y P<0.01.
Se sembraron 2500 células/pozo en DMEM al 10% de SFB durante 4 días.

Figura 14

EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA CELULAR L-929



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Los diferencias estadísticamente significativas se señalan con P < 0.05 y P < 0.01.
Se sembraron 1200 células/pozo en RPMI al 10% de SFB durante 5 días.

Figura 15

DOSIS-RESPUESTA DE LOS HGFS EN LA LINEA CELULAR L-929

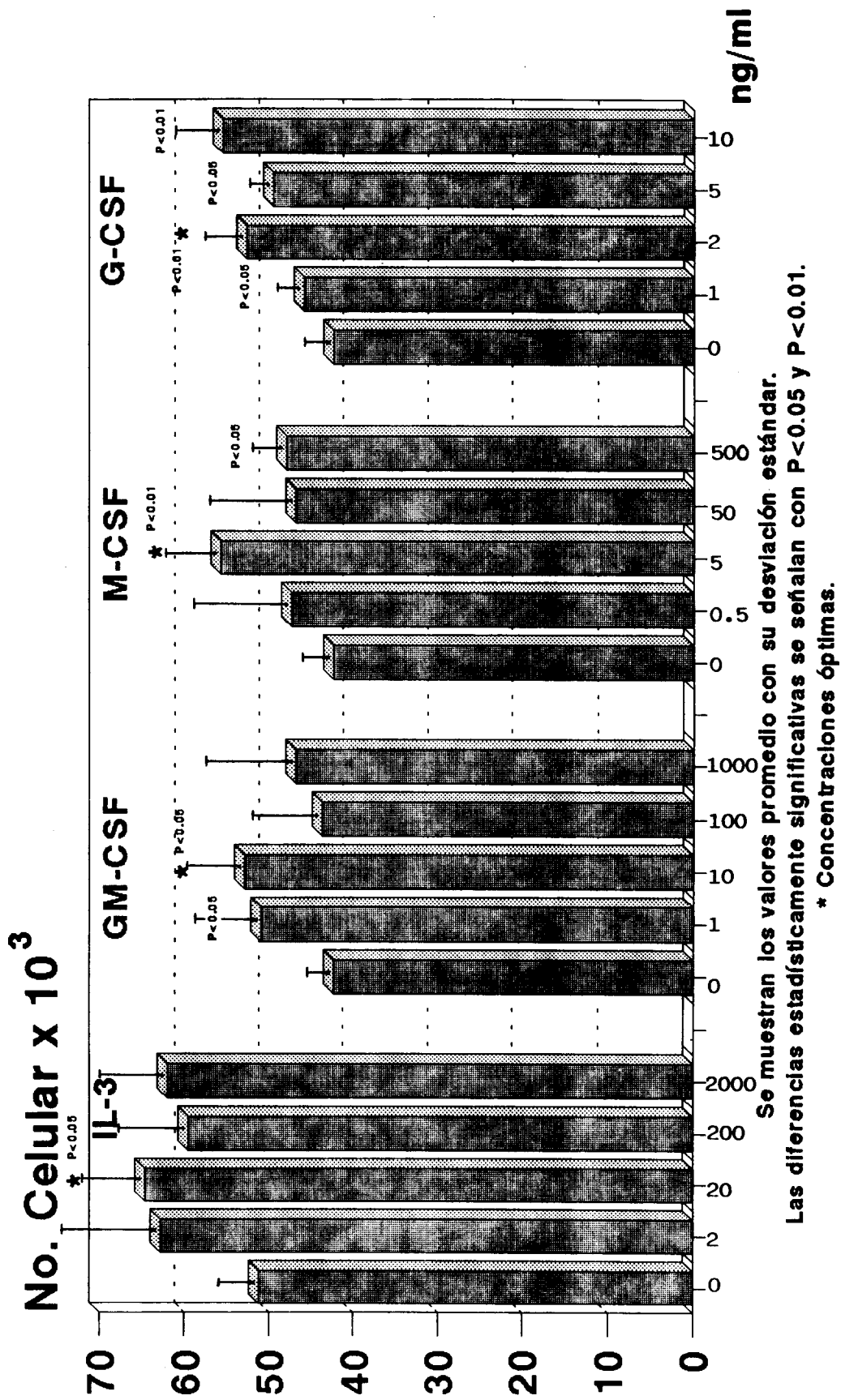
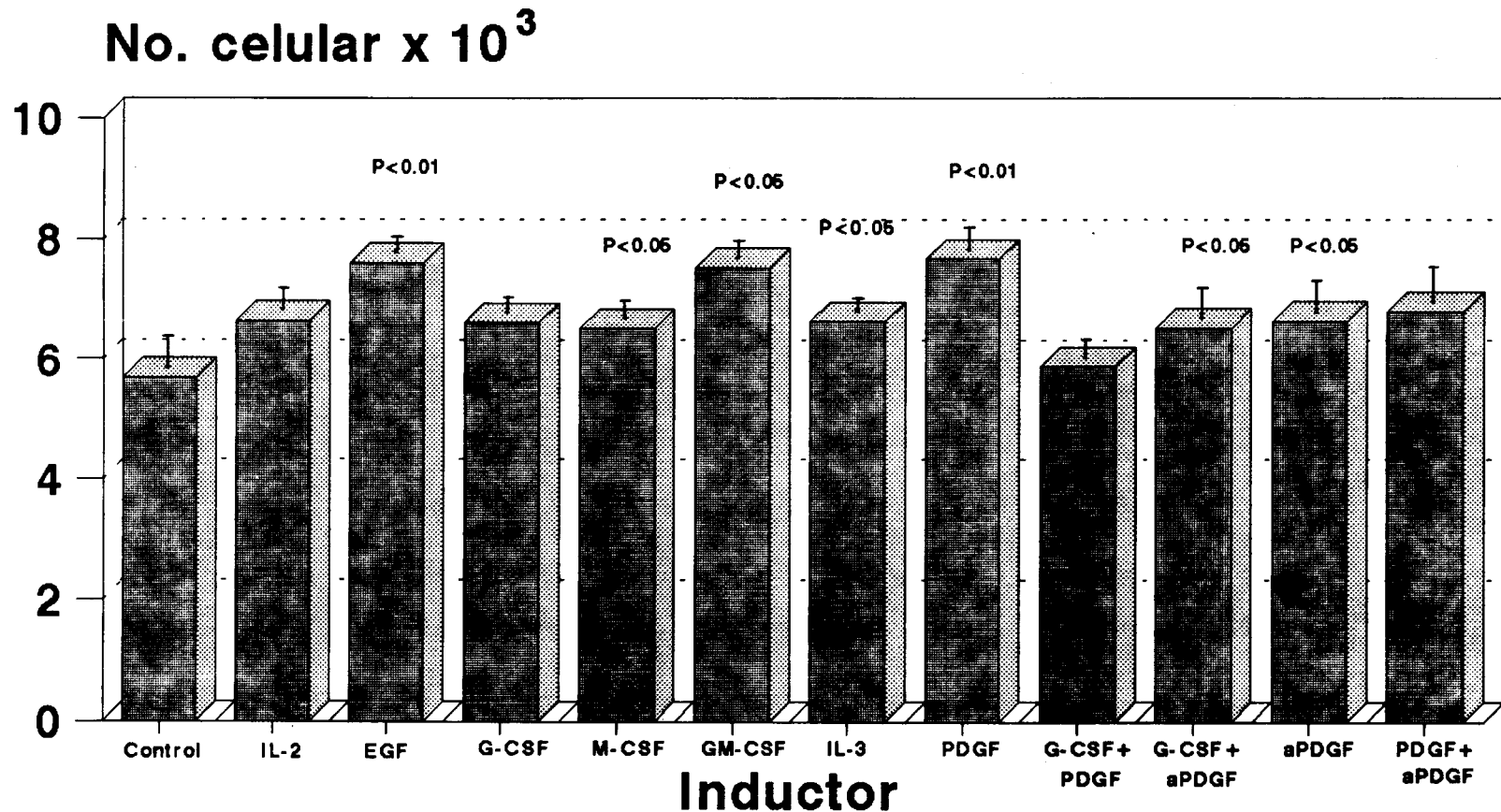


Figura 16

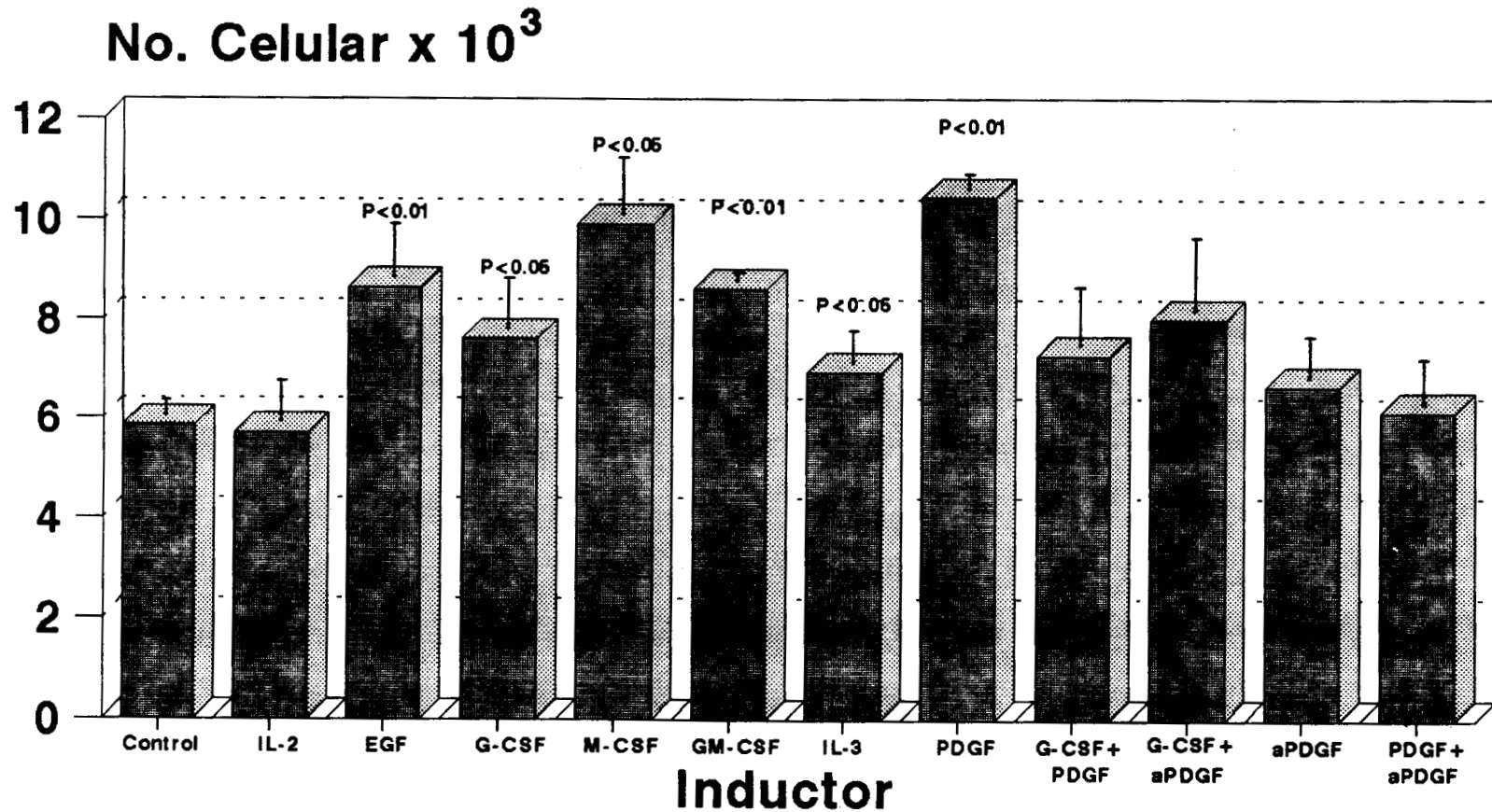
EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA CELULAR CCD-16Lu



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con P<0.05 y P<0.01.
Se sembraron 2500 células/pozo en RPMI al 10% de SFB durante 5 días.

Figura 17

EFFECTO DE LOS HGFs EN LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS DE PULMON DE RATON



Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con P<0.05 y P<0.01.
Se sembraron 2500 células/pozo en DMEM al 10% de SFB durante 6 días.

EFFECTO DEL PDGF Y G-CSF SOBRE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS

Datos obtenidos en nuestro laboratorio, indican que probablemente el efecto proliferador que tiene el G-CSF sobre fibroblastos de pulmón de ratón, no sea directo, sino que está mediado a través del PDGF, ya que al adicionar aPDGF (un anticuerpo monoclonal dirigido contra PDGF) a cultivos de fibroblastos en donde se encontraba presente el G-CSF se abatía la proliferación. Por ello en este trabajo, se cultivaron todas los fibroblastos con G-CSF, PDGF, G-CSF + PDGF, G-CSF + aPDGF, PDGF + aPDGF y con el anticuerpo solo con la finalidad de determinar si el aPDGF era capaz de inhibir la proliferación inducida por el G-CSF en las diversas líneas de fibroblastos.

Cuando las células FibCer se cultivaron con G-CSF y PDGF juntos, se observó un aumento en la proliferación con una diferencia estadísticamente significativa de $P < 0.05$ y mayor a la obtenida con los factores por separado. Es de llamar la atención que el aPDGF mostró ser un potente mitógeno para este tipo de células con $P < 0.01$ (Figura 13). Es importante mencionar que en todos los cultivos en donde se encontraba presente este anticuerpo, se observó una notable inducción a proliferación celular (Figura 13).

Al igual que en las células FibCer, en L-929 el aPDGF resultó ser uno de los mitógenos más potentes con $P < 0.01$ cuando se utilizó solo (Figura 14), mientras que en fibroblastos de pulmón de ratón el aPDGF no tuvo efecto alguno sobre la proliferación (Figura 17).

En la línea celular CCD-16Lu se observó un aumento en la proliferación cuando se adicionaron G-CSF y aPDGF juntos con $P < 0.05$ (Figura 16).

Es interesante hacer notar que las células que se vieron estimuladas con PDGF no lo hicieron en presencia de aPDGF, y que en las células que no mostraron efecto con PDGF, el aPDGF resultó ser un potente mitógeno.

Aunque en cada tipo celular se realizaron por lo menos dos ensayos de manera independiente, en todas las figuras se muestra solamente al más representativo (con las medias y las desviaciones estándar), debido a que el comportamiento celular en presencia de los HGFs fue muy similar en cada ensayo. No se presenta el promedio de todos los ensayos porque la proliferación celular obtenida fue variable probablemente atribuible a variaciones normalmente encontradas entre un experimento y otro.

D I S C U S I O N

Desde hace tres décadas, se han venido identificando a los factores de proliferación hematopoyéticos (HGFs), que regulan la producción de las células sanguíneas (33, 34). Más recientemente, se ha descubierto que los HGFs no solo tienen efectos sobre las células hematopoyéticas, sino que tienen actividad sobre células de otro origen (105, 106). Existen datos que demuestran que algunos HGFs inducen la proliferación de una variedad de tipos celulares no-hematopoyéticos, incluyendo células tumorales (10, 104), y también se ha demostrado la presencia de receptores para varios HGFs (IL-3, M-CSF, G-CSF, GM-CSF) sobre estas células malignas (152). Algunos de estos HGFs (por ejemplo IL-3) pueden ser producidos por células tumorales e influir en la proliferación celular, por mecanismos autócrinos o parácrinos (178, 179).

Los resultados aquí presentados indican que en efecto, algunos HGFs son capaces de inducir proliferación en células no-hematopoyéticas. Se observó, que el G-CSF, M-CSF, GM-CSF y la IL-3 son potentes mitógenos para las células de tipo epitelial tumoral 5637 y CaLo. Ambos tipos celulares responden a concentraciones diferentes de los HGFs, a excepción de la IL-3 y el M-CSF, en donde las concentraciones óptimas fueron las mismas. Sin embargo, este efecto no fue observado en otras células tumorales estudiadas como el carcinoma cérvico-uterino T3, el carcinoma de laringe HEP, y la línea de epitelios de hígado WRL-68. Esto se puede explicar probablemente a que algunas líneas de epitelios tumorales, tienen un requerimiento reducido para factores de crecimiento exógenos (180), consistente con su reducida dependencia para andrógenos y factores estromales para su proliferación, por lo que al agregar los HGFs sobre estas células, posiblemente no muestran efecto alguno sobre su proliferación. Sin embargo, existen datos que indican que los factores producidos por las células estromales, son importantes en la regulación de la proliferación, diferenciación, matástasis e invasión de algunas células cancerosas (115). Es posible que en nuestros ensayos las células 5637 y CaLo hayan respondido al estímulo proliferador de todos los HGFs, debido a la presencia de receptores de membrana para todos ellos. Por ejemplo para el M-CSF, se ha sugerido que su acumulación intracelular, así como la acumulación de M-CSF enlazado a la superficie celular, pueden estar involucrados en la respuesta mitogénica (181).

Sería conveniente como una continuación de este trabajo, determinar si en las células responsivas a los HGFs, existen receptores para ellos, y tratar de inocular éstas células tumorales en ratones para inducir tumores, y poder así determinar su capacidad metastásica *in vivo*. También sería de importancia realizar dosis-respuesta para cada uno de los factores en todas las células utilizadas, puesto que es posible que requieran de concentraciones mayores a las empleadas en los ensayos experimentales para proliferar, y por ello no se haya observado efecto.

Por otro lado, también se observó aumento en la proliferación de epitelios normales de riñón de ratón en cultivos primarios, en presencia de los HGFs. Estos datos enriquecen el conocimiento de que los HGFs, no sólo ejercen efectos sobre células no-hematopoyéticas tumorales, sino también sobre células normales.

El EGF, conocido como un factor que estimula mitogénesis en diversos epitelios y fibroblastos (177), no indujo proliferación en ninguno de los epitelios tumorales utilizados, mientras que como era de esperarse, en las células normales de ratón resultó ser un potente mitógeno. Es probable que las células tumorales (por su transformación) no posean el receptor para EGF, o que produzcan constitutivamente el factor y no respondan a una adición exógena del mismo, o que no requieran de la presencia de este factor para proliferar.

En este trabajo se observó que la IL-2 induce la proliferación de las células 5637 y CaLo, pero no tuvo efecto sobre las células normales de ratón, ni en los demás epitelios utilizados. Es conocido que la interleucina-2 recombinante (rIL-2), tiene efectos sobre células no-hematopoyéticas, es más, la presencia de péptidos que se enlazan a IL-2 fue recientemente reportada sobre fibroblastos humanos de recién nacido y sarcomas (182); y aun más recientemente, ha sido demostrado que los receptores para IL-2 (IL-2Rs), son expresados sobre líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello, sobre tejidos de biopsia de tumores frescos de los mismos carcinomas y en queratinocitos normales humanos (183). También hay evidencias aunque preliminares, que tumores de mama y melanomas humanos pueden expresar receptores de superficie para IL-2 (182, 184). Tal parece que las células tumorales 5637 y CaLo al responder al estímulo de la IL-2 pudieran expresar receptores para este factor. Sería en consecuencia pertinente el evaluar la presencia de este tipo de receptor en nuestras líneas celulares para determinar si existe una relación entre su expresión y la capacidad inductora de la IL-2.

Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos por Weidmann et al (183), que demostraron que los IL-2Rs de afinidad intermedia y alta, son expresados sobre células de carcinomas escamosos de cabeza y cuello y que estos receptores son funcionales, ya que la adición exógena de IL-2 a estos cultivos produce inhibición del crecimiento; y por otra parte, los resultados obtenidos por Paciotti y Tamarkin (184), que observaron inhibición de la proliferación de células tumorales de mama humanas dependientes de carcinomas de cabeza y cuello humanos, se puede concluir que la expresión del receptor para IL-2 se presenta en epitelios malignos y normales, que no se expresa de igual manera en todos ellos, y que probablemente se encuentra en diferente proporción la cadena beta o alfa del receptor para IL-2; por ello, es posible que en unas células se observe efecto en la proliferación y otras no. Es también probable que en las células en donde no se observó efecto mitogénico con IL-2, exista un mayor número de receptores de afinidad intermedia (cadena beta), que estén directamente involucrados en la señal de transducción de IL-2, ya que es conocido que en ciertas células, por ejemplo la línea de células-T (MT-1) transfectada con cDNA que codifica para la cadena beta de IL-2R, se observa una señal que inhibe la proliferación (185).

Es conocido que en la aplicación terapéutica de IL-2 a pacientes con tumores sólidos, existe una respuesta muy heterogénea a su administración en la regresión tumoral. Es posible que tales respuestas puedan ser atribuidas, al menos en parte, a un efecto directo de IL-2 sobre tumores que expresen IL-2Rs de afinidad alta o intermedia, o a un efecto nulo por escasez de IL-2Rs. Con todos estos antecedentes, es importante tener en cuenta que en cada paciente con cáncer avanzado, al cual se le administre IL-2 como inmunoterapia, o algún otro factor de

crecimiento para reducir la mielosupresión causada por la quimioterapia y radioterapia a la que son sometidos los pacientes, se deben realizar estudios *in vitro* e *in vivo* del efecto que pudieran tener estos HGFs sobre la proliferación de las células epiteliales tumorales. En consecuencia habría que tomar en cuenta que la estimulación de la proliferación de células tumorales por HGFs podría ser utilizada con la finalidad de contribuir a aumentar la sensibilidad del tumor a una terapia citotóxica (186).

Al igual que en las líneas de epitelios se observó efecto sobre la inducción a la proliferación con algunos factores hematopoyéticos, en algunos fibroblastos, también se observó proliferación. Las células más responsivas al estímulo de los HGFs fueron los fibroblastos de pulmón de ratón, las células CCD-16Lu y L-929, que en general proliferaron en presencia de todos los HGFs. Es probable que por su origen común (fibroblastos de pulmón de ratón) hayan tenido respuestas similares ante los HGFs y que poseen receptores para ellos. Por otra parte, se observó que el PDGF y el EGF los cuales son conocidos como fuertes mitógenos para fibroblastos (177, 187), en las células analizadas solo mostraron efecto en los fibroblastos de pulmón de ratón en cultivos primarios y en las células CCD-16Lu, mientras que en las demás células fibroblásticas no. Esto demuestra que aunque todas las células sean fibroblastos, no todas responden a los mismos factores y que existen variaciones de célula a célula. Es posible que las células no responsivas estén secretando el factor y no respondan a una adición exógena del mismo, o que la unión del factor con su receptor resulte en el desencadenamiento de una señal negativa o positiva para la proliferación en forma análoga como sucede en la interacción IL-2-IL-2R (183).

Un dato importante e inesperado consistió en que el anticuerpo monoclonal dirigido contra el PDGF (aPDGF), fue un potente proliferador para FibCer y un proliferador moderado para L-929 y CCD-16Lu, mientras que para los fibroblastos de pulmón de ratón no mostró efecto alguno. Aunque no es común encontrar propiedades inductoras para la proliferación en los anticuerpos monoclonales dirigidos contra factores proliferadores, se tienen ciertas evidencias obtenidas por nuestro grupo de trabajo, que demuestran efectos mitogénicos para algunos anticuerpos monoclonales dirigidos contra algunos HGFs (datos no publicados). Es importante hacer notar que en las células en donde el aPDGF resultó un poderoso mitógeno (L-929 y FibCer), el PDGF no tuvo efecto alguno y viceversa. Esto se podría explicar mediante dos posibles hipótesis: la primera es que las células produzcan gran cantidad de PDGF como una manera de regular su proliferación autócrinamente, de tal manera que sobrerregulen su proliferación y por tanto al agregarles este factor de manera exógena, por un lado no respondan a su estímulo proliferativo, y por otro que al adicionarles el anticuerpo se bloquee este exceso de PDGF (secretado por las células) y se desencadene un proceso de proliferación. Está documentado que los fibroblastos son una fuente importante en la producción de PDGF (188), pero no se sabe si todos los tipos de fibroblastos son capaces de secretar este factor, siendo esta una posibilidad por la cual encontramos una respuesta heterogénea en las células utilizadas en este trabajo. En la segunda hipótesis postulamos, que la unión del anticuerpo con el receptor de PDGF, pueda activar a las células y hacerlas más responsivas a otros factores de crecimiento (como una

manera de mantener su proliferación), por lo que el efecto mitogénico del aPDGF no sea directo, sino indirecto a través de la activación de receptores para otros HGFs. Consideramos asimismo que otra posible explicación para las células que no responden al PDGF, se relacione con el hecho de estar contaminadas con algún virus como el virus del sarcoma de simio, ya que es conocido que este tipo de células alteran su respuesta normal a estímulos externos y que por ello no respondan a la adición exógena de PDGF utilizado. Es conocido que la secuencia de aminoácidos de la cadena B del PDGF, es casi idéntica al producto maduro del oncogene *sis* del virus de sarcoma de simio. Esto sugiere que las células transformadas por el virus a través de un mecanismo autócrino, producen un factor de proliferación el cual estimula receptores de la misma célula. En adición con este mecanismo, la infección por el virus simula el efecto de la adición continua de PDGF (189). Sería de gran interés determinar si realmente las células fibroblásticas están produciendo PDGF y por ello una adición exógena no causa efecto, para ello sería necesario realizar dosis-respuesta con el aPDGF para evaluar si el PDGF se encuentra en exceso y sea este el causante del efecto sobrerregulador; y por otro lado, determinar de ser posible la presencia del virus de sarcoma de simio en los fibroblastos empleados para descartar esta posibilidad.

Uno de nuestros objetivos consistió en determinar si la inducción a la proliferación de fibroblastos por G-CSF estaba mediada por PDGF, ya que en resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo se encontró que el aPDGF inhibía la inducción de este HGF. Sin embargo en este trabajo no se encontró inhibición a la inducción de G-CSF por el aPDGF en ninguna de las líneas celulares utilizadas. En consecuencia podemos considerar que si existiera algún tipo de regulación de G-CSF por PDGF, ésta no se presenta para todo tipo de fibroblastos.

Por último se considera importante evaluar en un mayor número de células tumorales el efecto inductor que pudieran tener los HGFs, ya que muchos de estos son aplicados a nivel clínico en pacientes oncológicos para recuperar su cuenta leucocitaria, pero es obvio que si existiera una inducción a la proliferación de las células tumorales, ésta sería contraproducente.

REFERENCIAS

1. Rosse C. Small lymphocyte and transitional populations of the bone marrow; their role in the mediation of immune and progenitor cell functions. *Int Rev Cytol* 1976; 45:155-290.
2. Dexter TM. Haemopoietic growth factors. *British Medical Bulletin* 1989; 45:337.
3. Wolf NS. The haemopoietic microenvironment. *Clin Haematol* 1979; 8:469-500.
4. Lichtman MA. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: A review. *Exp Hematol* 1981; 9:391-410.
5. Zambrano IR, Mendoza JF, Cáceres JR, et al. Evidence that the macrophage-granulocyte inducer (MGI) is produced during cell proliferation, stored in G₀, released in G₁, cell specific, and induces the secretion of other colony-stimulating activities (CSA). *Exp Hematol* 1989; 17:267.
6. Dorshkind K, Witte ON. Long-term murine hemopoietic cultures as model systems for analysis of B lymphocyte differentiation. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1987; 135:23-41.
7. Kincade PW, Lee G, Pietrangeli CE, Hayashi SI, Gimble JM. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:111-143.
8. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation, commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 1989; 339:27-30.
9. Golde DW. Hematopoietic growth factors-An overview. *Int J Cell Cloning* 1990; 8:4.
10. Dedhar S, Gaboury L, Galloway P, et al. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of non-hematopoietic origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9253.
11. Berdel WE, Danhauser-Riedl S, Steinhauser G, et al. Various human hematopoietic growth factors (interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate the growth of nonhematopoietic tumor cells. *Blood* 1989; 73:80.
12. Mendoza JF, Cáceres JR, Santiago E, et al. Evidence that G-CSF is a fibroblast growth factor that induces granulocytes to increase phagocytosis and to present a mature morphology, and that macrophages secrete 45-Kd molecules with these activities as well as with G-CSF-like activity. *Exp Hematol* 1990; 18:903.
13. Groopman JE. Status of colony-stimulating factors in cancer and AIDS. *Seminars in Oncology* 1990; 17:31.
14. Erslev AJ, Weiss L. Structure and function of the marrow. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (eds). *Hematology* (3a ed). Mc Graw-Hill, New York, 1983:75-83.
15. Gulati GL, Ashton JK, Hyun BH. Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1988; 2:495-511.
16. Adamson JW. Evidence for multiple levels of regulation of hematopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 1986; 215:21-32.
17. Bender JG, Van Epps DE, Stewart CC. Regulation of myelopoiesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1987; 10:79-91.

18. Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol* 1984; 12:517-521.
19. Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987; 236:1229-1237.
20. Sachs L. The molecular control of blood cell development. *Science* 1987; 238:1374-1379.
21. Strife A, Lambek C, Wisniewski D, et al. Activities of four purified growth factors on highly enriched human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1987; 69:1508-1523.
22. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962; 237:1555-1562.
23. Kasselberg AG, Orth DN, Gray ME, Stahlman MT. Immunocytochemical localization of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues. *J Histochem Cytochem* 1985; 33:315-322.
24. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 1979; 48:193-216.
25. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg* 1988; 208:788-794.
26. Mead JE, Fusto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1558-1562.
27. Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 1986; 236:1250-1253.
28. Elder JT, Fisher GJ, Lindquist PB, et al. Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science* 1989; 243:811-814.
29. Derynck R. Transforming growth factor alpha. *Cell* 1988; 54:593-595.
30. Rusceti FW, Morgan DA, Gallo RC. Functional and morphologic characterization of human T cells continuously growth *in vitro*. *J Immunol* 1977; 119:131-138.
31. Lotze MT. IL-2: Basic Principles. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Principles and practice of biologic therapy*. Philadelphia, Lippincott, 1991.
32. Lotze MT. Interleukin-2. In: Aggarwal BB, Gutterman JU (eds). *Human Cytokines*. Blackwell Scientific Publications, USA, 1992: 81-96.
33. Pluznik DH, Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cellular Compar Physiol* 1965; 66:319-324.
34. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Australian J Exp Biol Med Sci* 1966; 44:287-300.
35. Stanley ER. Colony-stimulating factor (CSF) radioimmunoassay: detection of a CSF subclass stimulating macrophage production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:2969-2973.
36. Das SK, Stanley ER, Guilbert LJ, Forman LU. Human colony stimulating factor (CSF-1) radioimmunoassay: resolution of three subclasses of human colony stimulating factors. *Blood* 1981; 58: 630-641.
37. Sherr CJ, Stanley ER. Colony-stimulating factor 1. In: Habenicht A (ed). *Growth factors, differentiation factors and cytokines*. Springer-Verlag, Berlin, 1990:667-698.

38. Garnick MB, Stoudemire JB. Preclinical and clinical evaluation of recombinant human macrophage colony-stimulating factor (rhM-CSF). *Int J Cell Cloning* 1990; 8:356-373.
39. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, et al. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4828-4832.
40. Burgess AW, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer* 1980; 26:647-654.
41. Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytes leukemic cells: identification as granulocyte colony stimulating factor. *J Biol Chem* 1983; 258:9017-9023.
42. Whetton AD, Dexter TM. Myeloid hematopoietic growth factors. *Biochim Biophys Acta* 1989; 989:111-132.
43. Ogawa M. Hematopoietic stem cells: stochastic differentiation and humoral control of proliferation. *Environ Health Perspect* 1989; 80:199-207.
44. Avalos BR, Gasson JC, Heduat C, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biological activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood* 1990; 75:851-857.
45. Nicola NA. Granulocyte colony-stimulating factor and differentiation-induction in myeloid leukemic cells. *Int J Cell Cloning* 1987; 5:1-15.
46. Vallenga E, Ostapovicz D, O'Rourke B, Griffin JD. Effects of recombinant IL-3, GM-CSF, and G-CSF on proliferation of leukemic clonogenic cells in short-term and log-term cultures. *Leukemia* 1987; 1:584-589.
47. Souza LM. Granulocyte colony-stimulating factor. In: Aggarwal BB, Gutterman JU (eds). *Human cytokines*. Blackwell Scientific Publications, USA, 1992:221-237.
48. Mooney DP, Gamelli RL, O'Reilly M, Hebert JC. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and *Pseudomonas* burn wound sepsis. *Arch Surg* 1988; 123:1353-1357.
49. Crosier PS, Garnick MB, Clark SC. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor. In: Aggarwal BB, Gutterman JU (eds). *Human cytokines*. Blackwell Scientific Publications, USA, 1992:238-252.
50. Schrader JW, Clark-Lewis I, Crapper RM, et al. The physiology and pathology of pan-specific hemopoietin (IL-3). In: Schrader JW (ed). *Lymphokines*. Academic Press, New York, 1988; 15:281-311.
51. Schrader JW, Clark-Lewis I, Leslie KB, Ziltener HJ. Interleukin-3. In: Aggarwal BB, Gutterman JU (eds). *Human cytokines*. Blackwell Scientific Publications, USA, 1992:97-112.
52. Deuel TF, Huang JS, Huang SS, Stroobant P, Waterfield MD. Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed cells. *Science* 1983; 221:1348-1350.
53. Deuel TF, Kawahara RS. Platelet-derived growth factor. In: Aggarwal BB, Gutterman JU (eds). *Human cytokines*. Blackwell Scientific Publications, USA, 1992:300-328.
54. Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal

- cells and their products. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:111-137.
55. Becker RP, DeBruyn PH. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation, a scanning electron microscopic investigation. *Ann J Anat* 1976; 145:183-205.
 56. Seelentag WK, Mermod JJ, Montesano R, Vassali P. Additive effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor on the accumulation of three granulocyte and macrophage colony-stimulating factor mRNAs in human endothelial cells. *EMBO J* 1987; 6:2261-2265.
 57. Segal GM, McCall E, Stueve T, Bagby GC Jr. Interleukin-1 stimulates endothelial cells to release multilineage human colony-stimulating activity. *J Immunol* 1987; 138:1772-1778.
 58. Tavassoli M, Yoffey JM. Bone marrow structure and function. *Liss, New York*, 1983:300.
 59. Weiss L. Transmural cellular passage in vascular sinuses of rat bone marrow. *Blood* 1970; 36:189-208.
 60. Shaddock RK, Waheed A, Wing EJ. Demonstration of a blood-bone marrow barrier to macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989; 73:68-73.
 61. Trentin JJ. Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). *Am J Pathol* 1971; 65:621-627.
 62. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A Stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 51:26-36.
 63. Dorshkind K, Johnson A, Collins L, Keller GM, Phillips RA. Generation of purified stromal cell cultures that support lymphoid and myeloid precursors. *J Immunol Meth* 1986; 89:37-47.
 64. Quesenberry PJ, McNiece IK, Robinson BE, et al. Stromal cell regulation of lymphoid and myeloid differentiation. *Blood* 1987; 13:137.
 65. Rennick D, Yang G, Gemmell L, Lee F. Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: Lipopolysaccharide- and interleukin-1-inducible production of colony-stimulating factors. *Blood* 1987; 69:682.
 66. Gualtieri RJ, Shaddock RK, Baker DG, Quesenberry PJ. Hematopoietic regulatory factors produced in long-term murine bone marrow cultures and the effect of *in vitro* radiation. *Blood* 1984; 64:516-525.
 67. Bentley SA. A clonal cell-cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture. *Exp Hematol* 1981; 9:303.
 68. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 1977; 91:335-344.
 69. Allen TD, Dexter TM. Marrow biology and stem cells. In: Dexter TM, Garland JM, Testa NG (eds). *Colony-stimulating factors. Molecular and cellular biology.* Marcell Dekker INC, New York, 1990:1-38.
 70. Roberts R, Gallagher J, Spooner E, Allen TD, Blommfield F, Dexter TM. Heparan sulphate bound growth factors: A mechanism for stromal cells mediated haemopoiesis. *Nature* 1988; 332: 376-378.

71. Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood* 1983; 62:291-297.
72. Kodama H, Hagiwara H, Sudo H, Amagai Y, et al. MC3T3-G2/PAG preadipocytes support *in vitro* proliferation of hemopoietic stem cells through a mechanism different from that of Interleukin-3. *J Cell Physiol* 1986; 129:20-26.
73. Bentley SA. Close range cell: cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture. *Exp Hematol* 1981; 9:308-312.
74. Yamazaki K, Roberts RA, Spooncer E, Dexter TM, Allen TD. Cellular interactions between 3T3 cells and interleukin-3-dependent multipotent haemopoietic cells: a model system from stromal-cell-mediated haemopoiesis. *J Cell Physiol* 1989; 139:301-312.
75. Zuckerman KS, Wicha MS. Extracellular matrix production by adherent cells of long-term murine bone marrow cell cultures. *Blood* 1983; 61:540-547.
76. Bentley SA, Kirby SL, Anklesaria P, Greenberger JS. Bone marrow stromal proteoglycan heterogeneity: Phenotypic variability between cell lines and the effects of glucocorticoid. *J Cell Physiol* 1988; 136:182-187.
77. Spooncer E, Gallagher JT, Krizsa F, Dexter TM. Regulation of haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. IV. Glycosaminoglycan synthesis and the stimulation of haemopoiesis by β -D-Xylosides. *J Cell Biol* 1983; 96:510-514.
78. Tsai S, Patel V, Beaumont E, Lodish HF, Nathan DG, Sieff CA. Differential binding of erythroid and myeloid progenitors of fibroblast and fibronectin. *Blood* 1987; 69:1587.
79. Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F, Dexter TM. Heparin sulphate bound growth factors: A mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* 1989; 332:376-378.
80. Groopman JE, Molina JM, Scadden DT. Hematopoietic growth factors. *New England J of Med* 1989; 321:1449-1459.
81. Sieff CA, Neimeyer CM, Mentzer SJ, Faller DV. Interleukin-1, tumor necrosis factor, and the production of colony-stimulating factors by cultured mesenchymal cells. *Blood* 1988; 72:1316.
82. Fibbe WE, Van Damme J, Billiau A, et al. Interleukin-1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce G-CSF and M-CSF. *Blood* 1988; 71:430.
83. Gimble JM, Pietrangeli C, Henley A, et al. Characterization of murine bone marrow and spleen-derived stromal cells: Analysis of leukocyte marker and growth factor mRNA transcript levels. *Blood* 1989; 74:303.
84. Song Z, Thomas C, Innes D, Waheed A, Shaddock RK, Quesenberry PJ. Characterization of two clones isolated from TC-1 murine marrow stromal cell line: Growth factor and retrovirus production and physical support of hematopoiesis. *Int J Cell Cloning* 1988; 6:125.
85. Zipori D, Lee F. Introduction of interleukin-3 gene into stromal cells from the bone marrow alters hematopoietic differentiation but does not modify stem cell renewal. *Blood* 1988; 71:586.

86. Bagby GC, McCall E, Layman DL. Regulation of colony-stimulating activity production. Interactions of fibroblasts, mononuclear phagocytes and lactoferrin. *J Clin Invest* 1983; 71:340.
87. Bagby GC, McCall E, Bergstrom KA, Burger D. A monokine regulates colony-stimulating activity production by vascular endothelial cells. *Blood* 1983; 62:663.
88. Brondy VC, Zuckerman KS, Jetmalani S, Fitchen JH, Bagby GC Jr. Monocytes stimulated fibroblastoid bone marrow stromal cells to produce multilineage hematopoietic growth factors. *Blood* 1986; 68:530-534.
89. Yang YC, Tsai S, Wong GG, Clark SC. Interleukin-1 regulation of hematopoietic growth factor production by human stromal fibroblast. *J Cell Physiol* 1988; 134:292-296.
90. Song ZX, Shadduck RK, Innes DJ Jr, Waheed A, Quesenberry PJ. Hematopoietic growth factor production by a cell line (TC-1) derived from adherent murine marrow cell. *Blood* 1985; 66:273-281.
91. Le PT, Lazorick S, Whichard LP, et al. Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *J Immunol* 1990; 145:3310-3315.
92. Aarden LA, DeGroot ER, Schaap OL, Lansdorp PM. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* 1987; 17:1411-1416.
93. Peschel C, Paul WE, Ohara J, Green I. Effects of B cell stimulating factor-1/Interleukin-4 on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1987; 70:254-263.
94. Lowenthal JW, Castle BE, Christiansen J, et al. Expression of high affinity receptors for murine interleukin-4 (BSF-1) on hemopoietic and non-hemopoietic cells. *J Immunol* 1988; 140:456-464.
95. Cosman D, Namen AE, Lupton S, et al. Interleukin-7: A lymphoid growth factor active on T and B cell progenitors. *Lymphokine Recept Interact* 1989; 179:229-236.
96. Lee G, Ellingsworth LR, Gillis S, Wall R, Kincade PW. β -transforming growth factors are potential regulators of B lymphopoiesis. *J Exp Med* 1988; 166:1290-1299.
97. Zipori D, Sasson T. Adherent cells from mouse bone marrow inhibit the formation of colony-stimulating factor (CSF) induced myeloid colonies. *Exp Hematol* 1980; 8:816-817.
98. Zipori D. Conditions required for the inhibition of *in vitro* growth of a mouse myeloma cell line by adherent bone marrow cells. *Cell Tissue Kinet* 1981; 14:479-488.
99. Baird A, Esch F, Mormede P, et al. Molecular characterization of fibroblast growth factor: Distribution and biological activities in various tissues. *Recent Prog Horm Res* 1986; 42:143.
100. Winkles JA, Friesel R, Burgess WH, et al. Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding growth factor I (endothelial cell growth factor). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7124.
101. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; 46:155.
102. Abboud SL, Pinzani M. Peptide growth factors stimulate macrophage colony-stimulating factor in murine stromal cells.

- Blood 1991; 78:103-109.
103. Roberts RA, Spooncer E, Parkinson EK, Lord BI, Allen TD, Dexter TM. Metabolically inactive 3T3 cells can substitute for marrow stromal cells to promote the proliferation and development of multipotent haemopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 1987; 132: 203-214.
 104. Ruff MR, Farrar WL, Pert CB. Interferon γ and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibit growth and induce antigens characteristic of myeloid differentiation in small-cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:6613-6617.
 105. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, et al. Granulocyte- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 1989; 337: 471-473.
 106. Dedhar S, Gaboury L, Galloway P, Eaves C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of non-hematopoietic origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9253-9257.
 107. Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Kiritsy CP, Lynch SE. Injury induces *in vivo* expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:565-569.
 108. Nawroth PP, Bank I, Handley D, Cassimeris J, Chess L, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cells receptors to induce release of interleukin-1. *J Exp Med* 1986; 163:1363-1375.
 109. Vogel SN, Douches SD, Kaufman EN, Neta R. Induction of colony stimulating factor *in vivo* by recombinant tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; 138:2143-2148.
 110. Pietrangeli CE, Hayashi SI, Kincade PW. Stromal cell lines which support lymphocyte growth: Characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factor. *Eur J Immunol* 1988; 18:863-872.
 111. Rosenfeld M, Keating A, Bowen-Pope DF, Singer JW, Ross R. Responsiveness of the *in vitro* hematopoietic microenvironment to platelet derived growth factor. *Leuk Res* 1985; 9:427-434.
 112. Nettesheim P, Ferriola P, Steingerwalt R, Robertson A, Rundhaug J. The role of growth factors in the regulation of proliferation of tracheobronchial epithelium. *Chest (Supplement)* 1992; 101:23-24.
 113. Bartelmez SH, Stanley ER. Synergism between hemopoietic growth factors (HGFs) detected by their effects on cells bearing receptors for a lineage specific HGF: Assay of hemopoietin-1. *J Cell Physiol* 1985; 122:370-378.
 114. Klausmann M, Pflueger KH, Havemann K. Colony-stimulating factors in solid tumors: paraneoplastic production and growth-modulating activity. In: Martelsmann R, Herrman F (eds). *Hematopoietic growth factors in clinical applications*. New York, USA 1990:421-430.
 115. Adams EF, Newton CJ, Tait GH, Braunsberg H, Roed MJ, James VHT. Paracrine influence of human breast stromal fibroblast on breast epithelial cells: secretion of a polypeptide which stimulates

- reductive 17 β -oestradiol dehydrogenase activity. *Int J Cancer* 1988; 42:119-122.
116. Dawe CJ. Epithelial-mesenchymal interactions in relation to the genesis of polyoma virus-induced tumours of mouse salivary gland. In: Tarin D (ed). *Tissue interactions in carcinogenesis*. Academic Press, London 1972:305-358.
 117. Sakakura T, Sakagami Y, Nishizuka Y. Accelerated mammary cancer development by fetal salivary mesenchyma isografted to adult mouse mammary epithelium. *J Nat Cancer Inst* 1981; 66:953-957.
 118. Hodges GM, Hickes RM, Spacey GD. Epithelial stromal interactions in normal and chemical carcinogen-treated adult bladder. *Cancer Res* 1977; 37:3720-3730.
 119. Orr JW, Spencer AT. Transplantation studies of the role of the stroma in epidermal carcinogenesis. In: Tarin D (ed). *Tissue interactions in carcinogenesis*. Academic Press, London 1972; 291-303.
 120. Camps JL, Chang SM, Hsu TC, et al. Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:75-79.
 121. Durning P, Schor SL, Sellwood RA. Fibroblast from patients with breast cancer show abnormal migratory behaviour *in vitro*. *Lancet* 1984; 2:890-892.
 122. Azzarone B, Mareel M, Scemama P, Chaponnier C, Macieira CA. Abnormal properties of skin fibroblasts from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1984; 33:759-764.
 123. Tanaka A, Lu J, Yamanishi H, et al. Effects of androgen fibroblast growth factors or other various growth factors on growth factors on growth of Shionogi carcinoma cells in a protein-free medium. *Anticancer Research* 1990; 10:1637-1642.
 124. Mukaida H, Hirabayashi N, Hirai T, Iwata T, Saeki S, Toge T. Significance of freshly cultured fibroblasts from different tissues in promoting cancer cell growth. *Int J Cancer* 1991; 48: 423-427.
 125. Lippman ME, Dickson RS, Gelmann EP, et al. Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion. *J Cell Biochem* 1987; 35:1-16.
 126. Ro J, Bresen J, Ro JY, Brasfield F, Hortobagyi G, Blick M. SIS/PDGF- β expression in benign and malignant human breast lesions. *Oncogene* 1989; 4:351-
 127. Bronzert DA, Bates SE, Sheridan JP, et al. Transforming growth factor- β induces platelet-derived growth factor (PDGF) messenger RNA and PDGF secretion while inhibiting growth in normal human mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1990; 4:981-989.
 128. Ginsburg E, Vanderhaar BK. Stimulation of growth of human breast cancer cells (T47D) by platelet derived growth factor. *Cancer Letters* 1991; 58:137-144.
 129. Baldwin GC, DiPersio J, Kaufmann SE, Quan SG, Golde DW, Gasson JC. Characterization of human GM-CSF receptors on non hematopoietic cells. *Blood* 1987:166.
 130. Ruff MR, Farrar WL, Pert CB. Interferon gamma and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibit growth and induce antigens characteristic of myeloid differentiation in small-cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6613-6617.

131. Munker M, Munker R, Saxton RE, Koeffler HP. Effects of recombinant monokines lymphokines, and other agents on clonal proliferation of human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1987; 47:4081-4085.
132. Zhang XG, Bataille R, Jourdan M, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myelomas cells. *Blood* 1990; 76:2599-2605.
133. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, et al. A paracrine rather than autocrine regulation of myeloma cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 1989; 73:517.
134. Myers CD, Katz FE, Joshi G, Millar JL. A cell line secreting stimulating factors for CFU-GEMM culture. *Blood* 1984; 64:152-155.
135. Welte K, Platzer E, Lu L, et al. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1526-1530.
136. Lilly MB, Devlin PE, Devlin JJ, Rado TA. Production of granulocyte colony-stimulating factor by a human melanoma cell line. *Exp Hematol* 1987; 15:966-971.
137. Nicoletti G, Lollini P-L, Bagnara GP, et al. Are colony-stimulating factor-producing cells facilitated in the metastatic process?. *Anticancer Res* 1987; 7:695-700.
138. Berdel WE, Danhauser-Riedl S, Winton EF. Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulates clonogenicity of a human colon tumor cell line *in vitro*. *Exp Hematol* 1988; 16:510.
139. Steward WP, Scarffe JH, Dexter TM, Testa NG. Clinical application of hematopoietic growth factors. In: Dexter TM, Garland JM, Testa NG (eds). *Colony-stimulating factors. Molecular and cellular biology*. Marcell Dekker INC, New York, USA 1990:359-378.
140. Rosenthal FM, Lindemann A, Herrmann F, Mertelsmann R. Interleukins and haematopoietic growth factors. In: Mertelsmann R (ed). *Lymphohaematopoietic growth factors in cancer therapy*. Springer-Verlag, Germany 1990:3-11.
141. Bronchud MH, Scarffe JH, Thatcher N, et al. Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1987; 56:809-813.
142. Crawford J, Ozer H, Johnson D. Granulocyte colony stimulating factor: Prevention of chemotherapy induced febrile neutropenia (FN) in patients with small cell lung cancer (SCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1990; 9:229.
143. Morstyn G, Campbell L, Souza LM, et al. Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet* 1988; 1:667-672.
144. Gabrilove JL, Jakubowski A, Scher H, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional cell carcinoma of the urothelium. *N Engl J Med* 1990; 318:1414-1422.
145. Gabrilove JL, Jakubowski A, Fain K, et al. Phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Clin Invest*

- 1988; 82:1454-1461.
146. Kodo H, Tajika K, Takahashi S, Ozawa K, Asano S, Takaku F. Acceleration of neutrophilic granulocyte recovery after bone-marrow administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Lancet* 1988; 2:38-39.
 147. Antam KS, Griffin JD, Elias A, et al. Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *N Engl J Med* 1988; 319: 593-598.
 148. Salmon SE, Liu R. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on *in vitro* growth of human solid tumors. *J Clin Oncol* 1989; 7:1346-1350.
 149. Antman KH. G-CSf and GM-CSF in clinical trials. *The Yale J of Biol and Med* 1990; 63:387-410.
 150. Brandt SJ, Peters WP, Atwater SK, et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1988; 869-876.
 151. Groopman JE, Molina JM, Scadden DT. Hematopoietic growth factors: Biology and clinical applications. *N Engl J Med* 1989; 321:1449-1459.
 152. Baldwin GC, Gasson JC, Kaufman SE. Nonhematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors. *Blood* 1989; 73:1033-1037.
 153. Motoyoshi K, Takaku F, Maekawa T, et al. Protective effect of partially purified human urinary colony-stimulating factor on granulocytopenia after antitumor chemotherapy. *Exp Hematol* 1986; 14:1069-1075.
 154. Munn DH, Garnick MV, Cheung NKV. Effects of parenteral macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on circulating monocyte number, immunophenotype and anti-tumor activity in cynomolgus monkeys. *Blood* 1988; 72: Suppl I: 127a (abstract).
 155. Onge JS, Jacobson RJ. The role of hematopoietic growth factors in the treatment of neoplastic diseases. *Sem in Hematol* 1992; 29:53-63.
 156. Bajorin DF, Jakubowski A, Cody B, et al. Recombinant macrophage colony stimulating factor: A phase I trial in patients with metastatic melanoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1990; 9:183a (abstract).
 157. Lindemann A, Herrman F, Mertelsmann R, et al. Human recombinant interleukin 3: A phase I/II clinical study. In: Mertelsmann R, Herrman F (eds). *Hematopoietic growth factors in clinical applications*. New York, USA 1990:149-159.
 158. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Special report-Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313:1485-1492.
 159. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987; 316:889-897.
 160. West WH, Tauer KW, Yannelli JR, et al. Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced

- cancer. *N Engl J Med* 1987; 316:898-905.
161. Thompson JA, Lee DJ, Lindgren CG, et al. Influence of dose and duration of infusion of interleukin-2 on toxicity and immunomodulation. *J Clin Oncol* 1988; 6:669-678.
 162. Gambacorti-Passerini C, Rivoltini L, Radrizzani M, et al. Differences between *in vivo* and *in vitro* activation of cancer patients lymphocytes by recombinant interleukin 2: Possible role for lymphokine-activated killer cell infusion in the *in vitro*-induced activation. *Cancer Res* 1989; 49:5230-5234.
 163. Lotze MT, Chang AE, Seipp CA, et al. High-dose recombinant interleukin 2 in the treatment of patients with disseminated cancer. *JAMA* 1986; 256:3117-3124.
 164. Marumo K, Muraki J, Veno M, et al. Immunologic study of human recombinant interleukin-2 (low-dose) in patients with advanced renal cell carcinoma. *Urology* 1989; 3:219-225.
 165. Thatcher N, Dazzi H, Johnson RJ, et al. Recombinant interleukin 2 (rIL-2) given intrasplenically and intravenously for advanced malignant melanoma. A phase I and II study. *Br J Cancer* 1989; 60:770-774.
 166. Roth AD, Kirkwood JM. New clinical trials with interleukin-2: rationale for regional administration. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1989; 8:153-164.
 167. Flaherty L. The combination of recombinant interleukin-2 and dacarbazine (DTIC) in metastatic malignant melanoma. *Cancer Treat Rev* 1989; 16:65-66.
 168. Lindermann A, Hoeffken K, Schmidt A, et al. A multicenter trial of interleukin-2 and low-dose cyclophosphamide in highly chemotherapy-resistant malignancies. *Cancer Treat Rev* 1989; 16: 53-57.
 169. Thatcher N, Dazzi H, Mellor M, et al. Recombinant interleukin-2 (rIL-2) with flavone acetic acid (FAA) in advanced malignant melanoma: a phase II study. *Br J Cancer* 1990; 61:618-621.
 170. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 562 cancer patients. *Ann Surg* 1989; 210:442-474.
 171. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Combination therapy with interleukin-2 and alpha-interferon for the treatment of patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7:1863-1874.
 172. Thatcher N. Interleukin-2: Clinical aspects. In: Mertelsmann R (ed). *Lymphohaematopoietic growth factors in cancer therapy*. Springer-Verlag, Germany 1990:57-77.
 173. Kueng W, Silber E, Eppenberger V. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochememistry* 1989; 186: 16-19.
 174. Ostle B. *Estadística aplicada*. Limusa, México, 1983. p.629.
 175. *Biología. Interacción de Experimentos e Ideas*. Consejo Nacional para la Enseñanza de la Biología A. C., y Biological Sciences Curriculum Study. Limusa, México, 1974. p.479.
 176. Marqués de Cantú MJ. *Probabilidad y Estadística para ciencias químico-biológicas*. ed: ENEP-Zaragoza, UNAM, México 1988. p.657.
 177. Barnes, Sato. *Cell* 1980; 22:649.
 178. Danner M, Luger TA. Human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines produce a cytokine with interleukin 3-like

- activity. *J Invest Dermatol* 1987; 88:353-361.
179. Kirnbauer R, Kock A, Schwarz T, et al. IFN- β 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and release by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. *J Immunol* 1989; 142:1922-1928.
 180. Mckeehan WL, Adams PS, Fast D. Different hormonal requirements for androgen-independent growth of normal and tumor epithelial cells from the rat prostate. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23: 147-152.
 181. Vairo G, Hamilton JA. Signalling through CSF receptors. *Immunol Today* 1991; 12:362-369.
 182. Carloni C, Paterson H, Mareel M, et al. N-ras dependent revertant phenotype in human HT 1080 fibrosarcoma cells is associated with loss of proliferation within normal tissues and expression of an adult membrane antigenic phenotype. *Oncogene* 1989; 4:873-880.
 183. Weidmann E, Sacchi M, Plaisance S, et al. Receptors for Interleukin 2 on human squamous cell carcinoma cell lines and tumor *in situ*. *Cancer Research* 1992; 52:5963-5970.
 184. Paciotti GF, Tamarkin L. Interleukin-2 differentially affects the proliferation of a hormone-dependent and a hormone-independent human breast cancer cell line *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res* 1988; 8:1233-1239.
 185. Tsudo M, Karasuyama H, Kitamura F, Nagasaka Y, Tanaka T, Miyasaka M. Reconstitution of a functional IL-2-receptor by the β -chain cDNA. A newly acquired receptor transduces negative signal. *J Immunol* 1989; 143:4039-4043.
 186. Klausmann M, Pflueger KH, Havemann K. Colony-stimulating factors in solid tumors: Paraneoplastic production and growth-modulating activity. In: Mertelsmann R, Hermann F (eds). *Hematopoietic growth factors in clinical applications*. New York, USA, 1990:421-430.
 187. Heldin C-H, Wasteson A, Westermark B. Platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol* 1985; 3:169-187.
 188. Paulsson Y, Hammacher A, Heldin C-H, Westermark B. Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature* 1987; 328:715-717.
 189. Hardie DG. Biochemical Messengers. Hormones, neurotransmitters and growth factors. Cap: Cell proliferation and cancer. Chapman & Hall, Great Britain, 1991:249-277.
 190. Mendoza JF, López R, Machuca C, Sánchez L, Hernández J, Weiss-Steider B. Los factores estimuladores de colonias (CSFs) y las interleucinas (ILs): reguladores de la producción hematopoyética. *Sangre* 1993. En prensa.

A P E N D I C E I

Regresión lineal

Las curvas patrón obtenidas con números celulares conocidos para todas las células utilizadas, fueron calibradas mediante una regresión lineal de acuerdo a la ecuación de la recta:

$$y = A + Bx$$

en donde los valores de absorbancia obtenidos corresponden a y , y los números celulares a x . Por otra parte se determinó el coeficiente de correlación (r) que en teoría debe ser de 1, el valor de la constante A y el coeficiente de regresión (B) (176).

Las fórmulas para calcular A , B y r , son las siguientes:

$$A = \frac{\sum y - B (\sum x)}{n}$$

$$B = \frac{n (\sum xy) - \sum x (\sum y)}{n (\sum x^2 - (\sum x)^2)}$$

$$r = \frac{n (\sum xy) - \sum x (\sum y)}{\sqrt{\{n (\sum x^2) - (\sum x)^2\} \{n (\sum y^2) - (\sum y)^2\}}}$$

Tiempo de Doblaje

Las cinéticas de proliferación de las células utilizadas fueron calibradas mediante un análisis de regresión exponencial o semilogarítmica, aplicado en la fase de proliferación exponencial de todas las células, para conocer su tiempo de doblaje.

En el crecimiento exponencial, que es de tipo exponencial, se propone una ecuación de regresión de la forma:

$$y = c dx$$

Como sugiere el nombre exponencial, la variable independiente x aparece en el exponente.

La ecuación de regresión exponencial puede transformarse en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \log y &= \log c + x \log d \\ \text{si:} \quad \log c &= a \quad \text{y} \quad \log d = b \end{aligned}$$

entonces sustituyendo en la ecuación queda:

$$\log y = a + bx$$

que es una ecuación lineal en $\log y$ y x , la cual es una función semilogarítmica, de manera que si se llevan los puntos a papel semilogarítmico se obtiene una recta (176).

Para la determinación del tiempo de doblaje, se toman 2 puntos de la línea recta obtenida en papel semilogarítmico, en donde el segundo punto corresponde al doble de la densidad celular del primero, y se determinan los tiempos correspondientes, los cuales se restan, obteniéndose así los tiempos de doblaje.

A P E N D I C E II

Preparación del cristal violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 ml de ácido fórmico aforados a 500 ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución de cristal violeta es filtrada y posteriormente usada (173).

A P E N D I C E III

Coefficiente de Variación

El coeficiente de variación relaciona la desviación y la media de los datos obtenidos mediante la siguiente fórmula:

$$CV = (S/\bar{X}) \times 100$$

en donde CV = coeficiente de variación; S = desviación estandar o raíz cuadrada positiva de la varianza y \bar{X} = media.

Es recomendable que el coeficiente de variación no sea mayor al 10% (177).

Prueba de t de Student

La prueba de t fue dada a conocer en 1908 por S. Gosset, en un artículo publicado en la revista *Biometrika* con el seudónimo de Student. Se desarrolló como una relación entre series de medias de muestras y la media de la población de la que se tomaron las muestras. "Student" demostró que las áreas bajo la curva de distribución son inconsistentes con el de la curva normal cuando el tamaño de la muestra varía.

Por medio de la prueba de t se comparan las medias y las desviaciones entre 2 grupos de datos y se determina si las diferencias existentes entre ambos son estadísticamente significativas. Los casos fundamentales en los que se aplica esta prueba son dos:

a) Comparación entre la media de una muestra (\bar{x}) y la media de una población (μ) para saber si la muestra fue extraída de esa población.

b) Comparación entre las medias de dos muestras A y B (\bar{x}_A , \bar{x}_B) para saber si ambas provienen de la misma población.

Hay cierto número de fórmulas con las que puede obtenerse t; la elección depende del caso de que se trate.

Para este trabajo se utilizó la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\frac{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}}{N}}$$

en la que \bar{X}_1 = media de la muestra 1; \bar{X}_2 = media de la muestra 2; N = tamaño de la muestra; S_1^2 = varianza de la muestra 1 y S_2^2 = varianza de la muestra 2.

Es evidente que mientras mayor sea la diferencia entre las medias ($\bar{X}_1 - \bar{X}_2$), mayor será el valor de t. Sin embargo, puede hacerse un uso más riguroso del valor de t obtenido utilizando una tabla de distribución de t (175). Si la P obtenida es muy baja, representa la probabilidad de que la diferencia entre las muestras consideradas sea debida al azar. Si la diferencia no se debe al azar, o solo en proporción muy baja (menor de un décimo por ciento), entonces es motivada por otros factores.

En los datos presentados en la literatura, se puede indicar que la diferencia es "significativa", "no significativa" o "muy

significativa". En la siguiente tabla, se da una idea clara de cómo se hace la relación entre P y la significación en la tabla de distribución de t (175).

	Valores de P		
	0.90-0.05	0.05-0.01	0.01-0.001
Conclusión acerca de la diferencia encontrada	No significativa	Significativa	Muy significativa

En este trabajo se tomó una diferencia significativa y muy significativa, con un valor de $P < 0.05$ y $P < 0.01$ respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que hicieron posible la realización de este trabajo. A mis asesores el Dr. Benny Weiss Steider, el Dr. José Miguel Betancourt Rule y al M. en C. Jorge Flavio Mendoza Rincón, por sus sugerencias para el mejoramiento del trabajo experimental y del escrito. Al Biól. Jorge Hernández Montes por su colaboración en la parte experimental y al Biól. Miguel Angel Ramírez por su ayuda en el análisis estadístico.

Por otra parte agradezco a los Srs. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su asistencia técnica y a todos mis compañeros de laboratorio.

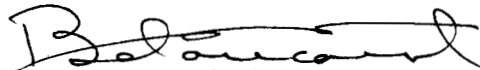
Por último agradezco el apoyo económico otorgado por el CONACyT para realizar mis estudios de maestría.

A TODOS MUCHAS GRACIAS.

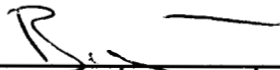
El jurado designado por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, aprobó la presente tesis a los 19 días del mes de Febrero de 1993.



M. en C. Jorge Flavio Mendoza Rincón
PRESIDENTE



Dr. José Miguel Betancourt Rule
VOCAL



Dr. Benny Weiss Steider
SECRETARIO