

EFFECTO DEL M-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES CALO E INBL PROVENIENTES DE CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO

Víctor Manuel Navarrete Márquez, Rosalva Rangel Corona,
Teresa Corona Ortega, Benny Weiss Steider, Jorge Flavio Mendoza Rincón

RESUMEN

El M-CSF es un factor de crecimiento que induce proliferación y diferenciación del linaje celular monocito-macrófago. Entre sus múltiples funciones se incluyen incremento en actividad tumoricida, actividad fagocítica, etc. Asimismo, puede potenciar funciones efectoras de las células que participan en la eliminación de agentes infecciosos (virus, bacterias y hongos) y de células tumorales, por lo que el M-CSF ha sido utilizado clínicamente para contrarrestar infecciones. Recientemente se ha reportado que esta molécula se detecta en grandes cantidades en tejido placentario, y que tiene efectos mucho más amplios, desempeñando otras funciones aún poco comprendidas; como demostró nuestro grupo que el M-CSF es un fuerte mitógeno para células epiteliales de ratón. Tomando en cuenta estos antecedentes, se procedió a evaluar la capacidad inductora de la proliferación del M-CSF en células epiteliales obtenidas de tumores de cáncer de cérvix humano. Los resultados obtenidos para las líneas tumorales CALO e INBL, en presencia de M-CSF, muestran un incremento de la proliferación a concentraciones bajas; sin embargo, se observa que al aumentar la concentración de éstas tienen una respuesta inhibitoria. Por último se evaluó la proliferación en fibroblastos de cérvix normal a diferentes concentraciones de M-CSF, y las células mostraron una alta proliferación para todas las concentraciones. Estos resultados demuestran que el M-CSF también posee importantes efectos sobre la proliferación de células derivadas de carcinoma de cérvix humano (líneas CALO e INBL).

Palabras Clave: M-CSF, carcinoma cérvico-uterino, proliferación.

ABSTRACT

M-CSF has been recognised for a long time as a specific factor to induce growth and differentiation of monocyte-macrophage cells. In addition to these properties, M-CSF increases fagocytic and inflammatory activities against invaders such as bacteria and viruses. For this reason M-CSF has been used in several clinical trials, but without any clear results at present. Recently, the production of M-CSF has been reported in other tissues, ie., placenta, mammary gland and oviduct tract, although any proliferative effect has been detected so far. We demonstrated previously that M-CSF increases the proliferation of normal murine epithelial cells. Here we have extended our research to human tumoral cervical derived cells lines CALO and INBL cells. Our results showed that this factor has a proliferative effect on CALO and INBL cells when we used M-CSF at low concentrations. However, this effect was inhibited when the concentration of this factor was increased. On the other hand, when we used the same concentrations of M-CSF on normal cervical fibroblasts no inhibitory effect was observed. Taken together these results showed that M-CSF is a growth factor for the tumoral cell lines reported here.

Key Words: M-CSF, carcinoma, cervix, proliferation.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 18 DE AGOSTO DE 1998 Y ACEPTADO EL 29 DE OCTUBRE DE 1998.

INTRODUCCIÓN

La proliferación y la diferenciación hematopoyética está controlada por la participación de ciertos factores de naturaleza glicoproteica conocidos como factores estimuladores de colonias (FECs)^{1,2}.

Los FECs pertenecen a una superfamilia de modificadores biológicos conocidos genéricamente como citocinas, dentro

de las que se incluye a las interleucinas (IL-1 a IL-18), los interferones (INF: alfa, beta y gamma) y los factores de crecimiento: Factor Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Epitelial (EGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y Factor de Crecimiento Transformante (TGF)³⁻⁶.

Los FECs son polipéptidos monoméricos de varios cientos de aminoácidos, excepto el M-CSF que es un dímero constituido de dos subunidades de aproximadamente 35-45 kDa, la molécula madura tiene un peso molecular de entre 45-90 kDa⁷⁻⁹.

Laboratorio de Oncología, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES Zaragoza, UNAM. E-mail: jflavio@servidor.unam.mx

Los FECs juegan un papel importante en el microambiente hematopoyético estimulando la viabilidad, desarrollo, maduración y activación de células mieloides, a través de la unión a su receptor de alta afinidad presente en la membrana de las células hematopoyéticas^{10,11}.

Inicialmente, los FECs fueron descritos por su capacidad para favorecer el desarrollo mielo-monocítico; sin embargo, al evaluar su actividad biológica bajo diferentes condiciones, se puso en evidencia que poseían un espectro de acción mucho más amplio^{12,13}.

En la actualidad, se sabe que a diferencia de los otros FECs, el M-CSF es un factor altamente específico, ya que estimula exclusivamente el desarrollo y maduración de células del linaje monocito-macrófago, sin afectar a otros linajes mieloides¹⁴. Aunque el conocimiento de los efectos sobre la proliferación y la diferenciación de los FECs sobre las células mieloides es extenso, un aspecto de la biología de los FECs que no se ha esclarecido aún, es el papel que juegan estos factores sobre la proliferación de células epiteliales normales o células transformadas. Actualmente se ha demostrado por diferentes técnicas como radio-inmunoensayos, hibridación *in situ* análisis de Northern-blot, la síntesis de M-CSF por diversos tipos celulares como trofoblastos, endotelios, fibroblastos, células estromales de médula ósea, queratinocitos, osteoblastos, leucemia mieloblástica, leucemia linfoblástica, mieloma múltiple, carcinoma pancreático y en algunos adenocarcinomas como el de pulmón, mama, ovario, endometrio y la línea celular de ratón L929¹⁵. Nuestro grupo de trabajo demostró que el M-CSF desempeña un papel mitogénico en células epiteliales de ratón^{16,17}. Otros autores han aportado evidencias sobre el importante papel que el M-CSF juega sobre células del endometrio de ratón y humano en el desarrollo fetal/placental¹⁸. También se ha reportado la secreción de M-CSF en células epiteliales de la glándula mamaria en concentraciones de 10 a 100 veces mayores que las contenidas en suero¹⁹, demostrándose así, que el M-CSF tiene un papel importante en la producción y diferenciación de células no hematopoyéticas.

Por otro lado, se ha demostrado que el M-CSF tiene una actividad sinérgica con otras citocinas como la IL-2, IL-3, GM-CSF, TNF, PDGF, así como con progesterona y estradiol, en la producción y diferenciación de macrófagos¹⁵. Recientemente se encontró que el M-CSF tiene una actividad anti-tumoral y anti-inflamatoria. Estudios *in vitro* muestran que esta molécula posee una actividad citotóxica dependiente de anticuerpos, y estudios *in vivo* muestran una actividad antitumoral mediada por monocitos²⁰.

Debido a que en la actualidad los FECs se están utilizando con fines terapéuticos, sobre todo en pacientes con enfermedades oncológicas e infecciosas, es importante evaluar el efecto proliferador o inhibidor de estos factores en células no hematopoyéticas, tanto normales como tumorales para saber si es recomendable utilizarlos en todo tipo de tumores como una alternativa terapéutica.

Por lo antes expuesto, en el presente trabajo se evaluó el efecto del M-CSF en dos líneas epiteliales tumorales de cáncer cérvico-uterino (CaCu) (CALO e INBL) establecidas en nuestro laboratorio²¹⁻²³. Los resultados indican que el M-CSF tiene un efecto positivo sobre la proliferación de ambas líneas celulares a bajas concentraciones, sin embargo, cuando se aumenta la concentración se observa un efecto inhibitorio.

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS NORMALES A PARTIR DE BIOPSIAS DE CÉRVIX

Las células fibroblásticas se obtuvieron a partir de una muestra de tejido normal de cérvix, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a cáncer cérvico-uterino. Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en medio RPMI (Microlab, MEX) al 20% de suero fetal de bovino (SFB), (Highclone, USA) o suero fetal de caballo (SFC), (Microlab, MEX) a 4°C y procesada en las siguientes 2-3 hrs.

El procesamiento consistió en la separación por disección de la capa epitelial del tejido conjuntivo donde se encuentran los fibroblastos; ambas partes fueron cortadas por separado en trozos pequeños (5 mm) y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina (Sigma, Chemical, USA) al 1%. Las células obtenidas fueron lavadas por centrifugación (500 g) dos veces, posteriormente contadas con la ayuda de un hemocitómetro y sembradas nuevamente a 1×10^6 células/ml requerida para cada ensayo o cinética.

CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Las líneas celulares epiteliales CALO e INBL se obtuvieron a partir de biopsias de carcinoma de cérvix humano y fueron establecidas en nuestro laboratorio^{21,23}. Las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 5 mm (Nunclon, Denmark), en medio de cultivo RPMI-1640 (Microlab, MEX) al 10% de SFB (Highclone, USA) y mantenidas en una incubadora (Forma Scientific, USA) a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío durante 5 ó 6 días en promedio dependiendo de la línea.

PROLIFERACIÓN CELULAR

Para los ensayos de proliferación celular se sembraron 10,000 células normales ó 2,500 células tumorales por pozo en placas de 96 pozos (Nunclon Denmark), en presencia de diferentes concentraciones de M-CSF (Sigma, Chemical, USA) de 48 a 76 hrs; después de este tiempo se evaluó su actividad proliferadora. Como control positivo se emplearon, tanto el factor de crecimiento epitelial (EGF) (Sigma, Chemical, USA) como el factor derivado de plaquetas (PDGF) (Sigma, Chemical, USA), y como control negativo se utilizó únicamente RPMI suplementado con SFB al 10%.

CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE LA REDUCCIÓN DE MTT

Después de exponer las células a diferentes concentraciones de M-CSF durante un intervalo de tiempo de 48 y 76 hrs, se

evaluó la proliferación celular mediante la reducción de bromuro de 3 (4,5 dimetiliazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolium. MTT^{24,25}. Para esto se sembraron células viables (evaluadas por exclusión con azul de tripano) en placas de 96 pozos; después del tiempo de exposición al M-CSF (48 y 76 hrs), se adicionó a las células 50 µl de una solución de MTT (0.05 M) (Sigma, Chemical, USA) a cada pozo y se incubaron durante 3 hrs. Después de este tiempo, el medio y el MTT fueron removidos adicionando a cada pozo 100 µl de isopropanol para solubilizar el formazan; se dejó reposar 2 min y se evaluó la solución obtenida en un lector de ELISA (ELx 800, Bio-Tek, Instruments, Inc.) a 570 nm.

La absorbancia es directamente proporcional al número de células viables presentes después de 3 hrs de incubación.

RESULTADOS

EFECTO DEL M-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR INBL

Con la finalidad de evaluar el efecto del M-CSF en la proliferación de células de carcinoma de cérvix, se incubaron las líneas tumorales CALO e INBL en presencia de diferentes concentraciones de M-CSF.

Se incubaron 2,500 c/pozo de la línea celular INBL en presencia de una concentración inicial de 0.02 ng/ml de M-CSF y se observó un aumento en la proliferación con respecto al control negativo (células sin estímulo); sin embargo, al aumentar la concentración de M-CSF a 2 ng/ml se inhibe la proliferación de las células. Cuando se utilizó una concentración de 20 ng/ml no se observó una respuesta proliferativa de las células. Se utilizaron 3 ng/ml de EGF como control positivo y, como era de esperarse, se observó un aumento significativo en la proliferación de las células, ya que las estas son de origen epitelial (Figura 1).

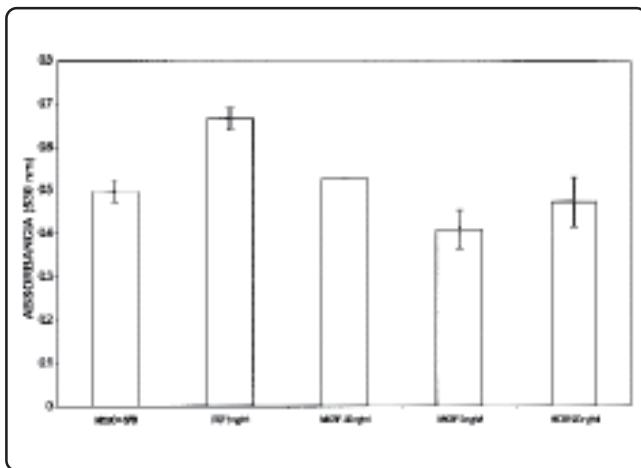


Figura 1. Efecto del M-CSF sobre la proliferación de la línea celular tumoral INBL. Se sembraron 2,500 células/pozo y se incubaron durante 48 hrs en presencia de 0.02, 2 y 20 ng/ml de M-CSF. Se evaluó la proliferación mediante la técnica colorimétrica de MTT. Como control negativo se usaron células sin EGF (medio+SFB), y como control positivo células estimuladas con EGF.

Debido a los resultados obtenidos antes mencionados, se decidió estimular nuevamente las células con M-CSF utilizando concentraciones 10 veces menor para ver si se observaba una diferencia significativa en la proliferación, utilizando como control negativo células sin estimular y como control positivo células estimuladas con EGF.

Cuando las células se incubaron en presencia de 0.01 ó 1 ng/ml de M-CSF se observó un aumento significativo en la proliferación de las células con respecto al control negativo (células con medio), y cuando se indujo con 1 ng/ml la proliferación disminuyó. Inclusive se presentó un efecto inhibitor al emplear una concentración 10 veces mayor de M-CSF (Figura 2).

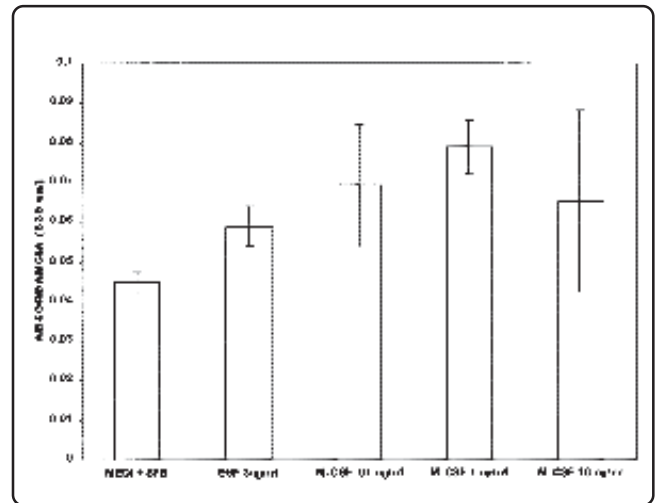


Figura 2. Efecto del M-CSF sobre la proliferación de la línea celular tumoral INBL. Se sembraron 2,500 células/pozo y se incubaron durante 48 hrs en presencia de 0.01, 1 y 10 ng/ml de M-CSF. Se evaluó la proliferación mediante la técnica colorimétrica de MTT. Como control negativo se usaron células sin EGF (medio+SFB), y como control positivo células estimuladas con EGF.

EFECTO DEL M-CSF SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR CALO

Para evaluar el efecto del M-CSF sobre la proliferación de la línea celular CALO se sembraron 2,500 células/pozo en presencia de diferentes concentraciones de M-CSF.

En este caso se observó un efecto semejante al obtenido para la línea celular INBL, en donde a bajas concentraciones, 0.02 ng/ml, se observó una proliferación significativa, y al aumentar la concentración a 2 ng/ml el efecto fue inhibitor de la proliferación. Cuando se utilizó una concentración de 20 ng/ml no se observó efecto alguno sobre la proliferación (Figura 3).

Nuevamente se estimularon las células de la línea celular CALO con M-CSF a concentraciones 10 veces menor para saber si existe una diferencia significativa en la proliferación utilizando como control negativo células sin estimular y como control positivo células estimuladas con EGF.

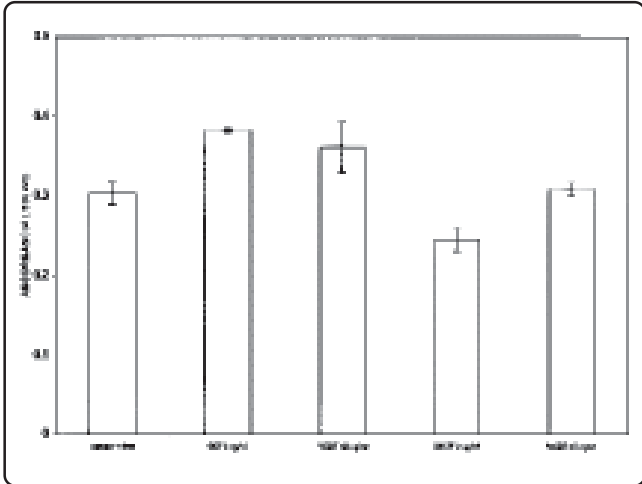


Figura 3. Efecto del M-CSF sobre la proliferación de la línea celular tumoral CALO. Se sembraron 2,500 células/pozo y se incubaron durante 48 hrs en presencia de 0.02, 2 y 20 ng/ml de M-CSF. Se evaluó la proliferación mediante la técnica colorimétrica de MTT. Como control negativo se usaron células sin EGF (medio+SFB), y como control positivo células estimuladas con EGF.

Cuando las células se incubaron en presencia de 0.01 ng/ml de M-CSF se observó un ligero aumento de la proliferación, el cual es muy significativo al aumentar la concentración a 1 ng/ml. Cuando se utilizó una concentración de 10 ng/ml no se observó un efecto proliferador ni un efecto inhibitor (Figura 4).

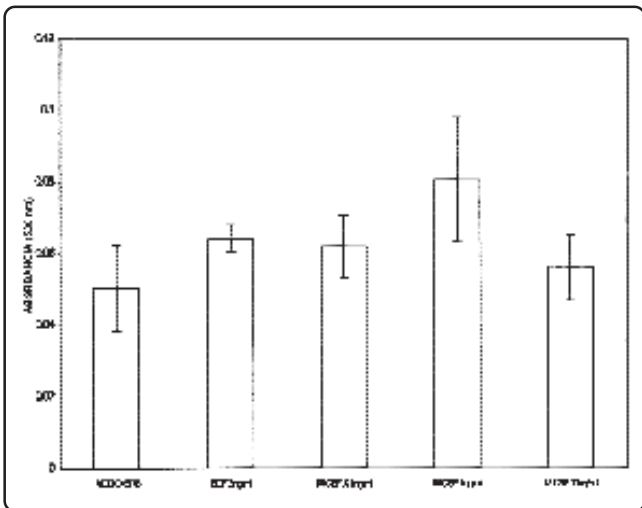


Figura 4. Efecto del M-CSF sobre la proliferación de la línea celular tumoral CALO. Se sembraron 2,500 células/pozo y se incubaron durante 48 hrs en presencia de 0.01, 1 y 10 ng/ml de M-CSF. Se evaluó la proliferación mediante la técnica colorimétrica de MTT. Como control negativo se usaron células sin EGF (medio+SFB), y como control positivo células estimuladas con EGF.

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS DE CÉRVIX NORMAL EN PRESENCIA DE M-CSF

Por último, para corroborar que el efecto del M-CSF sobre las células tumorales era real se realizó la misma evaluación en fibroblastos de cérvix normal, ya que en este tipo celular se ha demostrado que el M-CSF induce la proliferación celular.

Con la finalidad de evaluar el efecto del M-CSF sobre fibroblastos normales de cérvix, se obtuvieron células a partir de biopsias normales de cérvix por disgregación enzimática y se sembraron 10,000 células/pozo en presencia de diferentes concentraciones de M-CSF.

Se observó un aumento significativo en la proliferación de los fibroblastos al utilizar 0.02, 2 ó 20 ng/ml de M-CSF, confirmándose con esto que el efecto observado en las células tumorales es real (Figura 5).

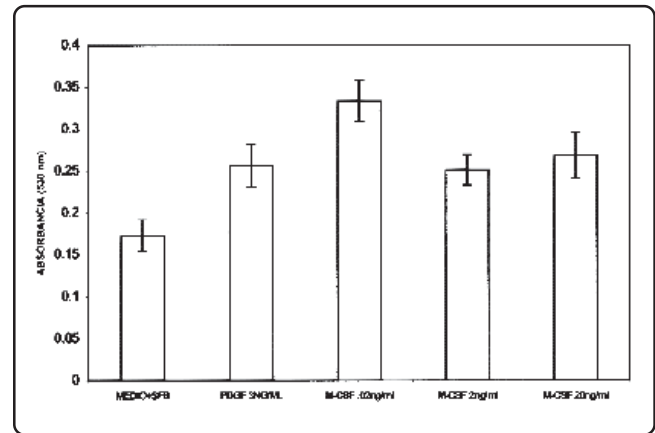


Figura 5. Efecto del M-CSF sobre la proliferación de fibroblastos de cérvix normal. Se sembraron 10,000 células/pozo y se incubaron durante 76 hrs en presencia de 0.02, 2 y 20 ng/ml de M-CSF. Se evaluó la proliferación celular mediante la técnica colorimétrica de MTT. Como control negativo se usaron células sin EGF (medio+SFB), y como control positivo células estimuladas con PDGF.

DISCUSIÓN

El M-CSF es un factor con un espectro de acción biológica muy amplio, aunque todavía no se esclarece el papel que pudiera tener este factor sobre células de origen no hematopoyético o en células transformadas, a pesar de que ya se ha evaluado su efecto en células de origen epitelial normal. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó el efecto que tiene el M-CSF sobre la proliferación de células epiteliales de líneas tumorales de cérvix (CALO e INBL). Cuando se utilizan concentraciones bajas se observa un efecto estimulador de la proliferación celular, que fue más evidente en la línea celular INBL. Esto podría deberse a que esta línea se obtuvo de un carcinoma en un estadio clínico IVB, el cual representa un tumor avanzado con metástasis y se trata de células más indiferenciadas, las cuales pueden expresar una cantidad mayor de receptores a este factor y la línea CALO presenta un estadio clínico IIB en el que el tumor se encuentra bien localizado y aún no hay metástasis y puede presentar menor número de receptores. Por otro lado, conforme se incrementa la concentración de M-CSF (2 y 1 ng/ml) disminuye la proliferación en ambas líneas celulares y se observa una inhibición de la proliferación de estas células; efecto probablemente debido a que los receptores de membrana para esta molécula han sido ocupados y se encuentran saturados, razón por la cual no se observa una mayor respuesta proliferativa. También pudiera explicarse en

términos de recambio o reciclamiento del receptor para M-CSF. Probablemente después de unirse e ligando a su receptor se internaliza y si se mantiene el estímulo con M-CSF se induce reciclamiento del receptor a la membrana celular y se inicia nuevamente un ciclo de proliferación.

Por su parte, estos datos contrastan notoriamente con los encontrados en células epiteliales normales, en los que se reporta que al incrementar la concentración de M-CSF existe un claro efecto dosis-respuesta¹⁸. En este caso sería interesante evaluar si la respuesta a bajas concentraciones está en función de la densidad del receptor de las células tumorales y también resulta necesario comparar la densidad de receptores presentes en células normales, ya que de demostrarse este hecho nos estaría indicando una clara influencia de esta molécula en la proliferación de células epiteliales tumorales.

Cuando se evaluó el efecto del M-CSF en fibroblastos de cérvix humano, los resultados mostraron que hay inducción de la proliferación significativa, lo cual demuestra la fuerte capacidad mitógena del M-CSF en fibroblastos y concuerda con datos ya reportados para esta molécula⁶. Estos resultados sugieren que las células normales inducen la expresión de receptores, mientras que las células tumorales parecen expresar constitutivamente una cierta densidad de receptores que pueden saturarse rápidamente, por lo cual no responden a altas concentraciones de M-CSF. Sin embargo, esto se debe demostrar para poder hacer generalizaciones. Los resultados aquí presentados muestran que el M-CSF tiene un claro efecto proliferador en las dos líneas tumorales de células epiteliales de cérvix humano: CALO e INBL, lo que estaría indicando una función más general de esta molécula en la proliferación de células epiteliales normales y tumorales, representando capacidades aún no demostradas para células epiteliales tumorales, indicando esto que si las células tumorales proliferaron en respuesta al M-CSF, se debe evaluar la pertinencia de usarse como tratamiento terapéutico, ya que se están utilizando estos agentes en pacientes con ciertos tipos de tumores (pulmón, mama, ovario y endometrio). Sería conveniente evaluar el efecto de estos factores estimuladores de colonias en los pacientes para evitar una mayor proliferación de las células tumorales.

REFERENCIAS

1. Elger KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 1988; 64(3): 275-290.
2. Takahashi K, Naito M, Takeya M. Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int* 1996; 46(7): 473-485.
3. Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Karimoto M, Clambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT. Interleukin-18 (Interferon γ -inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- γ to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med* 1997; 185: 1005-1012.
4. Fixe P, Praloran V. M-CSF: hematopoietic growth factor or inflammatory cytokine? *Cytokine* 1998; 10(1): 32-37.
5. Rausel MF. Regulation of cell cycle entry and G1 progression by CSF-1. *Reprod Dev* 1997; 46(1): 11-18.

6. Raugier F, Dupuis F, Denizot Y. Human bone-marrow fibroblast: an overview of their characterization proliferation and inflammatory mediator production. *Natol Cell Ther.* 1996; 38(3): 241-6.
7. Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, Yeung YG. Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev* 1997; 46(1): 4-10.
8. Motoyoshi K. Biological activities and clinical application of M-CSF. *Int J Hemathol* 1998; 67(2): 109-122.
9. Mendoza JF, López R, Machuca L, Sánchez L, Hernández J, Weiss-Steider B. Revisión: Los factores estimuladores de colonias (CSFs) y las interleucinas (ILs): reguladores de la producción hematopoyética. *Sangre* 1993; 38: 309-315.
10. Ketns K. Structure and function studies on human macrophage colony stimulating factor (M-CSF). *Reprod Dev* 1997; 1: 31-37.
11. Gillis S. Cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 315-321.
12. Pellard JW. Role of colony stimulating factor-1 in reproduction and development. *Reprod Dev* 1997; 46(1): 54-60.
13. Kacinsqui BM. CSF-1 and its receptor in breast carcinomas and neoplasms of the female reproductive tract. *Reprod Dev* 1997; 46(1): 71-74.
14. Ralp P, Sampson-Johannes A. Macrophage growth and stimulating factor M-CSF. *Hematopoietic Science* 1990; 238: 1374-1379.
15. Bharat B, Aggarwal PD, Jordan U, Gutterman MD. *Human Cytokines*. Blackwell Scientific Publications. 1992: 81-97.
16. Mendoza JF, Machuca RC, Weiss-Steider B. Evidencia de que las actividades estimuladoras de colonias presentes en medios condicionados de células epiteliales y fibroblásticas estimulan la proliferación de células no hematopoyéticas. XXXII Jornada Anual AMEH. Xalapa, Ver. 1991.
17. Mendoza JF, Sánchez L, López MR, Hernández MJ, Machuca RC, Weiss-Steider B. Evidences that M-CSF induces proliferation of murine normal epithelial cell. *Rev Invest Clín* 1994; Suplemento, Abril.
18. Hideharu K, Hiroshi H, Shinji N, Masatoshi K, Jun F, Takahide M. Hormonal regulation in the production of macrophage colony-stimulating factor and transforming growth factor-beta by human endometrial stromal cells in culture. *Horm Res* 1995; 44: 30-35.
19. Hara T, Irie K, Saito S, Ichijo M, Yamada M, Yanai N, Miyazaki S. Identification of macrophage colony-stimulating factor in human milk and mammary gland epithelial cells. *Pediatric Res* 1995; 37: 437-443.
20. Fumihiko K, Miyuki D, Jun O, Toshiro M, Kazuma Y, Yukitsugu N, Ken S, Muneo Y, Naokazu N, Kazuo M. Augmentation of antitumor immunity using genetically M-CSF-expressing L1210 cells. *Exp Hematol* 1996; 24: 360-363.
21. Rangel CR, Monroy GA, Rocha ZL, Trejo BC, Ramírez GL, Darío MR, Weiss SB. Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleina-1. *Oncología* 1992; 7: 79-63.
22. Rangel CR, Rocha ZL, Monroy GA, Trejo BC, Ramírez GL, Darío MR, Weiss SB. Establecimiento y caracterización de la línea celular CALO y el clon KaLo obtenidas a partir de un carcinoma de cérvix y el efecto de IL-2, IL-3, GM-CSF, M-CSF, TNF e INF sobre su proliferación. *Cancerología* 1993; 39(3): 123-127.
23. Rangel CR, Monroy GA, Ibarra SJ, Herrera VL, Rocha LZ, Ramírez LJ, Herrera GA, Medina AC, Weiss SB. Evidence of the malignant origin of two cervical cancer cell lines, INBL and CALO. *Proceedings of the XVI International Cancer Congress*. Moduzzie editors 1994; 3: 2287-2291.
24. Francois D, Rita L. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J Immunol Met* 1986; 89: 271-277.
25. Eiichi K, Shiro S, Toshimitsu S, Erik DC. Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. *Antiviral Res* 1996; (31): 159-164.