



13
20j
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

ACTIVACION A LA PROLIFERACION Y CONJUGACION
DE LINFOCITOS POR MEDIO DEL CO-CULTIVO DE LEU-
COCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA CON ESTIR-
PES CELULARES PROVENIENTES DE DIFERENTES TUMORES
Y EL EFECTO DE INTERLEUCINA - 2 EN ESTE PROCESO.

T E S I S

Que Para Obtener el Título de:

B I O L O G O

Presenta:

ALBERTO MONROY GARCIA

México, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.	RESUMEN	1
II.	MARCO TEORICO	2
	1.0 Cultivo de tejidos animales	2
	2.0 Diferenciación celular y cáncer	5
	3.0 El sistema inmune y su actividad antitumoral	9
III.	METODOLOGIA	41
IV.	RESULTADOS	46
V.	DISCUSION	61
VI.	CONCLUSIONES	65
VII.	APENDICES	66
VIII.	BIBLIOGRAFIA	73

I. RESUMEN

Actualmente, el estudio de la inmunología tumoral ha cobrado gran importancia, ya que es bastante conocido el papel que juegan las células mononucleadas de sangre periférica y sus secreciones reguladoras en la respuesta inmune. Entre estas secreciones se encuentra la producida por linfocitos T llamada Interleucina-2 (IL-2), que activa la proliferación y diferenciación de subpoblaciones de linfocitos T. La IL-2 además de aumentar la activación in vitro de células asesinas naturales (NK), también incrementa su citotoxicidad.

Por otro lado, se ha encontrado que la conjugación in vitro entre leucocitos de sangre periférica y células tumorales está directamente relacionada con el tiempo de doblaje que presentan las células malignas.

El presente trabajo, se efectuó con la finalidad de determinar el efecto de IL-2 sobre la proliferación de células tumorales humanas en presencia de células mononucleadas. Para ello, se realizaron co-cultivos de leucocitos de sangre periférica de donadores normales (LSP) con células provenientes de cuatro tumores (un carcinoma de tiroide (CT-86); un carcinoma basocelular (CBA-86); un carcinoma de pulmón (CP1-1) y un osteosarcoma (OSX-4)) y una estirpe de fibroblastos normales provenientes de prepucio sano (VC-2) en presencia y ausencia de interleucina-2 recombinante (rIL-2). Encontrándose que los linfocitos inhiben por si solos la proliferación de las células provenientes de tumores y que esta inhibición se vió significativamente incrementada en presencia de rIL-2. Asimismo, se discute que una función asociada al linfocito (LFA-3) sea un factor ciclo dependiente en el fenómeno de conjugación entre LSP con células tumorales.

Finalmente, se discute la utilidad de un ensayo in vitro que pueda contribuir al entendimiento del proceso inmune de rechazo y el disponer de una herramienta que permita mejorar los diagnósticos y tratamientos de pacientes con cáncer empleando la Inmunoterapia Adoptiva.

II. MARCO TEORICO

1.0 CULTIVO DE TEJIDOS ANIMALES

Uno de los principales objetivos del estudio de las células en cultivo es determinar sus funciones y sus quehaceres más inmediatos (1), así como el interpretar la relación que guarda con su ambiente natural y de esta manera facilitar el entendimiento de los procesos biológicos en que toman parte (2).

La técnica de cultivo de tejidos es una herramienta que se utiliza como base experimental en varias ramas de la investigación (Inmunología, Genética, Embriología, Diferenciación Celular, etc.). Desde su origen se han realizado innumerables esfuerzos tratando de optimizar esta técnica, estableciéndose las condiciones favorables para el crecimiento, desarrollo y proliferación de las células.

Los estudios iniciales para tratar de mantener células en cultivo se dan a principios del siglo XIX con las observaciones de Schwann al describir a las células como entes rodeadas por una materia llamada citoblastoma el cual contiene material para su nutrición (3). Posteriormente Claude Bernard en 1878 demostró la importancia del medio interno al estudiar las propiedades de las células y los factores que las afectan (3, 4).

Más tarde, los experimentos de Wilhelm Roux en 1885, F Dvon Recklinghausen en 1886, Arnold en 1887 y Ljunggren en 1898, dieron la pauta para emplear fluidos biológicos (plasma sanguíneo, suero, exudados y extractos de órganos y tejidos) para mantener a las células fuera del organismo (4,5, 6). De esta forma, la técnica de cultivo de tejidos se utilizó para estudiar los elementos estructurales del organismo, tal como lo hizo Harrison en 1907 (tomado de 5).

Hasta este momento, se sostenía la premisa de que los fluidos biológicos empleados como medio de crecimiento contenían factores necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Sin embargo, aún existían interrogantes acerca de las necesidades nutricionales de las células (6,7).

De esta manera surgen los primeros intentos encaminados a establecer medios de cultivos definidos en su composición (4). En 1911 Baker y Carrel observaron que tejido de embrión de pollo sobrevivía en solución de Lockes suplementada. Estudios más detallados, permitieron dar a conocer en 1926 que peptonas, proteasas y otros derivados de la degradación de proteínas al ser

suplementados con suero y plasma, proveían nutrientes esenciales para las células. Tales hechos fueron confirmados por Vogelaar y Erlichman en 1933 al encontrar que algunos aminoácidos, glucosa y ciertas sales permitían el crecimiento celular (6).

Fisher en 1940, empleando plasma, suero y extracto de embrión dializado obtuvo mejores resultados (4, 8). Pero no fué sino hasta 1946 cuando White reportó el primer medio de composición conocida (tomado de 7). Más tarde Morgan, Morton y Parker en 1950 enriquecen estos medios con vitaminas, aminoácidos esenciales, constituyentes de ácidos nucleicos y factores de crecimiento accesorios para promover continuamente la proliferación celular (8).

Posteriormente, los estudios hechos por Eagle en 1958 confirmaron que dichos nutrientes son requeridos por diversas células de mamíferos. Las variaciones de algunos componentes dieron lugar a la creación de un medio basal compuesto de 12 de los 20 aminoácidos esenciales (9). Estos resultados establecieron los fundamentos para la elaboración de diferentes medios de cultivo, algunos ejemplos son el medio de Mc Coys 5A usado como medio estándar para la clonación celular y el medio de Ham's F10 específico para la clonación de células diploides de ovario de hamster (10). Asimismo, el desarrollo de los medios definidos coincidió con el establecimiento de cultivos a largo plazo. La disponibilidad de una población celular relativamente estable y homogénea fué valiosa para los investigadores. No obstante, el desarrollo de los medios definidos no es la solución al problema ya que los medios son suplementados con suero en su gran mayoría por lo cual son considerados como incompletos independientemente de contener factores estimuladores del crecimiento celular. Además, no se conoce ciertamente el efecto de alguno de estos factores como el transferrín/férrico y su papel en el metabolismo celular (7).

Aún cuando estos medios contienen variedades y cantidades de aminoácidos, vitaminas, sales y otros nutrientes, ninguno de estos mantiene el crecimiento de las células in vitro sin el suplemento de un suero ya sea el de fetal de bovino o el de caballo (7).

El suero es una sustancia muy compleja y ha sido muy pobremente caracterizada, aunque contiene muchos factores que han sido definidos estos pueden disminuir el crecimiento y diferenciación de algunos tipos celulares. Las hormonas que son importantes componentes del suero pueden enmascarar, -

disfrazar, estimular o inhibir los elementos metabólicos bajo estudio. No obstante su uso posterior es complicado por el hecho de que su composición varía de lote a lote

Otro grupo de investigadores encabezado por Ham a partir de 1965, basándose en los estudios de Lewis y Warren (tomado de 12 y 13) establecieron los factores necesarios para el crecimiento de las células en cultivo in vitro así como de las condiciones indispensables de tal manera que las optimizaron básicamente en: a) un sustrato o superficie de crecimiento; b) sales inorgánicas en el medio de cultivo, gases disueltos (O_2 y CO_2); c) variables fisicoquímicas tal como la temperatura ($37^\circ C$), pH (6.8-7.2), osmolaridad potencial redox, y un sistema amortiguador en el medio de cultivo; d) nutrientes esenciales para la biosíntesis y el metabolismo, entre estos los azúcares, aminoácidos, vitaminas, componentes nucleicos y elementos trazas; e) factores reguladores y hormonales para la multiplicación celular; f) el uso de antibióticos como la penicilina y la estreptomycin para auxiliar la esterilidad del medio; g) humedad saturante en el medio de cultivo (10%) y h) las técnicas de manejo de células durante el cultivo y subcultivo (14).

Algunos investigadores han tratado de desarrollar un medio totalmente definido. Recientemente Sato y sus colaboradores en 1982 determinaron la importancia de las hormonas en el cultivo de tejidos glandulares, lo que llevó a crear medios suplementados con hormonas y de esta manera eliminar eventualmente la "caja negra" que representa el uso del suero (11).

Después de que se han logrado optimizar las concentraciones de los componentes del medio de cultivo así como las condiciones necesarias para favorecer la fijación, y el crecimiento celular se ha tenido gran avance en el campo del cultivo celular. Lo que ha permitido actualmente mantener diversas poblaciones celulares durante varios subcultivos, ya sea que preserven el cariotipo que caracteriza el tejido de origen (estirpes celulares) o que durante períodos indefinidos en subcultivo cambie el número cromosómico (líneas celulares). Obteniéndose así, tanto estirpes como líneas celulares normales y tumorales (carcinomas y sarcomas), con el propósito de establecer métodos diagnósticos a nivel celular, en los cuales el comportamiento de ambas sea descrito. Por lo tanto, los resultados obtenidos in vitro son de relevante importancia para el entendimiento de los procesos neoplásicos in vivo (12).

2.0 DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

2.1 DIFERENCIACION Y DESDIFERENCIACION CELULAR

La diferenciación consiste en la formación de células disimilares a -- partir de células precursoras similares. De de esta manera, a partir del desarrollo de un óvulo fertilizado hasta formar un niño requiere en promedio de una sucesión de 2^{41} mitosis, pero además de esto, las células hijas producidas por estas divisiones mitóticas deben entrar en caminos separados de desarrollo; algunas llegan a ser glóbulos rojos, otras se transforman en oocitos (óvulos), otras en músculo liso, etc, (15).

La diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula -- primitiva, aún sin características funcionales específicas, llega a convertirse luego de una serie de modificaciones progresivas reguladas en una célula morfológica y funcionalmente especializada, perdiendo así la totipotencialidad de que estaba dotada (16). La diferenciación celular es considerada -- por algunos autores como un proceso intracelular, que implica la interacción del núcleo y citoplasma de una sola célula, en donde su genotipo no sufre -- cambios. Este proceso se lleva a cabo gradualmente , con múltiples estadios intermedios en la que es difícil definir las células diferenciadas de las no diferenciadas. En realidad, los distintos tipos de células que constituyen -- los tejidos y órganos no están en el mismo grado de diferenciación (17).

Conforme procede el desarrollo, la totipotencialidad de la célula es -- cada vez más limitada, dando lugar gradualmente a la formación de células diferenciadas. Antes de que la diferenciación celular se manifieste, hay un período de determinación, en el cual las células siguen una ruta particular de diferenciación, así como una ruta metabólica especial. Los cambios que se -- presentan para que se lleve a cabo esta selección son internos pero en parte se deben a cambios en el ambiente, además son estables y las células heredan sus diferencias de una generación a otra (18). Los diferentes tipos de células se distinguen porque además de tener proteínas para su mantenimiento, -- producen un grupo de proteínas especializadas que las caracterizan, por ejemplo las células de la epidermis producen queratina, los eritrocitos contienen hemoglobina y las células del intestino producen enzimas digestivas. No obstante, se ha encontrado que la síntesis de proteína durante la diferenciación celular depende de la transcripción diferencial de ciertos genes -- (19).

La diferenciación toma un papel muy importante sobre el crecimiento - en un sentido espacial de los diferentes órganos desde su origen en las células embrionarias. No obstante se conoce que existen genes reguladores del crecimiento llamados homeóticos y que estos determinan dentro de ciertos límites un volumen constante para los distintos órganos e incluso para las -- distintas especies (20).

Por otra parte, existe un proceso al cual se le ha denominado desdiferenciación y se considera que es contrario a la diferenciación. Este proceso es asociado en el curso normal de la vida de todas las células, pero -- cuando este curso se modifica con desviaciones, reversiones o cambios atípicos en su biología, puede dar lugar a funciones excretoras patológicas, degeneración maligna o muerte celular. Parece ser que la desdiferenciación - estimula la multiplicación celular, mientras que la diferenciación tiende a frenarla (16).

2.2 NEOPLASIAS BENIGNAS Y MALIGNAS

El proceso de reproducción y de diferenciación celular están estrechamente ligados a la biología de todo organismo vivo. La proliferación celular es fundamental en el mantenimiento de la vida. En el organismo adulto - gran parte de las células están constantemente degenerándose y muriendo, y posteriormente son eliminadas. Este proceso se realiza en la gran mayoría - de los tejidos, manifestándose mucho más en los epitelios y tejidos linfomatosos. El organismo y los tejidos para compensar esta pérdida continuamente está produciendo nuevas células que sustituyan la función de las - que desaparecen. Pero cuando existen expresiones orgánicas de nuevas formaciones tisulares originadas a expensas de un grupo celular localizado en un área determinada de tejido, por aumento absoluto de las células debido a -- una multiplicación progresiva y aparentemente autónoma del control tisular, se da lugar a una neoplasia (16, 21, 22).

Las neoplasias se dividen en dos grupos dependiendo de sus propiedades específicas: Neoplasias Benignas, cuando la neoformación tisular mantiene una diferenciación morfológica normal, frecuentemente presenta encapsulamiento, no invade tejidos periféricos, su crecimiento es lento y por lo general presentan bajas tasas mitóticas y su grado de expresión sintomática - depende de su ubicación anatómica y de su capacidad para transformarse en - una neoplasia maligna. Las Neoplasias Malignas, llamadas comúnmente cáncer.

crecen por invasión de las estructuras y tejidos circundantes incluyendo vasos sanguíneos, vasos linfáticos y conductos nerviosos, son pobremente diferenciadas, de crecimiento rápido, tienen altas tasas de mitosis, su crecimiento autónomo da lugar al proceso conocido como evolución del tumor y a diferencia de las Neoplasias Benignas producen metástasis (transferencia de la enfermedad desde un órgano afectado a otro no directamente conectado con este), (13, 23).

2.3 CICLO CELULAR Y CANCER

Un ciclo celular es el período existente desde el origen de una nueva célula hasta el momento en que esta misma se divide, y está constituido por una secuencia de procesos metabólicos o fases. La mayoría de los eventos ocurren en tiempos definidos antes que la división celular tenga lugar. Después de la segregación de los cromosomas, el ADN nuclear se replica, al igual que parte de las mitocondrias. El resto de los organelos se fabrica bajo la orientación del ADN nuclear, ya que no tienen capacidad autoreplicativa. La replicación del ADN es quizás el fenómeno más importante, porque el material genético debe ser copiado exactamente y cada célula hija debe recibir una versión completa. En el núcleo celular, la replicación del ADN ocurre solamente en una fase específica del ciclo celular, una fase llamada S, que significa síntesis. Entre la división y la S hay un período llamado G_1 , que significa (Gap: del inglés espacio, brecha), en la cual las células crecen pero no fabrican ADN. En G_1 muchas moléculas, incluyendo enzimas son sintetizadas (21).

Las células en los cultivos de tejidos están ya sea en estado de crecimiento o en estado de reposo llamado G_0 . En este último continúan usando energía, pero no sintetizan ADN ni se dividen. Cuando las células normales detienen su crecimiento, por lo general pasan al estado de reposo, usualmente las células animales abandonan el ciclo desde G_1 , pero no desde S o G_2 , para alcanzar este estado. Se cree que en la fase G_1 existe un mecanismo especial que determina como las células deben proceder a través del ciclo. Las células pueden retornar de G_0 a G_1 si se les estimula adecuadamente con nutrientes u hormonas (16, 21).

Se ha debatido mucho sobre la velocidad de multiplicación de las células cancerosas. Esta puede ser muy rápida, pero probablemente no excede la del feto humano en las primeras etapas de desarrollo y sin dudas es inferior

al de las células espermatozógenicas en el momento más alto de la actividad reproductora (15).

La multiplicación celular evidentemente no se observa con la misma magnitud en todos los cánceres. La fase G_1 muestra una variación variable (generalmente entre unas horas y varios días). La fase S tiene una duración de entre 8-30 días y la fase G_2 tiene también una duración constante hasta que se inicia la mitosis. La fase M alcanza solamente de 30-90 min. Se denomina --- tiempo de generación al espacio de tiempo que se necesita para completar el ciclo celular. Dada la variabilidad de la fase G_1 se considera es la responsable de los tiempos de generación. Algunos tipos de células son vegetativas o también llamadas de tipo quiescente o Q ó también designadas como de fase G_0 que prácticamente son G_1 . Esto tiene una gran importancia en las neoplasias, ya que el mayor o menor grado de quiescencia de estas células es un factor determinante en el crecimiento y desarrollo de las mismas, (16,19, 22).

En la primera fase del desarrollo de una neoplasia, el crecimiento de la misma es exponencial durante un tiempo determinado, pero cuando alcanza un volumen definido, el crecimiento disminuye progresivamente hasta llegar un momento en el cual deja de crecer. A este comportamiento se le conoce como crecimiento de Gompertz, el cual está basado en una ecuación matemática que toma en cuenta distintos parámetros como la fracción de crecimiento y el tiempo de doblaje (13).

En general, los tumores humanos crecen lentamente si se comparan con los tejidos normales correspondientes. Por ejemplo, el cancer de mama diseminado se ha visto que tiene tiempo de generación poco más de dos días, sin embargo, los tiempos de doblaje que realmente se pueden medir varían entre 30 y 90 días e incluso en más. Estos hechos permiten explicar, el porqué algunas neoplasias son capaces de tener un tiempo de generación de tan sólo 48 horas, y no obstante no son capaces de duplicar su volumen en pocos días. Esto se debe únicamente a que no todas las células son proliferantes, sino solo aquellas que precisamente tienen una actividad efectiva de crecimiento - (22, 23).

3.0 EL SISTEMA INMUNE Y-SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Nuestro ambiente contiene una gran variedad de agentes microbianos infecciosos (virus, bacterias, aquellos provenientes de parásitos y también de células cancerosas). Cualquiera de ellos puede causar daños patológicos y si estos se multiplican invariablemente, pueden causar la muerte del huésped. El hecho de que la mayoría de los individuos normales soporten la mayoría de las infecciones teniendo daños poco permanentes, es debido a que existe en el organismo un mecanismo de vigilancia y protección llamado Sistema Inmune. Este sistema presenta una gran especificidad ante distintos cuerpos extraños además de desarrollar una memoria de larga duración para reconocer al agente patógeno cuando es percibido nuevamente (24).

El estudio del Sistema Inmune y sus funciones es conocido con el nombre de Inmunología. Para tal efecto, este ha sido dividido en dos partes funcionales: El Sistema Inmune Innato y el Adaptativo, los cuales consisten de una gran variedad de moléculas y células distribuidas a través del organismo (25).

3.1 EL SISTEMA INMUNE INNATO

El exterior del cuerpo presenta una barrera efectiva ante muchos organismos, en particular muchos agentes infecciosos que no pueden penetrar directamente a través de la piel.

Cuando estos mecanismos protectores superficiales fracasan en su intento para detener la invasión de organismos patógenos, se ponen en marcha respuestas inespecíficas llevadas a cabo por células fagocitarias: monocitos y macrófagos (Mφ) así como neutrófilos polimorfonucleares. Aunadas a estos tipos de células, las células asesinas naturales (NK: del inglés Natural Killer) son las responsables de la Inmunidad Natural. Todas ellas tienen su origen en la médula ósea y atacan a las partículas extrañas, incluyendo agentes infecciosos, mediante lisis (citólisis) o inhibiendo su crecimiento (citótaxis), (Figura 1), (24).

Para este propósito estas células se encuentran estratégicamente situadas en el organismo, ya que son capaces de migrar de los vasos sanguíneos a diversos tejidos en donde son requeridas.

Los neutrófilos son células de vida corta y poco permanentes ya que por lo general mueren durante el ataque con el agente infeccioso (26).

Por su parte, los monocitos y macrófagos exhiben una remarcada hetero

NEUTROFILO POLIMORFONUCLEAR

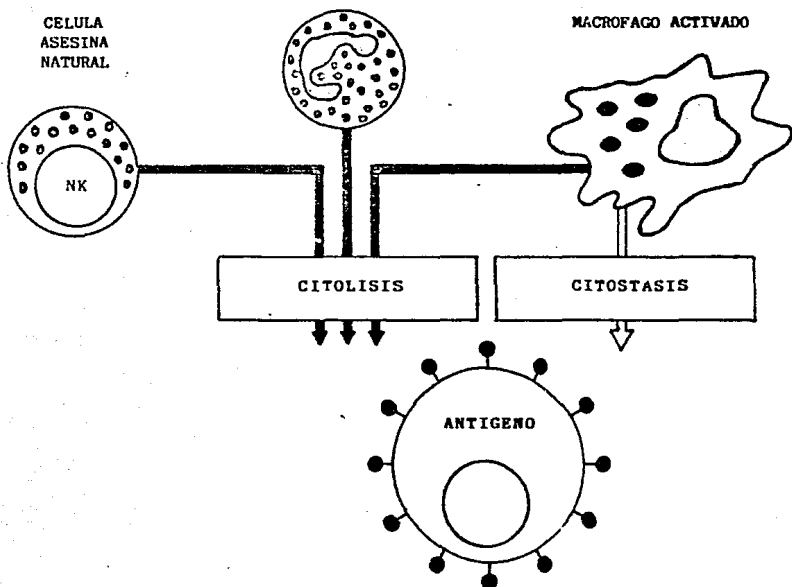


FIGURA 1. CELULAS PARTICIPANTES EN LA INMUNIDAD NATURAL O INNATA Y SUS MECANISMOS DE ACCION. La inmunidad natural es mediada por macrófagos activados, neutrófilos y células NK. Su acción puede ser citolítica, causando la lisis del antígeno o cistostática, inhibiendo su crecimiento. Este tipo de inmunidad no requiere anticuerpos y no actúa sobre antígenos específicos.

genidad funcional y morfológica, además de presentar gran especialización en cuanto a la inmunidad e inflamación (27). No obstante, independientemente de su localización, los M ϕ pueden servir para mostrar y transportar antígenos o proteínas alteradas hacia células citotóxicas específicas. Además, como efectores, los M ϕ generalmente expresan poca citotoxicidad a menos que sean activados por ciertas sustancias que actúan directamente con ellos. La activación es caracterizada por varios cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales. Los M ϕ activados, con frecuencia no son específicamente citotóxicos a las líneas celulares tumorales in vitro, las cuales carecen de inhibición por contacto (28, 29).

El proceso citotóxico llevado a cabo por los M ϕ , involucra una serie de eventos tanto citolíticos como citostáticos. La destrucción del tumor no necesariamente resulta de un proceso fagocítico, sino que después de establecerse un contacto con la célula tumoral, varias sustancias efectoras secretadas por el M ϕ activado son las responsables de la muerte celular (30).

Se ha encontrado también que los M ϕ tienen efectos negativos sobre algunas funciones inmunes, esta actividad supresora es un mecanismo regulatorio normal y anormalmente puede ser aumentado por la presencia de algún tumor, debido a que tanto los M ϕ como los tumores son fuente de prostaglandina (PGE₂) la cual inhibe la respuesta linfoproliferativa así como algunas respuestas independientes de la proliferación de linfocitos (31).

En común con los M ϕ , las células NK se han considerado como células efectoras de la inmunidad natural por su habilidad para lisar una amplia variedad de células blanco (células transformadas, células infectadas por virus o derivados de embriones), (12).

En el hombre la principal célula NK es el linfocito granular grande -- (LGL: del inglés Large Granular Lymphocyte), llamados así por sus gránulos azurofílicos intracitoplásmicos y gran radio nuclear citoplásmico. Estas células comprenden aproximadamente 2.5% de los linfocitos de sangre periférica. Experimentos realizados a un simple nivel celular, indican que no todos los LGL son líticos y no todas las células líticas son LGLs. La actividad NK aparte de ser encontrada en la sangre periférica, también está dada en bazo, un poco menos extendida en nódulos linfáticos, médula ósea, ducto torácico y timo. Las células NK al parecer carecen tanto de memoria inmunológica como del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Sin embargo se ha visto que expresan receptores de membrana Fc (32).

La actividad NK, está sujeta a una regulación tanto positiva como negativa, en este mecanismo regulatorio su proliferación está bajo el control de células T, en la que mediante un factor soluble, Interleucina-2 (IL-2), puede inducir la proliferación y estimular la actividad NK de estas células proliferantes. Otro factor soluble, el Interferon (IFN), induce la expresión de receptores para IL-2 sobre células NK para incrementar la proliferación. No obstante el IFN tiene un efecto regulatorio sobre las células T para reducir su actividad, este mantiene un doble papel: por un lado, transforma los precursores NK no citolíticos en un estado lítico y por otro lado, aumenta la capacidad citolítica de las células activas disponibles (33, 34).

El papel biológico de las células NK aún es incierto, ya que todavía no queda claro que estas células sean una línea celular distinta con o sin diversidad de receptores clonalmente distribuidos, varias líneas celulares, o una fracción que puede ser expresada por una variedad de tipos celulares (24, 25).

3.2 EL SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO

Este sistema está basado en la especificidad de anticuerpos y linfocitos ante un antígeno (agente patógeno) particular.

Siendo los linfocitos los componentes celulares antígeno-específicos que actúan mediante receptores de membrana para poder interactuar.

Existen dos tipos de linfocitos con funciones diferentes: los linfocitos B que producen anticuerpos (receptores) como respuesta ante un antígeno, dando lugar a la Inmunidad Humoral; y el otro tipo lo forman los linfocitos T que son los responsables de la respuesta Inmune Celular, estos actúan mediante una interacción membrana-membrana al detectar al antígeno. Al parecer las dos clases de linfocitos también difieren en la naturaleza de sus receptores antigénicos. Los receptores de las células B (anticuerpos) están presentes en la membrana, y cada linfocito lleva una clase de receptor específico que responde únicamente a un determinante antigénico (36).

El linfocito B se origina en una célula madre (Stem-Cell) a través de un proceso de maduración independiente de la estimulación del antígeno. Antes del nacimiento de un individuo, los progenitores de los linfocitos B se encuentran en el hígado y en el bazo, posteriormente, la médula ósea se convierte en su principal fuente. Un linfocito B maduro, produce anticuerpos - si solo es estimulado por algún antígeno (37).

Los anticuerpos, pertenecen al grupo de proteínas llamadas inmunoglobulinas. Cada unidad básica de inmunoglobulina, está compuesta de cuatro polipéptidos que conforman dos cadenas ligeras (de bajo peso molecular) y dos cadenas pesadas (de alto peso molecular) unidas a su vez por enlaces disulfuro. La porción terminal (N-terminal) de las cadenas ligeras y pesadas mantienen una gran variabilidad en cuanto a la secuencia de sus aminoácidos, lo que le confiere una variabilidad de enlace para cualquier antígeno. La otra porción terminal de las cadenas ligeras y pesadas (C-terminal), es conocida como región constante y son muy semejantes para anticuerpos de la misma clase. Las inmunoglobulinas encontradas en los sueros de los mamíferos pueden ser divididas en cinco clases de acuerdo a la diferencia de la secuencia de los aminoácidos de las regiones constantes de sus cadenas pesadas. Estas clases son: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, correspondientes a anticuerpos con diferentes funciones específicas. La mayoría de los linfocitos humanos de sangre periférica expresan anticuerpos IgM e IgD en su superficie y muy pocas células expresan los anticuerpos restantes (25).

Ciertamente, una célula B es definida como aquella que endogénicamente produce inmunoglobulina independientemente de su origen. Además, la mayoría de las células B llevan productos del CMH clase II (HLA-DR) en humano, cuya función es la de regular la respuesta inmune. También muchas células B maduras llevan receptores de complemento para C3b (CRI) y C3d (CR2) que pueden combinarse en el sitio particular en la región constante de todas las moléculas de inmunoglobulina (24).

Por otra parte cabe mencionar, que en el proceso de proliferación algunos de los linfocitos de la progenie se diferencian en células efectoras que llevan a cabo una respuesta inmune. Las células efectoras de los linfocitos B son las células plasmáticas, las cuales secretan anticuerpos del mismo reconocimiento específico de los antígenos en la superficie celular - cel receptor. Después de que son programados, cada linfocito B antes de su diferenciación a células plasmáticas, elabora una cantidad suficiente de inmunoglobulina específica, para que esta se encuentre en manchas pequeñas en la superficie de la célula en lugares llamados sitios de reconocimiento, receptores de superficie o también epitopos. Es por medio de estos sitios por los que el linfocito B reconoce al antígeno particular contra el cual está programado (27,28).

Por otro lado, el linfocito T tiene también su origen en la médula ósea en una célula madre llamada (Stem-cell) que da lugar al linaje T y

inicia su secuenciación como protimocito, en seguida el protimocito migra - hacia la corteza del timo (tejido linfoide primario) vía torrente sanguíneo en donde madura como célula T y más tarde esta se convierte en célula inmunocompetente al adquirir receptores de superficie celular antígeno específicos y la maquinaria necesaria para responder a la estimulación antigénica - (37). Después de pasar por el timo, las células T migran a la circulación periférica y de ahí a los tejidos linfoides secundarios como el bazo, ganglios linfáticos periféricos y placas de Peyer. Esta migración no ocurre al azar, sino que está dirigida por moléculas de superficie de las células T - circulantes y de las células endoteliales que revisten las Vénulas Endoteliales Superiores (VES) poscapilares (36). Particularmente, a esta migración se le ha llamado "Homing" que significa autodirigido, y a las estructuras de superficie celular que reconocen y se adhieren a las VES del órgano linfoide se han denominado "receptores homing" (39). Se ha visto tanto in vivo como in vitro la unión directa de ciertas células T a las VES. Existe cierta especificidad de la migración de las células T, de manera que las células que se encuentran dentro de las placas de Peyer tienen afinidad por permanecer en ésta en comparación con su afinidad por la unión con las VES de los ganglios linfáticos superiores. Además, las placas de Peyer contienen mayor cantidad de linfocitos B que de linfocitos T, contrario a lo que sucede en órganos linfoides secundarios (40).

En seres humanos, se han identificado varias subpoblaciones de linfocitos T empleando anticuerpos monoclonales de ratón que reaccionan contra ellos (41). Estos anticuerpos monoclonales identifican dos grupos principales de linfocitos T maduros en la sangre y en los órganos linfoides secundarios. La población T4 que incluye al linfocito T auxiliar o colaborador, (Th: del inglés T Helper) mientras que la población T8 comprende las subpoblaciones de los linfocitos supresores (Ts) y citolíticos o citotóxicos (Tc). La proporción T4/T8 en la sangre periférica es aproximadamente 2:1 (42).

Hasta el momento, se sabe que los linfocitos Th cooperan con los linfocitos B y otros linfocitos para provocar una respuesta eficaz en reacciones de inmunidad celular, los Ts intervienen en la inhibición de la respuesta inmune y los Tc tienen capacidad para matar a otros antígenos, por ejemplo virus y tumores (43). Además también se ha logrado identificar otras subpoblaciones efectoras: los linfocitos responsables de retardar la -

hipersensibilidad (Td; del inglés T Delay) quienes también intervienen en reacciones de inmunidad celular, sensibilidad tardía, sensibilidad por contacto y resistencia a la infección por ciertas bacterias; las células T amplificadoras (Ta), cuya acción es la de conservar o amplificar la base de la población de los linfocitos T inmaduros presentes en el timo y que no recirculan; y las células de memoria (Tm) las cuales permanecen dentro del ganglio linfático y proliferan cuando se ha dado un segundo encuentro con el antígeno (44, 45, 46).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia marcadores de superficie sobre las subseries T funcionales también han sido utilizados para definir los diferentes estados de diferenciación de las células T en el timo. Aunado a esto, también se han identificado antígenos en linfocitos T activados tal como el HLA-DR y el receptor para Interleucina-2 (TAC) y otras moléculas de gran importancia que median la interacción de linfocitos T con células procesadoras de antígeno y células blanco (47). Al respecto, se han identificado el receptor antigénico CD3(T3), y las moléculas accesorias CD4, CD8, LFA-1, y CD2 presentes sobre las células T, y las moléculas accesorias tales como los antígenos LFA-3 e ICAM-1 sobre células presentadoras de antígeno (macrófagos) y células blanco (48). Aunque, se ha tenido poca evidencia de las moléculas accesorias que intervienen en la interacción de linfocitos T con otras células, estudios funcionales han demostrado que existen dos caminos de adhesión antígeno independientes que participan en la conjugación (interacción) del linfocito T citotóxico con las células blanco; uno dependiente de LFA-1, y el otro dependiente de CD2 y LFA-3 (49, 50, 51).

La función del linfocito asociada al antígeno-1 (LFA-1) es una proteína de la superficie del linfocito compuesta de dos cadenas (alfa de 180 KD, y beta de 90 KD) unidas no covalentemente. Estas se encuentran en células B, en células T y neutrófilos. La secuencia aminoácida N-terminal de la cadena alfa revela gran homología con el IFN-alfa del leucocito, y la cadena beta de LFA-1 es idéntica a la cadena que contiene Mac-1 (un antígeno de diferenciación del macrófago), (52). Se ha detectado la ausencia de moléculas LFA-1 en células inmunes provenientes de pacientes con infecciones bacterianas recurrentes y al parecer esta carencia se le atribuye a la inmadurez de la cadena beta de esta molécula (53). Aunque, LFA-1 no ha sido identificada en asociación con otras proteínas de membrana, se piensa que pueda estar asociada con otras moléculas formando un complejo, el cual desencadena la -

activación, liberación de linfocinas y actividad citotóxica del linfocito T además de la actividad NK que son mediadas por adherencia hacia las células blanco (54).

La molécula CD2 es conocida también como T11, LFA-2 y receptor de rosetas para eritrocitos, es una glicoproteína de superficie con peso de 50-58 KD. Esta aparece tempranamente en la ontogenia del timocito y está presente en todas las células T maduras. Anticuerpos monoclonales contra CD2 inhiben la actividad citotóxica del linfocito T y bloquean la adhesión contra las células blanco, asimismo, inhiben las respuestas de los linfocitos T auxiliares, incluyendo la secreción de IL-2 y su expresión de receptores para IL-2 (56, 57).

La función del linfocito T asociada al antígeno-3 (LFA-3), es una glicoproteína de superficie ampliamente distribuida, cuyo peso es de 70 KD. Anticuerpos monoclonales para LFA-3 inhiben un gran espectro de respuestas del linfocito Th y Tc muy similares a las inhibidas por anticuerpos monoclonales contra CD2 y si ambas moléculas son inhibidas por anticuerpos monoclonales, se inhibe la formación del conjugado del linfocito T citotóxico-célula blanco (58, 59). En realidad poco se sabe acerca de la actividad e interrelación de estas moléculas y actualmente se trabaja para conocer el mecanismo de adherencia y activación de las células inmunes además del proceso de lisis mediada por células T citotóxicas y células NK además de los factores que inhiben tal unión (60).

Por otra parte, las células T auxiliares y citotóxicas no se unen al antígeno libre, a menos que lo reconozcan en asociación con productos del CMH expresados sobre la membrana celular. Este reconocimiento, hipotéticamente puede ocurrir de tres maneras: ya sea que la célula T tenga dos receptores separados (Ag r) para el antígeno y (CMH r) para reconocer el propio CMH; un sólo receptor en la célula T (T cel r) que reconoce al antígeno asociado con el propio CMH; o que el receptor de la célula T reconozca de manera conjunta al propio CMH alterado por el antígeno (24).

También, existe una hipótesis para explicar el reconocimiento del antígeno por las células T (Figura 2) en la cual se ha sugerido que el CMH clase II restringido para la subpoblación Th posee una molécula T4, la cual reconoce antígenos con la clase II. El receptor de las células T (Tr) reconoce esta proteína junto con el antígeno, posteriormente este signo de activación es transmitido a la célula T vía un péptido (T3) el cual es asociado

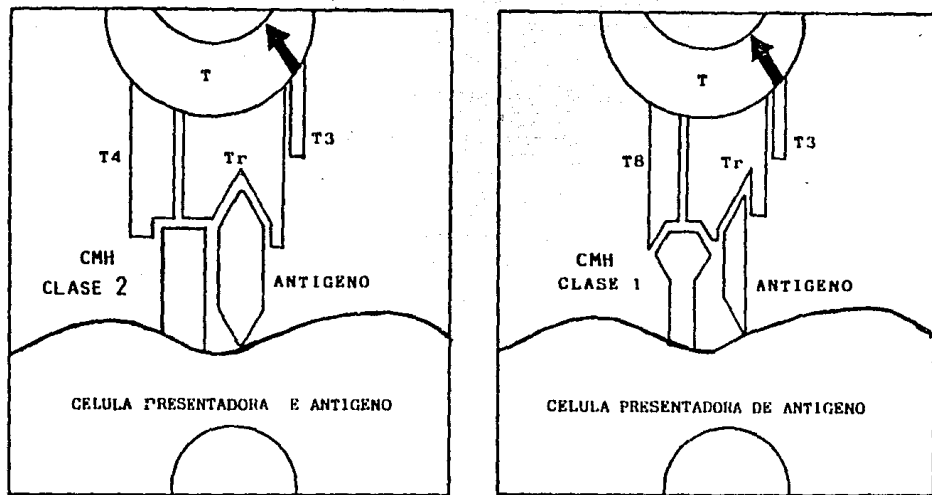


FIGURA 2. HIPOTESIS PARA EXPLICAR EL RECONOCIMIENTO DEL ANTIGENO POR LA CELULA T. Se ha propuesto que el Complejo Mayor de Histocompatibilidad CMH clase II restringido a las células T auxiliares, poseen una molécula T4, la cual reconoce antígenos del CMH clase 2. El receptor de la célula (Tr) reconoce la proteína del CMH y el antígeno. El signo de activación es transmitido a la célula T vía el péptido T3. La clase I restringida a las células, tiene una molécula T8, la cual reconoce antígenos clase I del CMH. Ambas clases de moléculas CMH tienen 4 dominios globulares y se propone que las moléculas T4 y T8 reconocen diferentes dominios para aquellos reconocidos por el receptor de la célula T.

con el receptor de las células T. El otro producto del CMH, clase I, restringido a las células Tc y Ts tienen una molécula T8, la cual reconoce antígenos CMH clase I en adición con el antígeno. Ambas clases de moléculas de CMH tienen 4 dominios moleculares y se propone que las moléculas T4 y T8 reconocen diferentes dominios para aquellos reconocidos por la célula T receptora (24).

El receptor de la célula T, consiste de dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro, ambos con peso molecular de 40-50 KD. Su arreglo genético es muy similar al de la inmunoglobulina y también el mismo tipo de nomenclatura es usada.

Existen células llamadas "presentadoras de antígeno" (CPA) cuya acción es la de captar al antígeno y presentarlo junto con productos del CMH al linfocito efector para que estos lo reconozcan y lleven a cabo la respuesta inmune. Algunos monocitos/macrófagos y células posiblemente variantes de éstas (células dendríticas y de Langerhans) expresan la clase II del CMH y pueden actuar como CPA para las células T y B (24, 36, 37).

La activación de las células T por las CPA involucra no solo el reconocimiento del antígeno y determinantes del CMH, sino también signos pasivos entre los linfocitos y las CPA mediante factores solubles llamados linfocinas (61). Inicialmente los estimulantes antigénicos o policlonales son procesados y presentados a los linfocitos T por las CPA tales como los macrófagos; esto cambia a los linfocitos del estado G_0 de reposo hacia la fase temprana G_1 del ciclo celular, con la síntesis concomitante de lípidos, ARN nuclear y proteínas. Los estimulantes exógenos o un factor inductor del receptor (FIR), o ambos, estimulan a algunos de los linfocitos para que evolucionen aún más hacia la fase G_1 del ciclo celular, durante la cual las células expresan receptores para IL-2. Otros linfocitos son estimulados por la IL-1 para producir IL-2 que a su vez estimulan a los linfocitos que producen receptores para que continúen a través de la fase S o replicativa (Figura 3), (61-68).

El proceso inmune llevado a cabo por linfocitos T activados, tal como la hipersensibilidad tardía o lisis mediada por linfocitos T citotóxicos es denominada como Inmunidad Celular (Figura 4). En este proceso, la activación de las células T es regulada por las células supresoras y células auxiliares. Ciertas células T (células activadas por macrófagos) elaboran linfocinas las cuales activan a los macrófagos para incrementar sus funciones

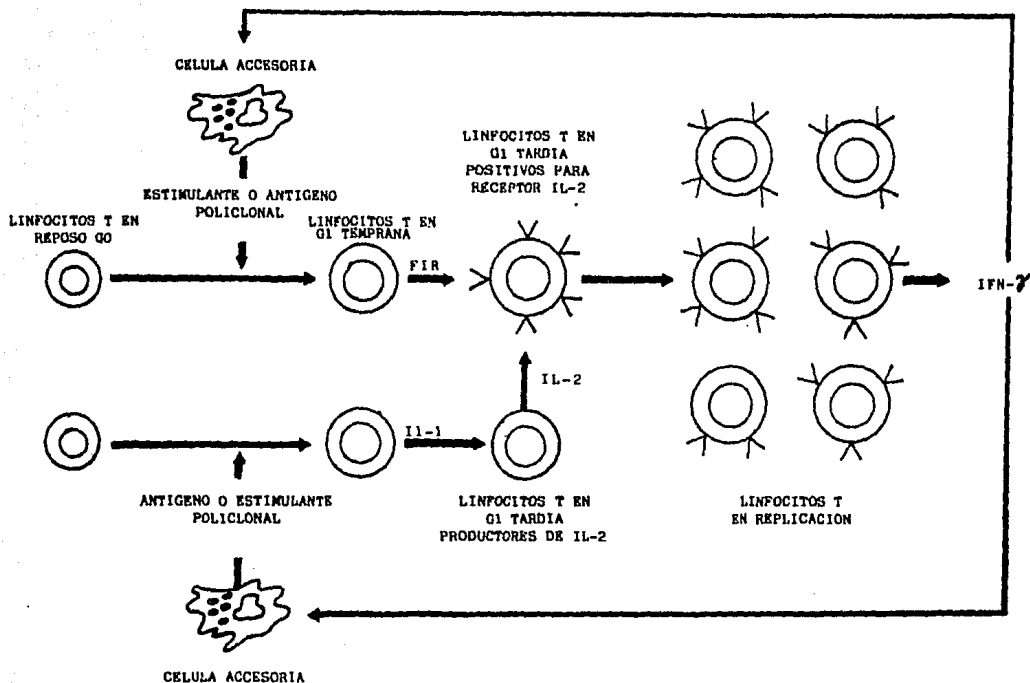


FIGURA 3. CIRCUITO REGULADOR INTERLEUCINA-INTERFERON. Los linfocitos en reposo (G_0), son cultivados por estímulos presentados en células accesorias autólogas para que entren a la fase temprana G_1 del ciclo celular. La IL-1 estimula a los linfocitos productores de IL-2 para que la produzcan así como un factor inducido de los receptores (FIR), el cual induce a las células a responder a IL-2 para que adquieran receptores IL-2. A su vez, las células T en replicación liberan IFN- γ , que promueve la expresión de antígenos Ia y aumenta la capacidad funcional de células accesorias que presentan antígenos.

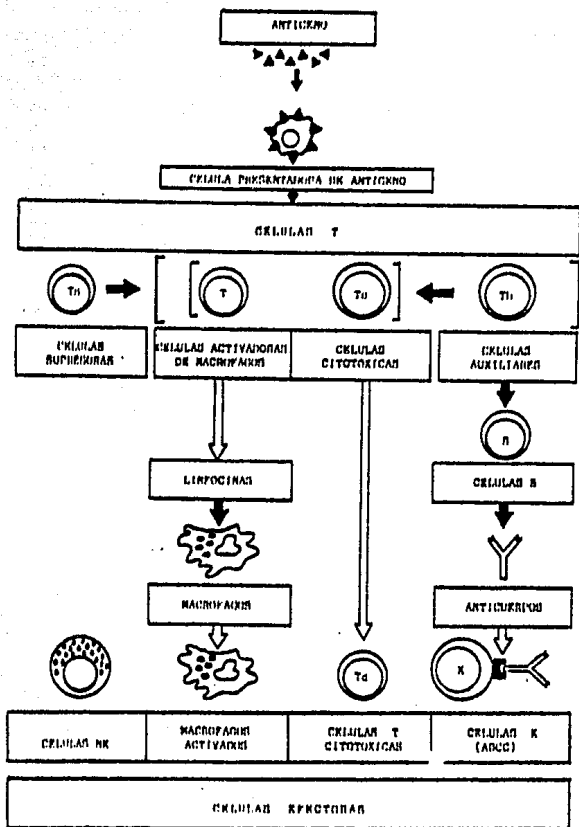


FIGURA 4. ESQUEMA DE LA INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS. La respuesta inmune mediada por células sigue la presentación del antígeno y activación de las células T. La activación es regulada por células supresoras y auxiliares. Ciertas células T (células activadas por el macrófago) elaboran linfocinas las cuales activan a los macrófagos para aumentar sus funciones fagocíticas y bactericidas. Las células T citotóxicas son activadas por antígenos y reciben ayuda de las células T auxiliares. Las células auxiliares también cooperan con las células B en la producción de anticuerpos las cuales pueden armar a las células portando receptores Fc (v.g las células K). Las células NK no actúan específicamente, particularmente contra células blanco.

bactericidas y fagocíticas. Las células T citotóxicas son activadas por antígenos y reciben ayuda de las células Th. Las células Th también cooperan con las B en la producción de anticuerpos, estas pueden integrar a las células que llevan receptores Fc, por ejemplo las células K. Finalmente, las células NK actúan inespecíficamente contra las células blanco (24).

Un resumen de las interacciones entre la Inmunidad Innata y Adaptativa se presenta en la (Figura 5), en donde los macrófagos y las células NK son activados con linfocinas. Los macrófagos activados producen localmente componentes del complemento, los cuales son liberados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. El C3a es un factor citolítico y quimotáctico derivado del neutrófilo, mientras que C3b induce la liberación de enzimas por el macrófago. Las células K son armadas con anticuerpos provenientes de las células B específicas a tumores (24).

3.3 LINFOCINAS Y EL PAPEL DE INTERLEUCINA-2 EN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Se sabe, que existen en el organismo factores semejantes a hormonas llamadas citocinas cuya actividad es la de regular una gran variedad de células que participan tanto de manera inmunológica como no inmunológica. Los factores producidos por linfocitos han sido llamados linfocinas y los que son producidos por monocitos, monocinas. Las citocinas difieren de las hormonas en que son producidas por células aisladas o tejidos, más que por glándulas discretas y no son normalmente detectadas en suero (69).

Las citocinas, funcionan como mensajeros intercelulares regulando el crecimiento, movilidad y diferenciación de leucocitos así como de células que son incidentalmente involucradas en reacciones inflamatorias, tales como los fibroblastos, osteoclastos, condrocitos, células epiteliales y endoteliales. Además las citocinas no son antígeno específicas, actúan por lo general de manera no restringida y pueden a menudo funcionar como una especie de barrera sobre células blanco heterólogas. En su mayoría son secretadas y sintetizadas como glicoproteínas con pesos moleculares que van de 4 000 a 80 000, son extremadamente potentes a muy bajas concentraciones, mediante bioensayos se han logrado detectar concentraciones de 10^{-10} hasta de 10^{-15} M (70).

Finalmente las citocinas pueden ser clasificadas en base a su participación en aspectos aferentes y eferentes de la inmunidad e inflamación (Cuadros 1 y 2). Las citocinas que modulan la activación de los linfocitos

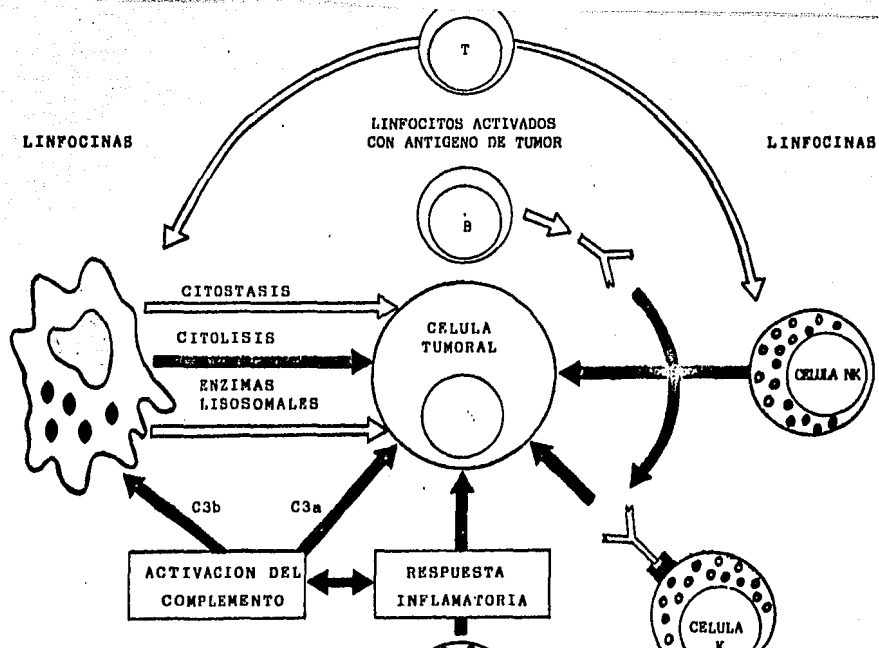


FIGURA 5. RESUMEN DE LAS INTERACCIONES ENTRE INMUNIDAD NATURAL Y ADAPTATIVA.

Las linfoquinas activan a los macrófagos y a las células NK. Los macrófagos activados, localmente producen componentes del complemento, los cuales están involucrados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. C3a es citotóxica y quimotáctica para neutrófilos, mientras que C3b induce la liberación de enzimas por el macrófago. Las células K son activadas por anticuerpos provenientes de células B específicas a tumores.

Las linfoquinas activan a los macrófagos y a las células NK. Los macrófagos activados, localmente producen componentes del complemento, los cuales están involucrados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. C3a es citotóxica y quimotáctica para neutrófilos, mientras que C3b induce la liberación de enzimas por el macrófago. Las células K son activadas por anticuerpos provenientes de células B específicas a tumores.

CUADRO 1

CITOCINAS AFERENTES INMUNOACTIVAS E INMUNOSUPRESIVAS

FACTORES	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS	ACTIVIDADES BIOLOGICAS
AMPLIFICACION		
Interleucina-1 (IL-1)	15 K, 2-4 K ^m PM Proteínas	Promueve la diferenciación y/o el crecimiento de muchas células blanco.
Interleucina-2 (IL-2)	20 000-22 000 PM (murina) 15 400 PM (humana)	Promueve la proliferación de células T y B y la producción de anticuerpos Genera células T citotóxicas. Aumenta la actividad NK de LGL.
Factor de Crecimiento de Células B (BCGF)	18 000 PM (murino)	Promueve la proliferación de linfocitos B.
Factor Reemplazante de Células T (TRF)	45 000 PM contiene 2 microglobulina y el producto genético IR (Ia).	Promueve la producción de anticuerpos.
Factor Estimulador de Colonias. (GM-CSF, IL-3, etc.)	23-70 K PM exhibe carga heterogénea.	Estimula a las células precursoras para leucocitos, plaquetas y eritrocitos. Activa la replicación y funciones del leucocito.
Interferones. (IFN- α , - β , y - γ)	25 000-75 000 PM	Factor antiviral y antiproliferativo En bajas dosis estimula/en altas suprime la inmunidad humoral y mediada por células. Promueve la expresión de marcadores celulares. Incrementa la actividad de células asesinas.

CUADRO 1 (CONTINUACION)

CITOCINAS AFERENTES INMUNOACTIVAS E INMUNOSUPRESIVAS

FACTORES	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS	ACTIVIDADES BIOLOGICAS
SUPRESION		
Supresores Responsables Inmuno Solubles (SIRS)	48 000-67 000 PM	Activados por macrófagos para inhibir la proliferación de células B y la producción de anticuerpos.
Factor Enlazante de Inmunoglobulinas (IEF)	Secretado por receptor Fc de células T con cadenas de 38 000 y 18 000 PM	Inhibe <i>in vitro</i> la producción de anticuerpo y puede unir TRF.
Inhibidor de la Síntesis de DNA	35 000-50 000 PM; aumenta el cAMP de las células blanco	Inhibe la proliferación de células T y la producción de anticuerpos. Arresta las células tardías en G1 por enlace de DNA polimerasa.

k^{*} = Kilodaltones.

CUADRO 2

CITOCINAS EFERENTES

FACTORES	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS	ACTIVIDADES BIOLOGICAS
Factor Inhibidor de la Migración (MIF)	15 000-70 000 PM Inhibido por -L-fucosa	Inhibe la migración del macrófago. Promueve la polimerización de Tubulina. Induce la diferenciación del macrófago.
Factor Activador del Macrófago (MAF)	10 000-70 000 PM	Activa a los macrófagos a ser bactericidas y tumoricidas.
Factor Inhibidor del Leucocito (LIF)	68 000 PM; posee actividad esterasa.	Inhibe la migración del Neutrófilo.
Linfotoxina (LT)	20 000 PM	Citostático y citolítico para algunas células blanco no leucocíticas. Aumenta la lisis mediada por NK. Inhibe la carcinogénesis.
Factores Quimiostáticos	12 000 PM	Atrae y activa leucocitos.
Factor Activador de Osteoclastos	18 000 PM	Estimula la actividad reabsorbente de osteoclastos.

en el aspecto aferente de la inmunidad, pueden aumentar o suprimir la inducción de reacciones inmunológicas así como de regular la función, el crecimiento y diferenciación de los linfocitos T y B. En contraste, las citocinas eferentes influyen en las reacciones de reparación y degradación de las células blanco en el proceso inflamatorio y promueven su capacidad bactericida y de citólisis (70-71).

3.3.1 LINFOCINAS

Las linfocinas pueden ser definidas como factores polipeptídicos (no inmunoglobulinas) secretadas por linfocitos activados y tienen un amplio rango de efectos fisiopatológicos sobre reacciones inflamatorias mediadas - inmunológicamente (Figura 6) (70).

El campo de la inmunología celular posiblemente se inició con el descubrimiento pionero de Nowell en 1960, quién estableció que lectinas de plantas, tal como la fitohemaglutinina (PHA) eran capaces de inducir la división celular de linfocitos diferenciados (72). El descubrimiento de las linfocinas fué llevado a cabo por George y Vaughan en 1962 al observar que algunos antígenos inhibieron la migración de células mononucleares provenientes de animales inmunizados, subsecuentemente se presentó a los macrófagos como células inhibitoras y que este efecto requiere la presencia tanto de linfocitos como de antígenos sensibilizados. Esto fué inicialmente confirmado por Kasakura y Lowenstein en 1965 al reportar la presencia de factores mutagénicos solubles en sobrenadantes de cultivos de linfocitos humanos y posteriormente por David, Bloom y Bennetts en 1966 cuando demostraron que linfocitos estimulados por el antígeno y el Factor Inhibidor de la Migración (MIF: del inglés Migration Inhibition Factor) indujeron la migración de macrófagos provenientes de animales no sensibilizados (26).

Bach en 1970, estableció que células adherentes (Monocitos/M ϕ) liberan factores solubles con propiedades mitogénicas. A estos factores, posteriormente se les asignó el nombre de Factor activador de linfocitos o (LAF: del inglés Lymphokine Activated Factor) por Gery y colaboradores en 1972, (73). Morgan en 1976, obtiene y caracteriza linfocinas mitogénicas de células T derivadas de M ϕ a partir de medios condicionados de cultivos de células mononucleadas de sangre periférica, este descubrimiento permitió establecer cultivos a largo plazo así como la extracción clonal y funcional de células T.

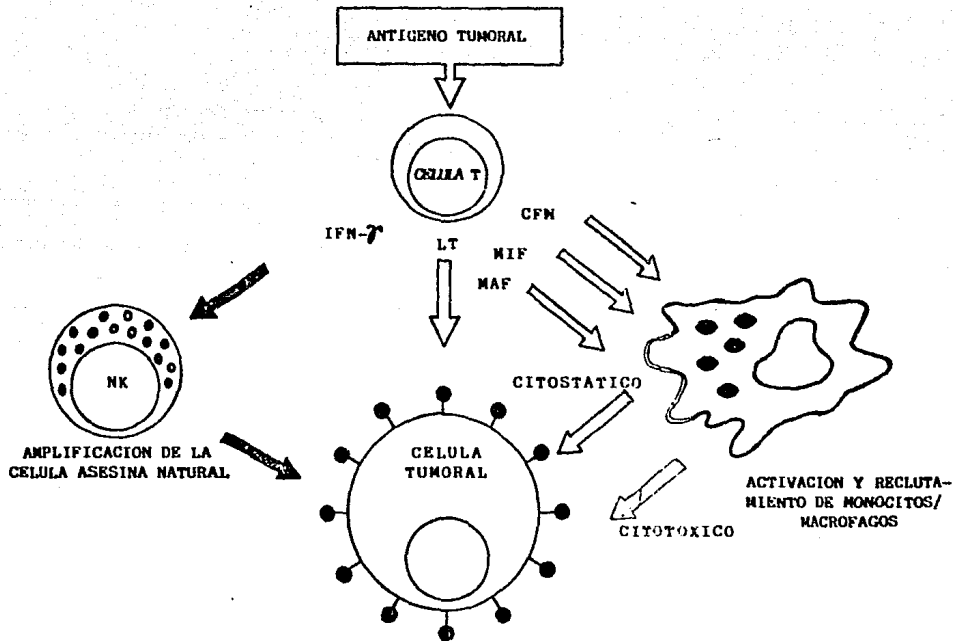


FIGURA 6. EL PAPEL DE LAS LINFOCINAS EN LA MUERTE TUMORAL. Las células T activadas por el antígeno tumoral : (1) liberan interferon (IFN) para amplificar la acción lítica de las células asesinas naturales (NK), (2) liberando linfotoxina (LT) la cual actúa directamente y - (3) liberando factores quimotácticos (CFM), factor inhibidor de la migración (MIF) y factor activador del macrófago (MAF) los cuales atraen y activan a los macrófagos. Los macrófagos tienen un efecto citotóxico sobre el tumor y previenen su multiplicación. Otras linfocinas, incluyendo IL-2, amplifican las reacciones inmunes antígeno-específicas por células B y otras células T.

Posteriores experimentos revelaron que LAF funciona como promotor de la proliferación de células T por estímulo de la producción de un factor de crecimiento derivado de las células T (TCGF: del inglés T Cells Growth Factor), (74). Más tarde estas dos entidades (LAF y TCGF) fueron renombrados como Interleucina-1 e Interleucina-2 respectivamente (72, 75).

3.3.2 INTERLEUCINA-2 Y SU USO POTENCIAL COMO AGENTE ANTITUMORAL

La interleucina-2, también conocida como Factor de Crecimiento de Células T fué primeramente descrita como una linfoquina capaz de promover el crecimiento a largo plazo in vitro de células T activadas con antígenos y/o mitógenos. Esto se realizó mediante cultivos de linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina, observándose en medios condicionados tanto el crecimiento de timocitos como de linfocitos de sangre periférica, dando por resultado células T supresoras y citotóxicas (72). Posteriormente, varios investigadores estudiaron diversos factores mitogénicos derivados de estos cultivos a los cuales les denominaron de diferente manera:

Factor Mitogénico del Timocito (TMF: del inglés Thymocyte Mitogenic Factor).

Factor Activador del Timocito (TAF: del inglés Thymocyte Activated Factor).

Factor Estimulador del Timocito (TSF: del inglés Thymocyte Stimulating Factor).

Factor Estimulador del Linfocito (LSF: del inglés Lymphocyte Stimulating Factor).

Factor Auxiliar de Células Asesinas (KHF: del inglés Killer Cells Helper Factor).

Factor Inductor de la Citotoxicidad Secundaria (SCIF: del inglés Secondary Citotoxicity Inductor Factor).

Factor Mitogénico del Linfocito (LMF: del inglés Lymphocyte Mitogenic Factor).

Todos estos factores por muchos criterios mantienen una correlación muy estrecha y ahora son conocidos como Interleucina-2 (IL-2), (76).

a) Producción de Interleucina-2

Existen numerosas evidencias de que la fuente original de IL-2 es el sobrenadante de linfocitos T estimulados con antígenos y lectinas (PHA, Con canavalina-A, etc.). En humanos, los linfocitos de sangre periférica, enriquecidos en células T, liberan IL-2 como respuesta al reconocimiento de un antígeno (72, 74, 76).

Por otro lado, también se sabe que los mediadores biológicos como la IL-1 aumentan la producción de IL-2 y que existen otros factores fisiológicos y no fisiológicos que la aumentan, entre los cuales se encuentran: el -

acetato miristato forbol, la vasopresina y otras neurohormonas, la azida só dica y numerosos compuestos activos en la superficie celular (36, 72, 77).

Varios estudios hechos en ratón indican que la IL-2 es producida prin cipalmente por células de la subpoblación T auxiliar, que en cooperación con otras subpoblaciones conduce a la liberación final de IL-2 (76). También es conocido que las líneas celulares de macrófagos o células B no son capaces de liberar IL-2 activa (79). Otras investigaciones, sugieren que la IL-2 — producida por las células T ocurre principalmente durante la fase G_1 del ci clo celular (63, 72).

Cabe mencionar, que los estudios biológicos sobre la función de esta linfocina, habían sido realizados con insuficientes cantidades de este materi al no purificado, el cual consistía de sobrenadantes de medios condiciona dos de linfocitos T. Gracias a los avances biotecnológicos, la extracción - de un clon (IL-2 ADN) humano proveniente de la línea celular leucémica T — JURKAT dió la clave para la producción de grandes cantidades de IL-2, la — cual ha sido purificada a homogeneidad así como caracterizada bioquímicamente. La extracción de clones de ADN codificando para IL-2 llevados a cabo - por Taniguchi, Rosenberg y colaboradores en 1984, hicieron posible la produ cción de grandes cantidades de esta proteína mediante métodos alternativos (80).

Usando la tecnología recombinante, se han empleado clones moleculares de IL-2 para expresar biológicamente la proteína activa en Escherichia coli (la IL-2 parece ser aproximadamente el 5% de todas las proteínas de E coli), así como en células de mono (COS) y en células de insecto. Finalmente, vari os estudios inmunológicos, demostraron la equivalencia biológica de Inter leucina-2 recombinante (rIL-2) con IL-2 proveniente de fuentes naturales — (81).

b) Caracterización estructural y bioquímica de IL-2

La IL-2 proveniente de humanos y ratones, ha sido ampliamente caracteri zada (Cuadro 3), (76). Las propiedades moleculares en ambas especies son diferentes, aunque su actividad biológica es idéntica en ensayos sobre linfo citos murinos. La heterogeneidad, parece estar ligada con la glicosila— ción y siliación variable así como la presencia de cantidades diferentes de ácido neuramínico en las moléculas (72).

Por otra parte, se tiene la información de que en células eucariotas

CUADRO 3

PROPIEDADES DE IL-2

CARACTERISTICAS	HUMANO	MURINO
Peso Molecular	13-16 K	30-35 K
pI	6-6.8, 7.4, 8	3.8-5
pI (Tratado con neuraminidasa)	8.2	
Estabilidad al calor (56°C)	estable	
Estabilidad pH	2-9	2-9
Digestión Tripsina-pronase	sensible	sensible
Digestión Neuraminidasa	insensible	
Tratamiento DNA-asa, RNA-asa	insensible	
Reducción-Tiol	insensible	insensible
Miscelanea	Inestable a -70°C	-10 Conc. Efectiva 10 ⁻¹⁰ M
	No contiene productos del gene HLA-DR	No contiene antígenos Ia
	Actividad HLA-A, B, C no restringida.	Actividad H-2 no restrin- gida.

la IL-2 es primero sintetizada como un polipéptido precursor de 153 aminoácidos. Una ruptura significativa de un péptido de 20 aminoácidos ocurrió - tanto en IL-2 natural proveniente de células JURKAT y en la IL-2 recombinante proveniente de células de insectos dió por resultado la producción de -- IL-2 madura de 133 aminoácidos (81).

La estructura primaria de esta linfocina, ha sido deducida a partir - de un análisis de la secuencia de nucleótidos de clones de cADN y confirmado por el análisis del material obtenido de la línea JURKAT. Sin embargo, - las estructuras secundarias y terciarias aún no se han determinado completa- mente y se tiene poca información acerca de los aminoácidos residuales que son importantes para sus efectos biológicos. Al respecto, se han reportado que varios rasgos estructurales de la molécula de IL-2 son esenciales para su integridad funcional, teniendo gran importancia su configuración tridi- mensional, en la cual un enlace disulfuro intramolecular conectante entre - las cisteínas en la posición 58 y 105 de la cadena mantienen una activa -- conformación de la molécula. En adición, se ha demostrado directamente que la posición de los aminoácidos 8-27 y 33-54 es importante para la función - de IL-2 (81).

Un estudio más reciente, empleando mutagénesis específica de un clon de ADN de IL-2 activa, demostró que la integridad de tres regiones en la mo- lécula de IL-2 son requeridas para su completa actividad biológica: el NH_2^+ terminal (residuos 1-20); el COOH^- terminal (residuos 121-133); y dos de las tres cisteínas residuales (58 y 105). La eliminación del tramo terminal NH_2^+ (20 aminoácidos) o el tramo COOH^- terminal (10 aminoácidos) resulta- ron en una disminución de más del 99% de la bioactividad y enlace, y la sus- titución de los aminoácidos en las posiciones específicas también dieron -- por resultado una gran disminución en la actividad de IL-2 (menos de 1%) , (82).

c) Actividad biológica de IL-2

En la actualidad, la IL-2 es una de las linfocinas que más se ha estu- diado, debido a sus efectos biológicos, entre otras funciones:

- Actúa sobre células T inmaduras, resistentes a esteroides (76).
- Colabora en las respuestas de las células T y B (77, 78).
- Promueve y mantiene la proliferación de células T supresoras y citotó- xicas (83).

- Estimula las respuestas Ig a antígenos y mitógenos dependientes de células T (84).
- Estimula el crecimiento de timocitos y linfocitos de sangre periférica (85, 86).

Aparte de estas funciones, la IL-2 juega un papel importante en la activación de las células asesinas naturales (87, 88). Se sabe que la mayoría de las células NK son inducidas a entrar al ciclo celular en presencia de IL-2. Además, el tratamiento de estas células con IL-2 les induce a producir Interferon gamma, el cual se sabe que es muchas veces más activo que el alfa o el beta, esto se ha visto en cultivos de corto plazo de células NK (33, 77, 89). El IFN gamma producido en estos cultivos, no se ha visto que participe en la activación directa de células NK, sin embargo, induce la expresión de receptores para IL-2 sobre estas células (90, 91). Por lo tanto, la proliferación de las células NK no depende de la respuesta directa a IL-2, sino de la interacción de esta linfocina con los respectivos receptores de superficie que presentan estas células, inducidos por IFN gamma, el cual es producido por células NK activadas con IL-2, (Figura 7), (92, 93, 94).

Esta función es mantenida mientras IL-2 esté disponible en el cultivo, por ejemplo, se ha demostrado que en co-cultivos de células NK con células tumorales provenientes de pacientes con melanoma metastásico, incrementos en las dosis de IL-2 conservan la activación e inducen la citotoxicidad NK aún cuando la presencia de suero autólogo suprime dicha actividad (95).

Se ha visto, que las células T en estado de reposo o también los timocitos no expresan receptores para IL-2 a menos que exista interacción con el estimulador inicial (célula procesadora del antígeno). Y una vez que el receptor para IL-2 se ha expresado, la IL-2 es el factor limitante para la proliferación y expansión clonal de células T activadas (96).

Los receptores para IL-2 ya han sido identificados y purificados a homogeneidad y el ARNm que codifica para esta molécula ya ha sido extraído, clonado y secuenciado, de tal manera, que anticuerpos monoclonales también ya han sido preparados para estos receptores (97-100).

Además, se han encontrado dos estados de afinidad del receptor para IL-2 (uno de alta y otro de baja afinidad). Estos estados, posiblemente están relacionados con el modo y tipo de activación de la célula que los presenta. Estos tipos de afinidad, se han comprobado mediante curvas de competición para el anticuerpo anti-IL-2 de tales receptores. También se utilizó

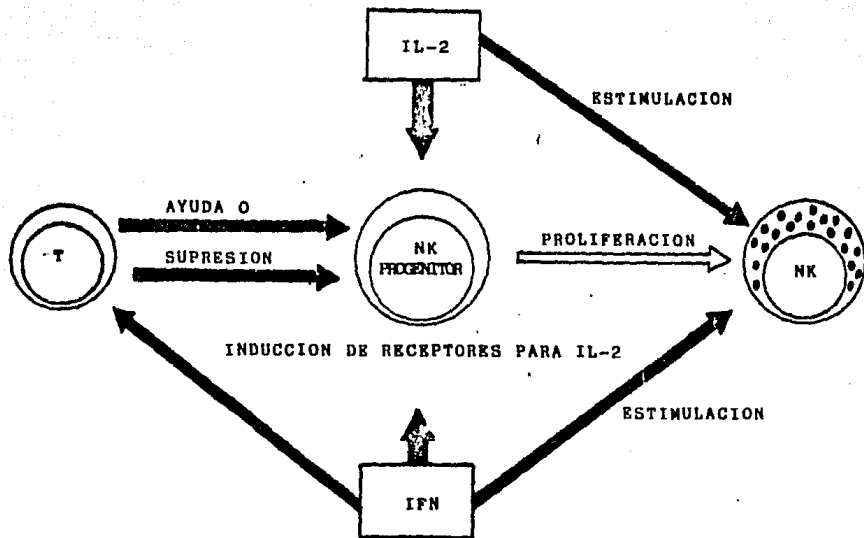


FIGURA 7. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS MECANISMOS REGULATORIOS DE LAS CELULAS T LLEVADOS A CABO POR IL-2 E IFN INFLUENCIADOS POR LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS NK. La proliferacion de las células NK está bajo el control de las células T, la IL-2 puede inducir la proliferacion y estimular la actividad NK de las células NK proliferantes. El interferon (IFN) induce la expresion de receptores de IL-2 sobre la NK progenitora, aumentando la proliferación, sin embargo, el IFN controla a las células T para reducir su actividad.

za IL-2 radiactiva o IL-2 altamente purificada, basándose en una disociación diferencial de enlace. Con IL-2 radiactiva, se ha demostrado la presencia de números pequeños de sitios de alta afinidad (2000 a 10 000, K_d 5 a $20 \times 10^{-12}M$ sobre la superficie de linfocitos T activados con aloantígenos y líneas de células T infectadas con retrovirus (82, 101, 102).

Por otra parte, la máxima expresión de receptores de IL-2 en linfocitos T de sangre periférica activados in vitro con PHA aparece entre los 3 y 7 días y disminuye a valores no detectables entre los 10 y 14 días, deteniéndose el crecimiento y las células quedan bloqueadas en la fase G_1 . Esto sucede aún en concentraciones de saturación de IL-2, la adición subsecuente de PHA en este punto vuelve a estimular la aparición de cantidades óptimas de receptores en la superficie celular, y las células proliferan nuevamente en presencia de IL-2 (36, 61, 63). La presencia de receptores para IL-2 también se ha observado en células T obtenidas de cordón umbilical de recién nacidos, estos receptores muestran un pico mayor a los 5 días de cultivo y disminuyen regularmente a los 7 días de cultivo (99, 103).

Finalmente, se ha asociado la expresión de receptores para IL-2 sobre las células T con la edad de la persona, de tal manera que en sujetos viejos, esta expresión se encuentra disminuída. Lo cual puede indicar un defecto en la producción endógena de IL-2 y de hecho una reducida actividad celular (104).

d) Ensayos in vitro e in vivo de IL-2

Poco se conoce acerca del uso de IL-2 in vivo como un agente farmacológico, sin embargo, los estudios in vitro han dado información sobre la biología y función de IL-2 como un signo proliferativo de células T. después de que han proliferado, las células hijas antígeno-específicas expresan receptores para IL-2, y su proliferación continúa de acuerdo a la cantidad de IL-2 que se proporcione al medio de cultivo. de esta manera, se ha demostrado que in vitro la IL-2 representa un factor importante que controla la magnitud de la respuesta de las células T (105).

Por otra parte, inicialmente se había observado que muchos tumores humanos contienen una infiltración de linfocitos. Una prognosis asociada con la infiltración sugirió que esto es resultado del reconocimiento inmunológico de células de tumor por el huésped (106). Posteriormente se observó que estas células infiltrantes en tumores (TIL: del inglés Tumor Infiltrating -

Lymphocytes) eran primariamente células T y en menores proporciones otros - linfocitos y macrófagos. También se ha observado que linfocitos de sangre periférica (LSP) por sí mismos no lisan células de tumor en fresco (107). No obstante, si estas células son cultivadas a corto plazo en IL-2 adquie- ren actividad citotóxica contra células tumorales autólogas y alogénicas - (108, 109). Esta actividad citotóxica fué originalmente descrita por Grimm en 1982, y a las células responsables de esta citotoxicidad les llamó Células Asesinas Activadas con Linfocina (LAK: del inglés Lymphokine Activated Killer) (110). Grimm, en sus primeros experimentos concluyó que los precursores de las células LAK no eran células K ni células T, y en subsecuentes observaciones sugirió que las células efectoras LAK eran células T con fenotipos Leu 11a+ y CD16 de linfocitos granulares con actividad NK (111; 112).

Estudios complementarios, usando análisis de marcador, indicaron que los clones LAK+ derivados de Leu 11+ expresan fenotipos heterogéneos para - la expresión T8 y T11 además de que todos los clones expresaron el marcador T40 antes de que se pudieran detectar los antígenos T11 y T3 durante la autogenia de las células T, lo que sugiere que esta molécula puede tener un - papel funcional en el proceso lítico llevado a cabo por las células LAK. - Rosenberg y colaboradores en 1984, hicieron estudios para caracterizar las células LAK, los cuales se resumen en el (Cuadro 4), (113).

La aplicación in vivo como factor terapéutico es muy reciente, inicialmente se efectuaron semi-preparaciones de IL-2 administradas a ratones después de la administración de un antígeno, estos experimentos presentaron un aumento en la citotoxicidad de las células T (105). Más tarde, se determinó que la IL-2 altamente purificada (rIL-2) aumentaba el efecto citotóxico de linfocitos T en la terapia de tumor de modelos murinos. También se - documentó, que el papel de IL-2 in vivo es promover la expansión de células NK y LAK transferidas a ratones, los cuales previamente se les había inducido tumoraciones (114). posteriormente, se observó que linfocitos endógenos y células LAK transferidas se establecieron en tejidos específicos de crecimiento (pulmón, hígado, bazo, nódulos linfáticos de mesenterio y riñones), lo que condujo a establecer regímenes óptimos para utilizar las células LAK con IL-2 en Inmunoterapia antitumor en sistemas murinos (115-118).

e) Uso terapéutico de IL-2

En las pasadas dos décadas, se habían realizado intentos para desarro

CUADRO 4

CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LAS CELULAS LAK

Los precursores de las células LAK tanto en ratón como en humano carecen del clásico fenotipo de las células T por marcadores de superficie y en humanos son rosetas E-negativas, son no adherentes y poseen los marcadores OKM-1⁻, OKT-3⁻, Leu-1⁻, Leu-7⁻.

Estas células también son negativas para marcadores Ia y DR y el precursor celular aún es incierto (ni T, ni B).

Siguiendo la activación en IL-2, las células LAK efectoras adquieren clásicos marcadores de superficie de células T y en ratón parecen tener Th1⁺, Lyt 1⁻ 2⁺ y en humano parecen ser OKT 3⁺, 4⁻, 8⁺.

Tanto las células LAK precursoras y efectoras son células no adherentes y parece ser que IL-2 es la linfocina requerida para la generación de estas células.

Las células LAK son distintas tanto de las NK y de las células T citotóxicas clásicas.

Los precursores de esas células no llevan marcadores de células NK tales como OKM-1 o Leu-7.

Las células LAK humanas pueden ser fácilmente generadas a partir de linfocitos de sangre periférica, células del timo, esplenocitos, nódulo linfático, células de médula ósea y células del ducto torácico a pesar de que se conoce que las células del ducto torácico no tienen actividad NK.

Las células LAK lisan in fresco células de tumor no cultivadas, las cuales no son lisadas por células NK.

Las células LAK efectoras humanas son no adherentes y poseen marcadores OKM-1⁻, OKT-3⁺, OKT-4⁻, OKT-8⁺ y Leu-1⁺.

llar inmunoterapias en el tratamiento del cáncer basadas en la respuesta inmune del huésped hacia el tumor. Estas aproximaciones, se efectuaron con el propósito de inmunizar contra células de tumor específicas y contra estimulantes particulares con la esperanza de una estimulación inmune general que permitiera una respuesta antitumor del huésped. Por desgracia, estos intentos clínicos fueron inprósperos y tuvieron que abandonarse (tomado de 119).

Recientemente, la transferencia adoptiva de células LAK previamente - activadas con IL-2 en varios ensayos clínicos hechos sobre una variedad de sarcomas y carcinomas inducidos en ratones singénicos reportaron una importante regresión de nódulos metastásicos tumorales, lo que apoyó la idea — del uso clínico de IL-2 en humanos, abriendo una nueva esperanza para erradicar el cáncer (114-118).

Estudios iniciales llevados a cabo en humanos, ensayos clínicos Fase I (Cuadro 5), han mostrado que tanto la IL-2 derivada de la línea JURKAT y la rIL-2 presente en el suero, tienen una vida media de 6.9 min con un posterior tiempo de permanencia de 30-60 min para ser desechada por el organismo. en estos estudios, fué evidente una marcada disminución inicial de todas las células linfoides en la periferia (119). Más tarde, se demostró que la administración continua de IL-2 produce una expansión de las células circulantes de 2-12 veces y que de esta expansión aproximadamente del 25-40% de las células mononucleares de sangre periférica expresan receptores para IL-2. Por lo que se cree que esta expansión es un requerimiento inicial para obtener una expansión de células linfoides (120).

Aunado a esto, se ha visto que algunos pacientes presentan receptores solubles para IL-2 en el suero en cantidades aproximadas de 20 000 U/ml después de una semana de haberse detectado células con receptores para IL-2. - Estos receptores también se han detectado en células Leu 3 en una cantidad aproximada de 30% y en monocito M3 en un 83.7%. Aún se desconoce el papel fisiológico de los receptores para IL-2, identificados sobre estas células, así como la posible relación con los receptores solubles encontrados en el suero y el efecto que estos tienen en la toxicidad que origina la inmunoterapia con IL-2 en humanos (119-121).

En los ensayos clínicos Fase II (Cuadro 5) de la Inmunoterapia con IL-2 en humanos, se incluye el cultivo de linfocitos infiltrantes en tumores (TIL) y células LAK en medios con IL-2. Después de la expansión clonal, estas células son inoculadas con bajas dosis de IL-2 ($1-3 \times 10^6$ U/día).

CUADRO 5

ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO DE INMUNOTERAPIA ADOPTIVA PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER HUMANO USANDO CELULAS ASESINAS ACTIVADAS CON LINFOCINA E INTERLEUCINA-2 ADICIONAL

Pacientes: Con cáncer metastático a quienes la terapia convencional les ha fallado.

Células: Obtenidas en grandes cantidades por leucoforesis. Se generan células LAK y son inoculadas.

IL-2: Uso de IL-2 recombinante producida por E. coli y purificada a homogeneidad.

Ensayos:

Etapas 1: Infusión de grandes cantidades de células asesinas activadas autólogas.

Toxicidad: Fiebre, escalofrío, malestar transitorio

Etapas 2: Infusión de IL-2 recombinante intravenosamente.

Infusión continua 1,000 a 3,000 U/Kg/hr.

Infusión por intervalos 10 000 a 30 000 U/Kg tres veces al día.

Toxicidad: Fiebre, escalofrío, malestar, ligera disfunción hepática, retención de fluidos, eosinofilia.

Etapas 3: Infusión de células LAK más infusión de IL-2 en pacientes con cáncer metastático (en progreso).

Etapas 4: Aplicación de los principios desarrollados en la — Etapas 3 para el tratamiento de pacientes con pobre pronóstico (planeado).

Varias experiencias se han obtenido al aplicar la inmunoterapia de estas células junto con IL-2 en humanos. Estas han incluido desde resultados excelentes como la regresión del cáncer de algunos pacientes con melanoma metastásico y carcinoma de riñón, hasta resultados en los que se incluyen síntomas muy fuertes tales como tensión emocional, náusea, vómito, fiebre, escalofrío, hipotensión, diarrea, ansiedad, estrés y mucocitis entre otros. Asimismo, se ha visto que todos estos efectos han sido reversibles, y se ha demostrado que la menor dosis empleada para obtener regresión en pacientes con carcinoma renal es de $100\ 000\ U/m^2$ intravenosamente 3 veces al día. Esta terapia tiene grandes inconvenientes, por el hecho de la severa toxicidad que se observa en la mayoría de los pacientes y los costos estratosféricos que representa, además de que difiere de la quimioterapia convencional en que es efectiva en pacientes altamente seleccionados (122-124).

Varias cuestiones biológicas han surgido respecto a la inmunoterapia con células LAK e IL-2, estas incluyen entre otras: Es la actividad de las células LAK su función primaria normal? Si esto es así, cuál es el camino fisiológico normal para su regulación? Si esto es, por qué?. Es su actividad confinada a ciertos tipos de tumor? Por qué?. Como es la relación de estas células en los linfocitos infiltrados en el tumor?. Que interacciones célula-célula son importantes?. Que otras linfocinas quizás no identificadas están involucradas en su activación?. Que otras linfocinas trabajan mejor? Si esto es, por qué?. Como pueden ser reguladas y algunas aumentadas?. Pueden desarrollarse ensayos para predecir la respuesta al tratamiento?. Se pueden desarrollar tratamientos efectivos?. Es el efecto parcial del sistema in vivo el responsable de la selección más agresiva de clones de células que incrementan el escape a la supervivencia y contribuyen al progreso de la enfermedad?.

Todas estas preguntas están encaminadas hacia un mejor conocimiento de el rechazo de células neoplásicas mediante el sistema inmune, lo que abre un extenso campo para ser investigado y hacer más efectivo al tratamiento.

Dado lo anterior, con el propósito de realizar ensayos que nos permitan dar un mejor entendimiento y nuevas herramientas para mejorar los diagnósticos y tratamientos de los pacientes con cáncer mediante el uso de la inmunoterapia adoptiva, el presente estudio tiene como finalidad evaluar la activación de linfocitos de sangre periférica en co-cultivo con células —

provenientes de diferentes estirpes celulares tumorales, así como el efecto de la rIL-2 en este proceso.

III. METODOLOGIA

1.0 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico que se utilizó para la realización del presente trabajo, consistió de células obtenidas a partir de biopsias de sarcomas - y/o carcinomas humanos adquiridos del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional.

2.0 OBTENCIÓN DE LAS CELULAS

Las biopsias tumorales, fueron transportadas bajo condiciones estériles en tubos que contenían Medio de Eagle (E.M: del inglés Eagle Medium), - (Apéndice 1), en una proporción de 90% y suplementado con 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB) previamente desactivado a 56°C durante media hora (Apéndice 2).

Antes de procesar las muestras, estas fueron lavadas con Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (PBS: del inglés Phosphate Buffer Saline) -- (Apéndice 3), en condiciones estériles.

A continuación, los tejidos fueron cortados en pequeños trozos y sembrados por diferentes métodos dependiendo del tipo de tejido que se tratara:

Método de Adherencia por Contacto: Se colocaron de 5 a 10 trozos de tejido, de 1 mm³ de volumen aproximadamente, en las cajas de cultivo (Cajas de Petri - de 60 x 15 mm Lux Scientific Corporation, U.S.A.), dejando secar al aire durante 15 min (en condiciones estériles) con el fin de que el tejido se adheriera al sustrato. En seguida se adicionaron 5ml de medio de cultivo (m.c.) compuesto por E.M en proporción de 80% y suplementado con 20% de SFB desactivado, evitando el desprendimiento de los explante, y después se procedió a incubar. Este método fué aplicado a todos los tipos de biopsias.

Método de Disgregación Secuencial Enzimática: De acuerdo a este método, se colocaron algunos trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer conteniendo una solución de Verseno (Apéndice 4) y se dejaron incubando en baño de agua a 37°C durante 15 min. El sobrenadante se desechó por decantación y en seguida se procedió a la digestión por colágena mediante una solución de colagenasa -- (Tipo IV, Sigma Chemical Co, U.S.A.) al 0.125% (Apéndice 5), la digestión - fué realizada a 37°C durante 60 min con agitación constante. Después de este tiempo las células obtenidas en suspensión de la disgregación del tejido se lavaron tres veces con PBS mediante centrifugación a 500g durante 5 min,

finalmente las células se resuspendieron en un poco de m.c. para poder ser - distribuidas a las cajas de Petri y llevarlas a un volumen final de 5ml.

El tejido restante fué incubado con una solución de tripsina al 0.25% (Apéndice 6) durante 30 min a 37°C en agitación continua. De esta forma se - produjo una digestión completa del tejido y las células así obtenidas fueron lavadas tres veces con PBS antes de ser cultivadas. Este método se utilizó - pparticularmente cuando la consistencia del tejido fué fibrosa.

~~Método de Disgregación Mecánica:~~ Cuando la biopsia fué de consistencia poco - fibrosa o de origen ganglionar, con el fin de separar las células no adheri- das al estroma, se colocaron algunos trozos del tejido en un cedazo con ma- lla de acero inoxidable de 0.25 mm de abertura (Bellico Glass Inc. U.S.A.), y con ayuda de un pistilo de vidrio se maceraron. En seguida, las células li- bres fueron obtenidas en forma de lavado pasando por la malla 5ml de m.c. pa- ra colectarse en una caja Petri y llevarse a incubación.

3.0 CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos celulares contenidos en las cajas de Petri, fueron manteni- dos en incubadora (Forma Scientific, Division of Mallinckrodt, Inc. U.S.A.) a 37°C en una atmósfera con 10% de bióxido de carbono y un ambiente satura- do de humedad.

4.0 SUBCULTIVOS CELULARES

Tan pronto las células obtenidas saturaron la superficie de cultivo, - se procedió a subcultivarlas. Los tiempos necesarios para efectuar los sub- cultivos, variaban de 4 a 15 días dependiendo del tipo celular que se trata- ra.

Los subcultivos se realizaron de la siguiente manera: primero se retiró el medio que contenía cada caja, a continuación se adicionaron 2ml de verseno en forma de lavado para quitar desechos celulares y cargas divalentes. En seguida el verseno se eliminó y se vertieron 2ml de una solución de tripsi- na 0.0255 y se introdujeron a incubación por 5 min a 37°C. Después de la in- cubación, la solución de tripsina conteniendo las células fué centrifugada durante 5 min a 500g, se desechó el sobrenadante y las células se resuspen- dieron en una pequeña cantidad de m.c. y finalmente se distribuyeron en las cajas de cultivo completando 5ml de m.c..

5.0 TECNICA DE CRIOPRESERVACION

Para preservar las células obtenidas a partir de las biopsias, se empleó la técnica de criopreservación, que consiste en lo siguiente:

Los cultivos en fase de crecimiento exponencial fueron tripsinizados y las células obtenidas se resuspendieron en una solución compuesta por 80% de E.M suplementado con 10% de SFB y 10% de Dimetil Sulfoxido. Inmediatamente después, se repartieron en alícuotas de 1ml (con la cantidad de células equivalentes a una caja de cultivo) en ampollitas de 2ml (Cooke Laboratory Products, U.S.A.).

Estas ampollitas fueron colocadas rápidamente en congelación a -70°C de 24 a 72 horas. Después de ese tiempo las ampollitas se trasladaron a nitrógeno líquido, a una temperatura de -190°C aproximadamente.

Para comprobar la esterilidad de las células congeladas, se sacó una ampollita del nitrógeno líquido, y se colocó en baño de agua a 37°C hasta que la muestra quedó completamente líquida. A continuación la ampollita se centrifugó a 500g durante 5 min, el sobrenadante se desechó y el botón celular fué resuspendido en m.c. Finalmente la suspensión celular fué distribuida en dos cajas de cultivo, agregándole la cantidad necesaria de m.c. para completar 5ml y finalmente se incubaron.

6.0 DETERMINACION DEL TIEMPO DE DOBLAJE DE LAS ESTIRPES CELULARES

A las estirpes celulares obtenidas, se les determinó el tiempo de duplicación en cultivo, esto se efectuó de manera rutinaria en todas las estirpes, para ello fueron tomados cultivos en fase exponencial y se hicieron subcultivos en 14 cajas de Petri de 35 x 15 mm (Costar, U.K. U.S.A.) a una densidad de 3×10^4 células por caja. Se evaluó el número inicial de células viables con un Hemocitómetro Neubauer (American Optical, U.S.A.). Posteriormente se procedió a determinar los puntos de la curva por conteos subsiguientes entre 1 y 2 días dependiendo del crecimiento de las células observado durante el subcultivo.

A partir de la curva de proliferación observada en cada estirpe celular, se obtuvo el tiempo de duplicación de las células antes de efectuar las pruebas de co-cultivo con leucocitos de sangre periférica.

7.0 OBTENCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (Técnica de Ficoll-Paque)

En condiciones de esterilidad se obtuvieron de 5 a 15 ml de sangre pe-

riférica de donadores normales, con una jeringa que contenía de 0.1 a 0.5ml de heparina (Rickercab/NC B, U.S.A.) a 1000 U.I./ml. La sangre fué distribuida en tubos colocando 5ml en cada uno y mezclándola con un volumen igual de Solución Salina Amortiguadora (SSA) (Apéndice 7). En seguida, esta mezcla -- fué vertida en tubos que contenían 2ml de la solución de Ficoll-Paque (Apéndice 8), la sangre se adicionó cuidadosamente resbalando por la pared del tubo y se centrifugó a 300g durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la banda blanca de células mononucleadas (formada entre los eritrocitos y el plasma) se extrajo cuidadosamente con una pipeta y se vertió en un tubo de centrifuga -- que contenía SSA, la suspensión resultante fué lavada por centrifugación a 375g durante 10 min, los lavados fueron repetidos dos veces para cada extracción de linfocitos. Finalmente, el sobrenadante (SSA) fué desechado y las células se resuspendieron en 2ml de m.c. y se realizó el conteo de las células mononucleadas en una cámara de Neubauer para ser distribuidas en las cajas de cultivo.

8.0 CO-CULTIVO DE CELULAS OBTENIDAS A PARTIR DE LAS DIFERENTES ESTIRPES CELULARES, CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE DONADORES NORMALES

- Conjugación de leucocitos de sangre periférica con células provenientes de diferentes estirpes celulares -

Para llevar a cabo la conjugación, se hicieron subcultivos celulares -- en fase de crecimiento exponencial, luego de 72 horas de cultivo se adicionaron 1×10^6 leucocitos y se procedió a incubar. Transcurrido este tiempo, se evaluó la conjugación de la siguiente manera: después de 24 horas de iniciado el co-cultivo las cajas que contenían las células adheridas, fueron lavadas tres veces con PBS sin calcio ni magnesio y se tñieron usando la técnica de May-Greenwald Giemsa (Apéndice 9). El grado de conjugación se evaluó de acuerdo al número de linfocitos adheridos a cada célula, para esto se consideró el siguiente criterio: interacción débil cuando hubo de 1-3 células -- adheridas; interacción fuerte cuando se encontraron de 4-15; y muy fuerte -- cuando hubieron más de 15 linfocitos adheridos.

- Co-cultivo de células provenientes de las diferentes estirpes celulares, con leucocitos de sangre periférica en ausencia y presencia de -- 100 U/ml de Interleucina-2 recombinante (rIL-2) -

Para efectuar los co-cultivos, se hicieron subcultivos de 3×10^4 células

las por caja, en un total de 20 cajas de 35 x 15 mm, a diez cajas se adicionaron 1×10^6 leucocitos de sangre periférica con m.c. (Cajas control), y a la otra mitad se adicionaron además de leucocitos rIL-2 (Cetus Corporation, U.S.A.) a una concentración de 100 U/ml (100 U/ml son las requeridas para obtener una óptima activación de linfocitos (119)). Y se determinó la curva de proliferación de las diferentes estirpes celulares en estas condiciones mediante conteos de las células cada 48 horas.

Simultáneamente a los conteos de las células malignas; se prepararon placas de los leucocitos encontrados en el sobrenadante de los co-cultivos y se evaluó el porcentaje de activación de dichos linfocitos. Para esto, se tomó en consideración a las células que presentaron una morfología alterada, esto es, un citoplasma aumentado bien definido con morfología típica de célula plasmática con núcleo acéntrico, así como aquellos que mostraron una coloración muy azulosa en tinción de Giemsa (1, 33, 41, 95).

9.0 VARIOS

Las biopsias fueron transportadas en tubos con 15ml de medio nutritivo desde el momento de su extracción hasta su recepción en el laboratorio. Aquellas que no fueron procesadas inmediatamente se preservaron en refrigeración a 4°C hasta el momento de su cultivo. Nunca se mantuvieron en refrigeración por más de 24 horas.

Todos los experimentos realizados, se hicieron antes de la décima resembrada, por duplicado y un mínimo de dos veces.

Todos los medios y soluciones utilizadas para el cultivo y subcultivo de las células, fueron previamente calentadas a 37°C en baño de agua antes de ser utilizadas.

Todas las soluciones utilizadas para el cultivo fueron previamente esterilizadas por medio de filtros (Millipore, Type GS, U.S.A.) de poro de 22 micras.

Los reactivos utilizados, a menos que se indique, fueron de grado reactivo. Asimismo, el material de cristalería fué de tipo Pyrex y para su esterilización se utilizó autoclave a 21 lb de presión durante 20 min, y posteriormente se introdujo en estufa a 100°C durante 20 min para su secado.

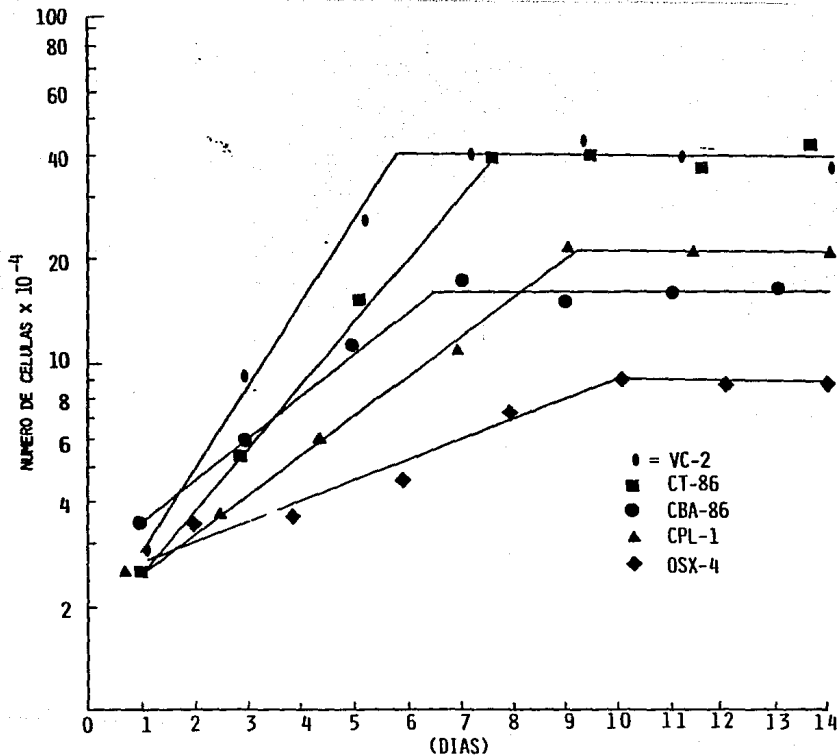
IV. RESULTADOS

1.0. CINÉTICAS DE PROLIFERACION DE LAS ESTIRPES CELULARES Y SU CONJUGACION CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE DONADORES NORMALES.

Al efectuar los conteos celulares en función del tiempo de cultivo de 4 diferentes estirpes de origen tumoral y una de fibroblastos normales, encontramos que existe gran heterogeneidad en cuanto a sus cinéticas de proliferación, lo cual se observa claramente en los diferentes grados de saturación obtenidos, (Gráfica 1). Estas diferencias fueron muy marcadas, pues se observó que el menor tiempo de doblaje correspondió al carcinoma de tiroides (CT-86) con tan sólo 40.6 hrs, mientras que para el osteosarcoma (OSX-4) fué de 121 hrs (Tabla 1). Para el carcinoma de pulmón (CPL-1) este tiempo fué de 62.5 hrs y finalmente se encontró uno de 59 hrs para el carcinoma basocelular (CBA-86). Asimismo, para la estirpe de fibroblastos normales (VC-2) -- provenientes de prepucio sano, la cual se utilizó como control en estos ensayos, la población presentó un tiempo de doblaje mucho menor a la de los de origen tumoral con solo 33 hrs.

En lo que respecta a los niveles de saturación, encontramos grandes diferencias siendo el menor para OSX-4 con sólo 90 000 células y el mayor para CT-86 y VC-2 con 400 000. Por otro lado, es relevante el hecho de que las células de origen tumoral presentaron una menor adherencia al sustrato en comparación a las células de VC-2 utilizadas como control lo cual fué detectado en el momento de la tripsinización. Las células tumorales, como era de esperarse, se desprendieron casi inmediatamente después de agregada la tripsina, mientras que los fibroblastos necesitaban además de 5 min en este enzima de una fuerte pipetación para desprenderlos.

Ya que se ha demostrado en trabajos anteriores que los LSP interactúan con células provenientes de tumores humanos, fenómeno llamado conjugación, se decidió evaluar dicho fenómeno con las estirpes celulares antes mencionadas. La conjugación fué evaluada por medio de co-cultivos de cada estirpe con LSP después de 24 hrs de co-cultivo (Tabla 1). El menor porcentaje de conjugación total presentada por las estirpes malignas correspondió al CT-86 con 10%, en el caso de CBA-86 se observó un 30%, para el CPL-1 fué de 50% y finalmente la estirpe de OSX-4 presentó una conjugación de 51% que fué la mayor. Debemos hacer notar que la estirpe de células normales, VC-2, presentó una conjugación de sólo un 19%.



GRAFICA 1. CINETICAS DE PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS NORMALES (VC-2), CARCINOMA DE TIROIDE (CT-86), CARCINOMA DE PULMON (CPL-1), CARCINOMA BASOCELULAR (CBA-86), Y OSTEOSARCOMA (OSX-4).

TABLA 1

ESTIRPE CELULAR	TIEMPO DE DOBLAJE (HRS)	PORCENTAJE DE CONJUGACION EN (24HRS)		
		D	F	T
FIBROBLASTOS (VC-2)	33	19	0	19
CA. DE TIROIDE (CT-86)	40.6	10	0	10
CA. BASOCELULAR (CBA-86)	59	29	1	30
CA. DE PULMON (CPL-1)	62.5	45	5	50
OSTEOSARCOMA (OSX-4)	121	45	6	51

TIEMPO DE DOBLAJE Y PORCENTAJE DE CONJUGACION (INTERACCION) OBSERVADA ENTRE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA Y CELULAS PROVENIENTES DE TUMORES Y FIBROBLASTOS DE PREPUICIO SANO, EN CO-CULTIVOS DE 24 HRS. CONJUGACION: D= DEBIL, F= FUERTE Y T= TOTAL.

degeneración antes de poder terminar con el experimento.

- Inhibición a la proliferación en presencia de LSP y rIL-2 -

Cuando se adicionó rIL-2 simultáneamente con LSP en los co-cultivos, se detectó en todos los experimentos con células de origen tumoral que la inhibición a la proliferación fué significativamente mayor que la mostrada en ausencia de rIL-2. Para conocer que tan significativa era esta inhibición, - se aplicó un análisis de varianza de un factor por rangos de Kruskall-Wallis (Apéndice 11) (125) para cada una de estas estirpes (Tabla 2), planteándose como hipótesis nula la siguiente:

H₀: Los tratamientos aplicados (proliferación en condiciones normales (0), proliferación en co-cultivo con LSP en ausencia (-) y en presencia (+) de 100 U/ml de rIL-2) inhiben de igual manera la proliferación de las estirpes.

Los resultados de esta prueba, para las estirpes de CT-86, CBA-86 y - OSX-4 con niveles de significancia (alfas) de 0.049, 0.011, y 0.009 respectivamente, indican que los tratamientos aplicados inhiben de forma diferente la proliferación celular.

Para el caso de la estirpe CPL-1 (Gráfica 4) se aplicó una prueba de rango para muestras independientes o prueba U de Mann-Whitney (Apéndice 12) (125), dado que solo se tuvieron dos tratamientos ((0) y (+)), encontrándose que para un nivel de significancia mayor de 0.025 se rechaza la hipótesis nula (H₀) antes planteada, lo que nos muestra en este caso que también hay una inhibición diferente al aplicarle ambos tratamientos. En lo que respecta a - las células normales (VC-2), la inhibición fué muy semejante tanto en presencia como en ausencia de rIL-2 (Gráfica 6), para esta estirpe al aplicarle la prueba de Kruskall-Wallis se obtuvo que no existen diferencias significati-vas en la inhibición de la proliferación celular al aplicarle los diferentes tratamientos (Tabla 2).

Como mencionado anteriormente el CBA-86 resulto ser la estirpe celular que presentó una mayor sensibilidad a ser inhibida por LSP, de tal forma que fué la única que sufrió una disminución en el número celular desde el momento del co-cultivo (Gráfica 3). Sin embargo, esta disminución del número de - células desapareció apartir del segundo día de co-cultivo. Después del CBA-86 el OSX-4 presentó una fuerte inhibición a proliferar en presencia de rIL-2, pero en este caso se encontró una marcada disminución del número de células

T A B L A 2

ANALISIS DE VARIANZA POR RANGOS DE KRUSKAL-WALLIS

ESTIRPE CELULAR	VALOR CALCULADO DE H	VALOR CRITICO PARA LA PRUEBA	NIVEL DE SIGNIFICANCIA (α)
CT-86 (GRAFICA 2)	7.336	5.692	0.049
CBA-86 (GRAFICA 3)	6.978	6.488	0.011
OSX-4 (GRAFICA 5)	8.037	8.000	0.009
VC-2 (GRAFICA 6)	2.634	4.500	0.102

PRUEBA DEL RANGO PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES O PRUEBA U DE MANN

CPL-1 (GRAFICA 4)	5.31	5.31	0.025
-------------------	------	------	-------

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE LAS CURVAS DE PROLIFERACION PARA LAS ESTIRPES EN
CONDICIONES NORMALES Y EN CO-CULTIVO CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN PRE-
SENCIA DE 100 U/ML DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE (rIL-2).

Al relacionar el tiempo de doblaje con la conjugación presentada por cada estirpe celular, se confirmó una vez más la relación encontrada en trabajos previos (126, 127) entre el tiempo de doblaje de las estirpes tumorales y el grado de interacción con LSP in vitro, en donde a un mayor tiempo de doblaje correspondió a un aumento de conjugación con LSP.

2.0 CINÉTICAS DE PROLIFERACION DE CELULAS PROVENIENTES DE LAS ESTIRPES TUMORALES EN CO-CULTIVO CON LSP EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE (rIL-2).

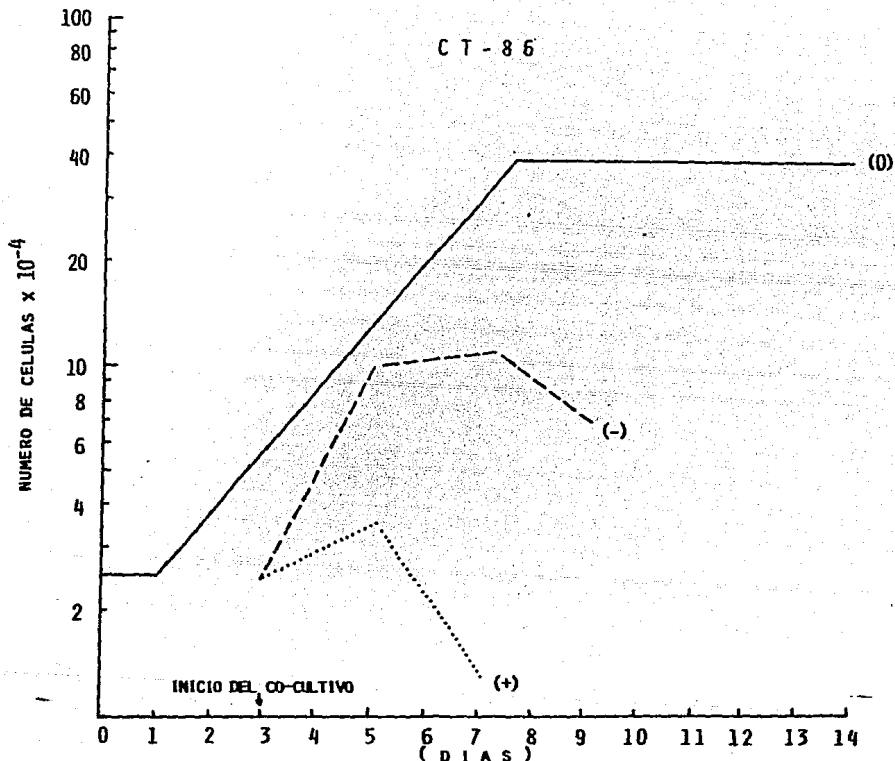
Con el propósito de determinar el grado de inhibición a la proliferación de las células provenientes de tumores en presencia de las células responsables de la inmunidad (LSP), así como el papel que juega la IL-2 en este proceso, se evaluó la cinética de proliferación de cada estirpe celular en co-cultivo con LSP, en ausencia y presencia de rIL-2.

La inhibición a la proliferación por LSP fué muy heterogénea en las diferentes estirpes, aunque siempre mayor en presencia de rIL-2 (Gráficas 2-6).

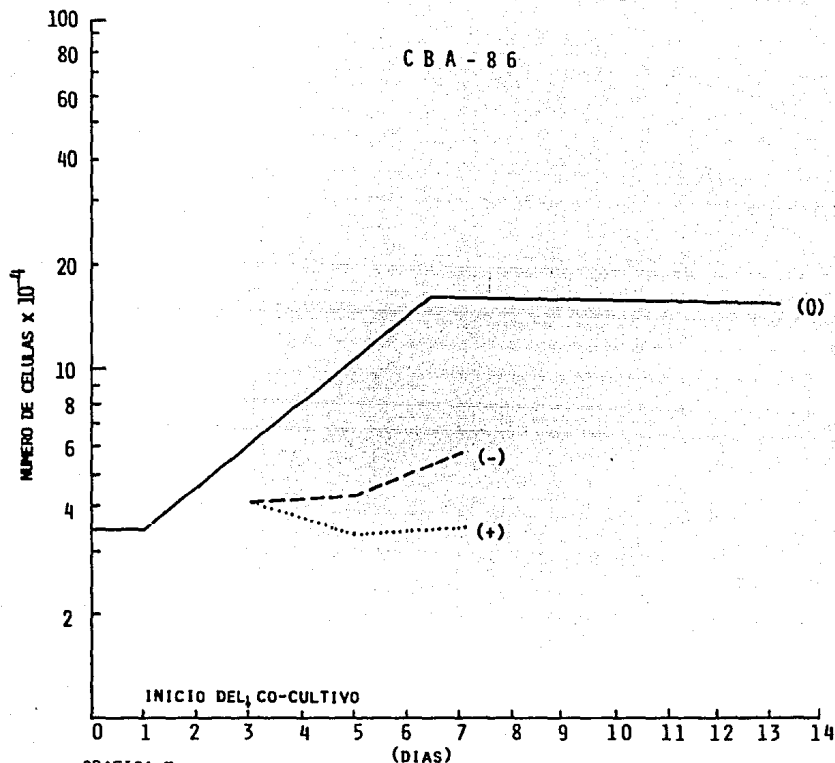
- Inhibición a la proliferación en presencia de LSP -

El CT-86 mostró inhibición a la proliferación después del segundo día de co-cultivo, presentándose con mayor intensidad después del cuarto día, en donde ya se observa una disminución del número celular (Gráfica 2). La respuesta del CBA-86 fué diferente, dado que en éste la inhibición fué muy evidente a partir del momento del co-cultivo (Gráfica 3). Sin embargo, para escaso después del segundo día de co-cultivo se presentó una recuperación de la capacidad de proliferación celular. Esta cinética se siguió solo por cuatro días, puesto que al efectuar la siguiente evaluación tres días después la totalidad de las células estaban desprendidas del sustrato y en mal estado. El OSX-4 fué más resistente a la inhibición a LSP que el CT-86 ya que no fué sino hasta el quinto día de co-cultivo cuando esta se presentó, sin embargo también hubo una disminución en el número celular dos días después (Gráfica 5).

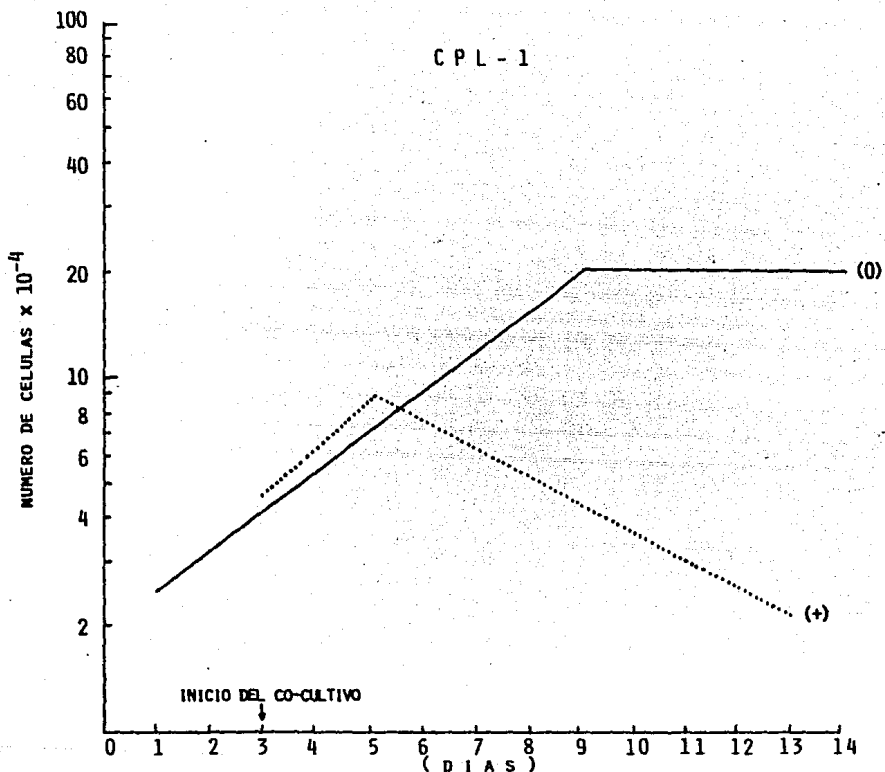
Por otra parte, el control VC-2, también presentó una pequeña inhibición en los primeros cuatro días de co-cultivo, y una casi completa inhibición durante los siguientes dos días hasta presentar una pequeña disminución en el número celular durante los últimos dos días (Gráfica 6). El CPL-1 (Gráfica 4) no pudo ser evaluado, por que las células entraron en un período de



GRAFICA 2. CINETICAS DE PROLIFERACION DE CELULAS DE CARCINOMA DE TIROIDE (CT-86) EN CONDICIONES NORMALES (0), EN CO-CULTIVO CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) (-) Y EN CO-CULTIVO CON LSP EN PRESENCIA DE 100 U/ML DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE rIL-2 (+).

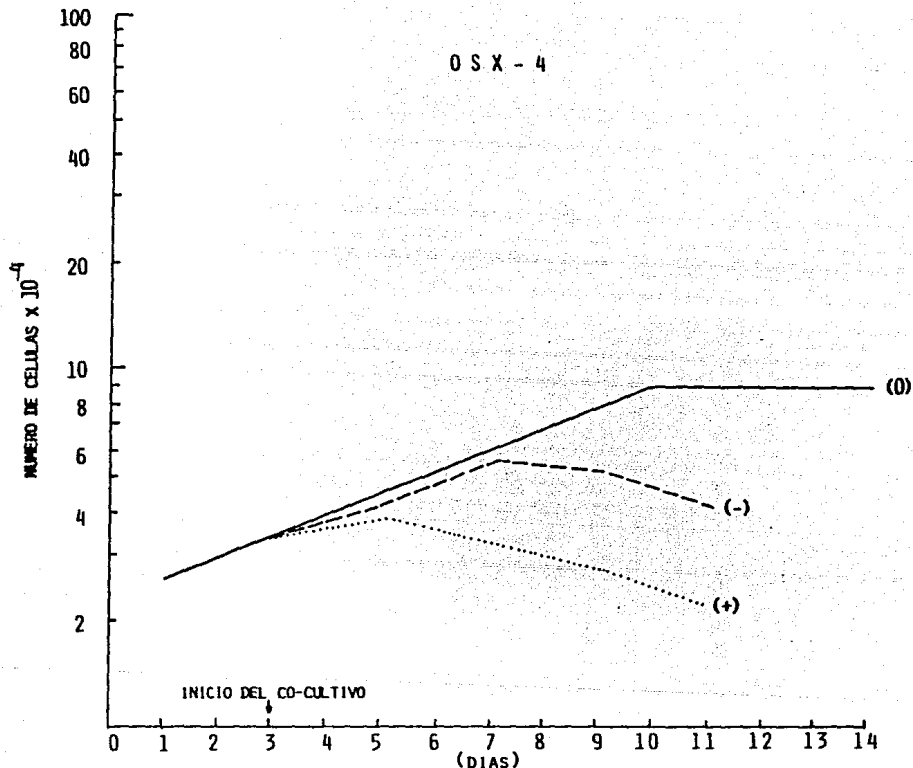


GRAFICA 3. CINETICAS DE PROLIFERACION DE CELULAS DE CARCINOMA BASOCELULAR (CBA-86) EN CONDICIONES NORMALES (0), EN CO-CULTIVO CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) (-), Y EN CO-CULTIVO CON LSP EN PRESENCIA DE 100 U/ML DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE rIL-2 (+).

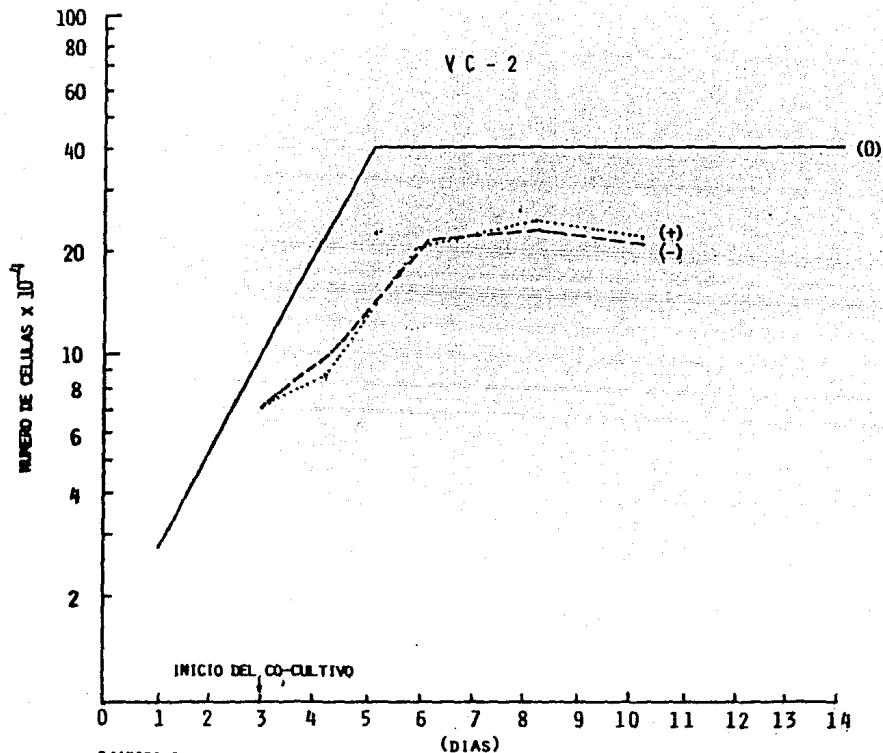


GRAFICA 4. CINETICAS DE PROLIFERACION DE CELULAS DE CARCINOMA DE PULMON (CPL-1) EN CONDICIONES NORMALES (0) Y EN CO-CULTIVO CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN PRESENCIA DE 100 U/ML. DE rIL-2 (+).

OSX - 4



GRAFICA 5. CINETICAS DE PROLIFERACION DE CELULAS DE OSTEOSARCOMA (OSX-4) EN CONDICIONES NORMALES (0), EN CO-CULTIVO CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) (-) Y EN CO-CULTIVO CON LSP EN PRESENCIA DE 100 U/ML DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE rIL-2 (+).



GRAFICA 6. CINETICAS DE PROLIFERACION DE CELULAS DE FIBROBLASTOS NORMALES (VC-2) EN CONDICIONES NORMALES (0), EN CO-CULTIVO CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) (-) Y EN CO-CULTIVO CON LSP EN PRESENCIA DE 100 U/ML DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE rIL-2 (+).

a partir del tercer día de co-cultivo (Gráfica 5). Por otro lado, el CT-86 - sufrió una moderada inhibición durante los primeros dos días de co-cultivo, - seguida de una marcada disminución del número celular hasta casi eliminar al cultivo durante los dos últimos días del experimento (Gráfica 2). Por último el CPL-1 fué la única estirpe celular que no sufrió inhibición alguna durante los primeros dos días de co-cultivo (Gráfica 4), aunque se presentó -- posteriormente una marcada disminución del número celular.

Con la finalidad de poder comparar el efecto inhibitorio que las diferentes estirpes celulares sufrieron en presencia de LSP y de rIL-2, se compararon los porcentajes de inhibición de cada una a los cuatro días de co-cultivo. Para efectuar esta comparación se asignó el valor de 100% a los cultivos control, o sea sin LSP y rIL-2, y se calculó el porcentaje de inhibición mediante una regla de tres, utilizando para ello el número de células existentes a los cuatro días de co-cultivo (Tabla 3). Se consideró pertinente -- utilizar cuatro días de co-cultivo puesto que es tiempo suficiente para que las células asesinas puedan efectuar su función. Las células NK actúan casi desde el principio del co-cultivo, mientras que las LAK comienzan su función citotóxica a los dos días y alcanzan su mayor actividad alrededor de los cuatro.

En ausencia de rIL-2 la inhibición fué muy semejante para CT-86 y CBA-86 con 63.3 y 63.7% respectivamente, para OSX-4 que corresponde a la estirpe de mayor tiempo de doblaje la inhibición fué de únicamente 8.2%, mientras -- que para la estirpe de fibroblastos normales se tuvo una inhibición intermedia de 47.5%. Al comparar estos resultados con los obtenidos en presencia de rIL-2 notamos que el CT-86 fué casi completamente inhibido con un 95.3%, -- mientras que el CBA-86 que en ausencia de rIL-2 era inhibido en forma semejante presentó sólo el 77.5%. Por otro lado, el OSX-4 pasó de tener poca inhibición sin rIL-2 a una de 46.7% en presencia de rIL-2. Vale la pena destacar que las células de origen normal VC-2 fueron las únicas que no aumentaron su grado de inhibición al agregárseles la rIL-2, presentando valores de 47.5% y 48.7% respectivamente. En general observamos que en las estirpes tumorales la inhibición en presencia de rIL-2 fué mucho mayor que con sólo LSP, y que esta inhibición no estaba relacionada con los parámetros cinéticos de cada una de ellas (tiempo de doblaje, o grado de saturación in vitro). Por -- otro lado en presencia de rIL-2 dos estirpes de origen tumoral tuvieron la misma inhibición que para los fibroblastos (CPL-1 y OSX-4), mientras que --

T A B L A 3

ESTIRPE CELULAR	No. DE CELULAS x 10 ³			% DE INHIBICION	
	CONTROL	LSP	LSP+rIL-2	LSP	LSP+rIL-2
VC - 2	400	210	205	47.5 + 1.3	48.7 + 1.3
CT - 86	300	110	14	63.3 + 1.3	95.3 + 1.2
CBA - 86	160	58	36	63.7 + 1.3	77.5 + 1.3
CPL - 1	120	ND	64	ND	46.7 + 3.4
OSX - 4	61	56	33	8.2 + 0.80	46.7 + 3.0

NUMERO DE CELULAS Y PORCENTAJE DE INHIBICION A LOS CUATRO DIAS DE CO-CULTIVO, DE LAS DIFERENTES ESTIRPES CELULARES EN PRESENCIA DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) Y LSP MAS 100 U/ML DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE (rIL-2). ND=NO DETERMINADO.

* A TRAVES DE UN ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR CON BLOQUES ALEATORIOS COMPLETOS POR RANGOS DE FRIEDMAN, SE ENCONTRO QUE ESTOS TRATAMIENTOS INHIBEN DE MANERA SIGNIFICATIVA LA PROLIFERACION CELULAR DE LAS ESTIRPES TRATADAS CON UN $\alpha = 0.0046$.

las otras dos fueron mucho más susceptibles.

Finalmente, a través de un análisis de varianza de un factor con bloques aleatorios completos por rangos de Friedman (125) (Apéndice 13), se en contó que los tratamientos (co-cultivo sin rIL-2 y co-cultivo con rIL-2) en el cuarto día de co-cultivo (Tabla 3) para las estirpes CT-86, CBA-86, -- OSX-4, y VC-2 inhiben de manera diferente la proliferación celular de las estirpes tratadas, con un nivel de significancia de 0.0046.

3.0 EVALUACION DE LA ACTIVACION DE LINFOCITOS EN CO-CULTIVO CON LAS ESTIRPES CELULARES EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE rIL-2.

Es conocido que los linfocitos al entrar en contacto con su antígeno específico comienzan con un período de activación que conlleva a la proliferación de linfocitos T mediada por la liberación de IL-2. Con la finalidad de determinar si en nuestras condiciones de cultivo se llevaba a cabo dicha activación, procedimos a evaluar los cambios morfológicos que los linfocitos sufrieron en los co-cultivos. Por otra parte, para diferenciar si esta activación era en respuesta al reconocimiento de un antígeno o a la adición externa de rIL-2, se procedió a determinar el porcentaje de células activadas en los co-cultivos de la estirpe celular OSX-4. Llamamos célula activada a aquella que aumenta importantemente su citoplasma, el cual toma una coloración muy azulosa en tinción de Giemsa y tiene su núcleo acéntrico entre otras alteraciones (Figura 8). Evidentemente algunas células comienzan el proceso de mitosis, pero tomando en cuenta que el tiempo de co-cultivo fué de únicamente 5 días, observamos solo un 2% de células en mitosis. Se utilizó la estirpe OSX-4 porque era la que casi no presentaba inhibición en co-cultivo y aumentaba considerablemente (a casi el 50% de inhibición) en presencia de rIL-2.

Encontramos que al hacer la cinética de activación de linfocitos en presencia de rIL-2 la cantidad de estos pasaba de 12% a los dos días, seguida de 46% a los cuatro y terminaba con un 82% a los seis. Sin embargo, en ausencia de rIL-2 esta era de 3% a los dos días, seguida de 18% a los cuatro y finalmente de 71% a los seis. Consideramos que la mayor activación en presencia de rIL-2 se debe a la presencia de este mitógeno, pero que en ausencia de este también hubo un incremento considerable debido casi seguro a la existencia de algún antígeno. Es evidente que quedaría por determinar si este es un antígeno tumoral, o sólo de histocompatibilidad.

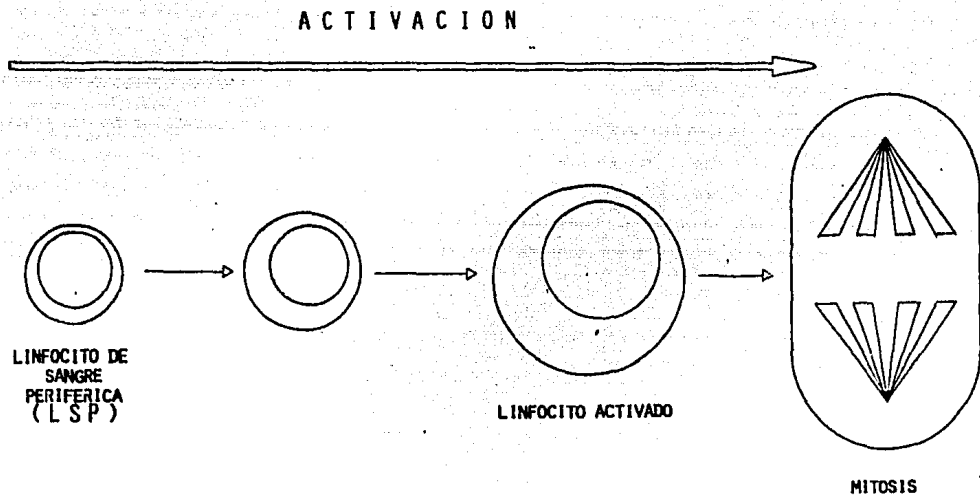


FIGURA 8. REPRESENTACION ESQUEMATICA QUE MUESTRA LA MORFOLOGIA DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN EL PROCESO DE ACTIVACION. EL PORCENTAJE DE LINFOCITOS ACTIVADOS ENCONTRADO EN LOS CO-CULTIVOS DE OSX-4 CON LSP, SE EFECTUO EN BASE A ESTE CRITERIO MORFOLOGICO.

V. DISCUSION

Actualmente son conocidos los esfuerzos realizados por un gran número de investigadores con el propósito de dar alivio a los padecimientos del cáncer, lo cual ha favorecido los estudios dirigidos a establecer tratamientos adecuados. Hasta ahora, los más utilizados han sido la cirugía, la quimioterapia, y la radioterapia. Sin embargo, desde hace dos décadas se intentan establecer otras alternativas apoyadas en la acción del sistema inmune, como - la Inmunoterapia Adoptiva basada en la transferencia adoptiva de células inmunes activadas, la cual hoy en día gracias a intensos estudios se trata de implantar como un método opcional para pacientes con cáncer metastásico, y cuyas posibilidades de aplicación son muy prometedoras.

Con este nuevo tratamiento, se han logrado obtener resultados alentadores en algunos pacientes con cáncer avanzado, y resientemente se han reportado curaciones completas utilizando este método con IL-2 en aproximadamente - 5% de los cánceres metastásicos a víveras, y también en algunos casos de cánceres de epidermis (melanomas) (124). Sin embargo, para el 95% de los casos en los cuales la inmunoterapia con IL-2 no fué de utilidad, los pacientes tuvieron que soportar el efecto altamente tóxico que está asociado a este tipo de terapia.

Evidentemente, esde urgente necesidad el desarrollo de una prueba in - vitro que permite establecer la sensibilidad individual de cada tumor al -- tratamiento por inmunoterapia utilizando IL-2. Generando de esta forma células inmunes reactivas específicamente a antígenos tumorales con una alta actividad citotóxica.

Por otro lado, es indiscutible el importante papel que juega el sistema inmune manteniendo la homeóstasis del organismo, en especial mediante el proceso de vigilancia inmunológica llevada a cabo tanto por los linfocitos T, células NK, como por macrófagos los cuales participan directamente en la inmunidad celular (24).

En el presente trabajo, se determinó el efecto inhibitor a la proliferación de células provenientes de tumores por medio de la activación de linfocitos con IL-2. Encontrándose que existe mayor inhibición en las células - en cultivo con LSP y que esta se ve incrementada significativamente en presencia de rIL-2. Asimismo, se confirmó una vez más la relación inversa que - existe ante el porcentaje de conjugación y el tiempo de duplicación de las

estirpes celulares.

es conocido que el tiempo de doblaje de una estirpe celular in vitro está relacionado con el grado de diferenciación, de tal forma que cuando esta es mayor, la proliferación tiende a disminuir, mientras que cuando se presenta una desdiferenciación esta conduce a una proliferación mayor (16, 17). Tomando como antecedente lo anterior, consideramos que el hecho de que la cinética de proliferación para las distintas estirpes celulares estudiadas -- mostrara una gran heterogeneidad (de 40 hrs para la CT-86 hasta de 121 hrs para la de OSX-4), puede deberse a que estas presentan un grado de diferenciación distinto además del hecho obvio que son de diferentes tipos histológicos.

Ahora bien, suponemos que la diferencia encontrada en el nivel de saturación de las diferentes estirpes, se puede atribuir al tamaño presentado por las células. En efecto, se obtuvieron desde células muy pequeñas para el VC-2 (con una saturación de 4×10^5), hasta considerablemente grandes para la OSX-4 (con saturación de sólo 9×10^4).

Actualmente se conoce la existencia de los LFA (del inglés Lymphocyte Function Associated; Función Asociada a Linfocitos), cuya intervención en la conjugación de células blanco con linfocitos T citotóxicos se ha puesto de manifiesto por algunos estudios funcionales. Estos establecen que la conjugación entre células blanco y linfocitos se puede llevar a cabo por dos caminos antígeno independientes: el primero llamado LFA-1 que es inespecífico y parece también estar en macrófagos, y un segundo dependiente de la interacción entre el LFA-2 (CD-2) y la función asociada al antígeno de células blanco LFA-3. Puesto que se ha encontrado que las células tumorales in vitro presentan LFA-3 (58-59), suponemos que es la interacción LFA-2 -LFA-3 la que se está llevando a cabo en el proceso de conjugación realizado a lo largo de este trabajo. De ser así, la estirpe OSX-4 con un grado de conjugación de 51% debería ser aquella con mayor cantidad de LFA-3, mientras que la CT-86 con sólo 10% de conjugación deberá ser la que presente menor cantidad de este antígeno en su superficie. Sin embargo sería recomendable utilizar anticuerpos anti-LFA-3 contra los receptores de este tipo, para verificar que es este el proceso que en verdad se lleva a cabo en este tipo de conjugación. No obstante con los datos con que contamos actualmente no es posible descartar la intervención del LFA-1, o de algún otro factor aún no descrito.

Por otro lado, si consideramos que existe una correlación inversa en-

tre el tiempo de doblaje de las estirpes y la conjugación presentada por cada una de ellas, entonces se podría atribuir a un fenómeno de reconocimiento en el cual los antígenos LFA (o de cualquier otro tipo) de membrana sean ciclodependientes. De tal forma que sean presentados por las células sólo en cierta fase del ciclo celular y que se expresen el tiempo necesario para que sean detectados por algunas de las células efectoras. De manera que postularíamos que las células con mayor tiempo de doblaje expresarían por un período mayor sus antígenos de superficie, siendo por tanto fuertemente reconocidos por las células inmunológicas. Produciendo en consecuencia una gran respuesta de rechazo. Asimismo, en las estirpes en que la presentación de neoantígenos fuera de mucho menor tiempo, se tendría por consecuencia una menor posibilidad de ser detectadas. Considerando que la relación inversa entre el tiempo de duplicación con el grado de conjugación ya había sido observada en trabajos previos utilizando tipos celulares diferentes (126, 127), podría sugerir que la existencia de una etapa en el ciclo celular en el que cada estirpe muestre sus neoantígenos, sea un fenómeno más generalizado.

Aunque nuestra suposición de la existencia de neoantígenos ciclodependientes antes descrita sea probable, dado que recientemente se ha demostrado su existencia en ratones con melanoma, no hay que perder de vista que además se podría pensar que la conjugación observada fuera producto de un reconocimiento de antígeno de histocompatibilidad. Esta posibilidad se basa en el hecho de que para este estudio se utilizaron LSP alógenos. Sin embargo, creemos que esta posibilidad es poco probable ya que sería muy fortuito el hecho de que para cada estirpe celular empleada se encontrara siempre una relación directa entre el grado de conjugación, el tiempo de doblaje y sus diferencias entre antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

La inhibición a la proliferación de las estirpes utilizadas en este trabajo por los LSP, nos hace suponer que estos últimos por sí solos reconocen cierta estructura en las células transformadas que desencadenan su activación. Esta activación es conocida por inducir la producción de IL-2 (62-68), lo cual genera linfocitos citotóxicos que consideramos fueron los causantes de la inhibición observada. Evidentemente la presencia de IL-2 exógena (rIL-2) nos explica el porque al agregar esta linfocina a nuestros cultivos hayamos encontrado una mayor inhibición. Una vez más podemos pensar que el hecho de que se haya presentado inhibición a la proliferación tanto de células tumorales como normales, pueda ser resultado del reconocimiento ~

del CMH. Sin embargo, también existe la posibilidad de que se haya reconocido un antígeno tumoral de superficie. Por otro lado, la estirpe CBA-86 fué - la única que mostró una gran inhibición desde el momento del co-cultivo y no a los tres días de co-cultivo como las demás, llegando a ser la más inhibida con más del 95%. Creemos que este comportamiento se pueda atribuir a la sensibilidad de estas células a la lisis mediada por las células NK que están - presentes en toda población de LSP.

Otro punto que consideramos importante, fué la observación de que para la estirpe control (fibroblastos normales) la inhibición fué casi la misma en co-cultivo con LSP tanto en ausencia como en presencia de rIL-2. Puesto que es conocido que los linfocitos activados con IL-2 reconocen exclusivamente a células tumorales y no lisan a las normales (114, 117), nuestros resultados nos hacen suponer que los fibroblastos por ser de origen no tumoral se hayan comportado de esta forma. Por otro lado, el hecho de que las células tumorales hayan presentado una importante diferencia en el grado de activación cuando los LSP estaban activados, nos hace pensar en la posible existencia - de un reconocimiento de antígenos tumorales no simplemente en el reconoci- miento del CMH anteriormente mencionado.

En este contexto, no hay que perder de vista la posible intervención - de otro tipo celular que pudiera ser el responsable de la inhibición tumoral encontrada. Ya que es conocido que la IL-2 es capaz de aumentar la capacidad citotóxica no únicamente de los linfocitos efectores presentes en la proliferación de las células mononucleadas, sino también de las células llamadas NK, LTC y de las LAK (91, 101, 111-116). Por lo cual no descartamos la posibilidad de que el efecto inhibitorio a la proliferación celular encontrada en presencia de IL-2, pueda ser explicada por algún tipo de colaboración entre estos tipos de células citotóxicas.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- Existe una relación inversa entre el grado de conjugación linfocito-célula tumoral con el tiempo de doblaje in vitro, lo cual nos induce a pensar en la posible existencia de antígenos ciclo dependientes reconocibles por el sistema inmune. De existir dichos antígenos, se abriría una nueva área de estudio en la inmunología tumoral.
- 2.- Existe una diferente susceptibilidad de las células tumorales a ser lisadas por los linfocitos de sangre periférica, lo cual evidentemente abre la posibilidad de un ensayo de inmunosensibilidad.
- 3.- Existen células más susceptibles a ser lisadas por NK, lo cual en caso de ser semejante al comportamiento in vivo, determinaría que tipo de tumores podría ser tratado con inmunoterapia de células LAK.
- 4.- Creemos tener las condiciones necesarias para establecer co-cultivos de linfocitos con células tumorales que permitan la expansión de células que reconozcan antígenos tumor-específicos que posteriormente puedan ser empleados en la llamada Inmunoterapia Adoptiva.

VII. APENDICES

APENDICE 1

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, utilizando para ello dos matraces. Se adicionan 13.4 g/l de medio de Eagle en polvo (Gibco Laboratorios U.S.A) agitándose suavemente, - se agregan 3.7g de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de penicilina 100 U/ml de estreptomycin. Se completa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos que el que se desea, que es de 7.2 (con ácido clorhídrico) y se esteriliza por filtración con membrana de poro de - 0.22 u.

Composición del Medio Mínimo Esencial de Eagle

Aminoácidos	Concentración (mg)
L-Arginina.....	84.00
L-Cistina.....	62.57
L-Glutamina.....	584.00
Glicina.....	30.00
L-Histidina HCl, H ₂ O.....	42.00
L-Isoleucina.....	105.00
L-Leucina.....	105.00
L-Lisina, HCl.....	146.00
L-Metionina.....	30.00
L-Fenilalanina.....	66.00
L-Serina.....	42.00
L-Treonina.....	95.00
L-Triptofano.....	16.00
L-Tirosina (sal disódica).....	104.20
L-Valina.....	94.00
Vitaminas	
D-Ca Pantotenato.....	4.00
Cloruro de Colina.....	4.00
Acido Fólico.....	7.20
Inositol.....	7.20
Nicotinamida.....	4.00

Piridoxal.....	4.00
Riboflavina.....	0.40
Tiamina.....	4.00
Sales Inorgánicas	
Cloruro de Calcio Anhidro.....	200.00
Nitrato de Hierro III Nonhidratado.....	0.10
Cloruro de Potasio.....	400.00
Sulfato de Magnesio Anhidro.....	97.67
Cloruro de Sodio.....	6400.00
Fosfato Monosódico monohidratado.....	125.00
Otros Compuestos	
L-Glucosa.....	4500.00
Rojo Fenol.....	15.00

APENDICE 2

DESACTIVACION DEL SUERO FETAL DE BOVINO (SFB)

Se toma una botella de suero fetal de bovino (Gibco, U.S.A) y se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para que éste quede en estado líquido, posteriormente se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30min, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular en el suero y que interfieren al inhibir la proliferación celular en los cultivos. En seguida es transvasado en frascos más pequeños para su mejor manejo.

APENDICE 3

PREPARACION DE LA SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

En un litro de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

Compuestos	Concentración (g/l)
Cloruro de Sodio.....	8.00
Fosfato de Sodio Monobásico.....	2.16
Fosfato de Potasio.....	0.20
Cloruro de Potasio.....	0.20

Una vez disueltas las sustancias, se ajusta el pH a 7.2 con ácido clorhídrico y se esteriliza la solución por medio de autoclave, 20 lb por 20 min.

APENDICE 4

PREPARACION DE VERSENO

A 800 ml de agua bidestilada, se adicionan las siguientes sustancias:

Compuestos	Concentración (g/l)
Tris Base.....	3.04
Cloruro de Sodio.....	8.00
Cloruro de Potasio.....	0.40
Etilén-diamín-tetra-acético (EDTA).....	0.20

Posteriormente se agitan perfectamente los compuestos con el agua y se afora a 1 ltcon agua bidestilada, ajustándose el pH a 7.7 con ácido clorhídrico 10 N y se esteriliza por medio de autoclave a 20 lb durante 20 min.

APENDICE 5

PREPARACION DE LA SOLUCION DE COLAGENASA

La solución de colagenasa al 0.125% se prepara disolviendo 0.125g de Collagenase Type IV (Sigma Chemical U.S.A) y 0.1g de Glucosa Anhidra en 100 ml de verseno. La solución final se esteriliza mediante filtro de membrana milipore 0.22 u. Para facilidad de manejo, la solución estéril se distribuye en tubos pequeños y se almacena a temperatura bajo cero para evitar su - autodigestión.

APENDICE 6

PREPARACION DE LA SOLUCION DE TRIPSINA

La solución de tripsina 0.025% se prepara colocando 0.025g de Tripsina (Sigma Chemical U.S.A) en 100 ml de verseno si se requiere al 0.25%, se disuelven 0.25g de la Tripsina en 100ml de verseno. La solución final se esteriliza mediante filtro de membrana milipore de 0.22 u de poro y se distribuye en tubos pequeños para su mejor manejo y se almacena a temperatura bajo cero para evitar su autodigestión.

APENDICE 7

PREPARACION DE LA SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA (SSA)

Solución A

En 500 ml de agua destilada se disuelven las siguientes sustancias:

Compuestos	Concentración (g)
Cloruro de Sodio.....	8.00
Cloruro de Potasio.....	0.40
Sulfato de Magnesio $7H_2O$	0.20
Fosfato de Sodio.....	0.045
Fosfato de Potasio.....	0.060

Solución B

Se disuelven en 500 ml de agua destilada:

Cloruro de Calcio $2H_2O$	0.147
---------------------------------	-------

Solución C

Glucosa.....	1.00
--------------	------

Se disuelven en 10 ml de agua destilada, y se mezcla en partes iguales de solución A más B.

Solución D

Rojo-Fenol.....	0.002
-----------------	-------

Se disuelve en 10 ml de agua destilada y se añade a la mezcla previa:

$$A+B+C+D=Q$$

Solución E

Tris Base.....	19.10
----------------	-------

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 después de mezclar partes iguales de la solución E con la solución Q. La esterilización se hace utilizando un filtro milipore de 0.22 u.

APENDICE 8

PREPARACION DE FICOLL-PAQUE

La preparación de Ficoll para llevar a cabo la separación de leucocitos mononucleares, se hace de la siguiente forma:

Se prepara una solución de Ficoll (Ficoll 400, Farmacia Fine Chemicals, Suiza) al 9% en agua destilada. De esta solución se toman 24 ml y son mezclados con 10 ml de una solución Hypaque (Winthrop Products U.S.A) al 34% en agua destilada. Estas dos soluciones se mezclan perfectamente, que

dando con una densidad final de 1.07 g/ml. La esterilización de esta solución se lleva a cabo por medio de autoclave a 10 lb de presión durante 15 min.

APENDICE 9

PREPARACION DEL COLORANTE MAY-GREENWALD

En un recipiente, se disuelven 100 ug de Eosinato Azul de Metileno -- (Harleco Co. Méx.) en 50 ml de alcohol metílico puro. Se deja reposar una semana antes de usarse. de preferencia se guarda en un frasco ambar para evitar su descomposición por luz directa.

APENDICE 10

PREPARACION DEL COLORANTE GIEMSA

Para tinciones normales, generalmente se emplea una dilución del colorante Giemsa (Sigma de Méx. S.A) en proporción 1:10 con agua destilada. En seguida se distribuye en el recipiente adecuado y se efectúa la tinción.

APENDICE 11

ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR POR RANGOS O PRUEBA H DE KRUSKAL-WALLIS

La prueba de Kruskal-Wallis o análisis de varianza por rangos considera la magnitud de cada observación con relación a las otras observaciones y nos sirve para probar la hipótesis de igualdad de parámetros de posición -- (de tres o más medianas). Los pasos a seguir son:

a.- Las observaciones n_1, n_2, \dots, n_k de las k muestras se combinan en -- una sola muestra de tamaño $n = n_1 + n_2 + \dots + n_k$ y se arreglan en orden de magnitud (considerando su identidad dentro de cada muestra) desde la más pequeña hasta la más grande. Las observaciones son entonces, reemplazadas por sus rangos del 1 hasta el n . Si dos o más observaciones tienen el mismo valor (están empatadas) se les asigna la media aritmética de los rangos correspondientes a las observaciones empatadas.

b.- Se suman los rangos correspondientes a las observaciones de cada muestra por separado, dando origen a k sumas.

c.- Se calcula el estadígrafo H por la fórmula:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

donde: k = es el número de muestras o tratamientos.

n_i = es el número de observaciones en la muestra i .

n = es el número total de observaciones.

R_i = es la suma de los rangos de la muestra i .

d.- Cuando hay tres muestras con cinco o más observaciones cada una, la significación de H está distribuida aproximadamente como χ^2 con $k-1$ grados de libertad.

Para determinar una significancia es necesario plantear una hipótesis nula (H_0) en la que nos indica que los grupos de observaciones no difieren en lo que se desea determinar.

La hipótesis nula será cierta si los rangos están bien distribuidos - entre los grupos analizados y en consecuencia, la suma de los rangos de los grupos deben ser proporcionales a sus tamaños de muestra; si esto no ocurre el estadígrafo H será muy grande y por lo tanto se rechazará la hipótesis - nula cuando el valor de H sea mayor que el valor crítico.

APENDICE 12

PRUEBA DEL RANGO PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES O PRUEBA U DE MANN-WHITNEY

La prueba U de Mann-Whitney sirve para probar hipótesis acerca de dos medias de dos muestras independientes cuando los datos no alcanzan a ser de tipo cuantitativo sino cualitativo (ordinales o nominales).

En esta prueba, primero se arreglan los valores de las muestras en orden creciente desde 1 a $n_1 + n_2$ (donde n_1 es el tamaño de la muestra 1 y n_2 es el tamaño de la muestra 2), conservando cada valor dentro de su propia - muestra. La suma de los rangos de la muestra 1 es llamada R_1 y la suma de - los rangos de la muestra 2, R_2 .

Luego, es aplicada una de las siguientes fórmulas:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Una vez calculado cualquiera de las dos U_1 ó U_2 , se obtiene otro va-
lor.

$$U' = n_2 n_2 - U$$

donde U es U_1 ó U_2 calculado anteriormente.

Luego, es comparado el menor de los valores calculados U ó U' con el menor de los valores críticos para los tamaños de muestras n_1 y n_2 correspondientes y el nivel de significancia (α). Si el valor calculado es menor que el valor crítico se rechaza $H_0: \mu_1 = \mu_2$.

APENDICE 13

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR CON BLOQUES ALEATORIOS COMPLETOS POR RANGOS DE FRIEDMAN.

Cuando se requiere de una prueba análoga al análisis de varianza de un factor con bloques, dado que no se cumplen los supuestos o porque se necesitan resultados con urgencia. Una prueba no paramétrica para estos casos es el análisis de varianza por rangos de Friedman.

Para llevar a cabo la prueba, primero se les asigna un rango a cada uno de los datos de acuerdo a un orden creciente. Luego, los rangos son sumados en cada columna (tratamiento). Estas sumas son R_1, R_2, \dots, R_n dependiendo del número de tratamientos que se tengan. Considerando el número de bloques (filas o grupos de muestras que se estén analizando), el estadígrafo de Friedman X_r^2 se calcula por:

$$X_r^2 = \frac{12}{rk(k+1)} \sum_{i=1}^k (R_i)^2 - 3r(k+1)$$

donde: r = es el número de filas (bloques)

k = es el número de columnas (tratamientos).

Los valores críticos para X_r^2 para varios valores de r y k se obtienen de tablas.

Cuando los datos son medidas en vez de rangos, se le asignan rangos basados en magnitud dentro de los bloques. Si hay empates se toma la media como rango.

Cuando los valores de r y k exceden los dados en la tabla A-16 se pueden usar valores críticos de X^2 con $k-1$ grados de libertad.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lerner, R.A., y Dixon, F.J. (1973). El linfocito humano como animal de experimentación. *Sci. Ame.* 136-145.
- 2.- Hayflich, L., y Morhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cells strains. *Exp. Cell. Res.* 25: 585-621.
- 3.- Carrel, A. (1931). The new cytology. The Rockefeller Institute for -- Med. Res. 73: 297-303.
- 4.- Parker, R.C. (1961). *Methods of tissue culture*. Ed: Paul B. Hoeber. New York, U.S.A. PP: 358.
- 5.- Paul, J. (1973). *Cell and tissue culture*. Ed: Churchill Livingstone, - G.B. PP: 430.
- 6.- Fisher, G., y Wieser, R.J. (1983). *Hormonally defined media*. Ed: Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Germany. PP: 455.
- 7.- Sigma, Cell Culture Reagents. (1986). *Powdered media for serum-free cultures*. The source. Sigma Chemical Company. 2(4).
- 8.- Morgan, J.F., Morton, H.J., y Parker, R.C. (1950). Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. -- *Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med.* Toronto, Canadá. 73: 1-8.
- 9.- Lehninger, A.L. (1981). *Bioquímica*. Ed: Omega. Barcelona, España. PP: 752.
- 10.- Adams, R.L.P. (1980). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Ed: Esvier/North Holland Biomedical Press. New York, U.S.A. PP: 430.
- 11.- Sato, G.H. (1982). *Cell culture and physiology* Acad. Press. New York, U.S.A. PP: 45-52.
- 12.- Vasiliev, J.M., y Gelfand, I.M. (1981). *Neoplastic and normal cells in culture*. Cambridge Univ. Press. Great Britain. PP: 372.
- 13.- De Vita, V.T Jr., Hellman, S., y Rosenberg, S.A., (1982). *Cancer: -- Principles and practice of oncology*. J.B. Lippincott Co. U.S.A. PP: - 1926.
- 14.- Waymouth, C.H. (1981). *The growth requirements of vertebrate cells in vitro*. Cambridge Univ. Press. PP: 542.
- 15.- Kimball, J.W. (1982). *Biología celular*. Ed: Fondo Educativo Interamericano S.A. México, D.F. PP: 414.
- 16.- Marinello, Z. (1983). *Nociones y reflexiones sobre el cáncer*. Ed: -- Científico Técnica. La Habana, Cuba. PP: 189.

- 17.- Ashworth, J.M. (1976). *Diferenciación celular*. Ed: Omega. Barcelona, España. PP: 58.
- 18.- Soc. Méx. de Ciencias Fisiológicas. (1986). *Biología celular*. Ed: Alhambra. México, D.F. PP: 166.
- 19.- De Robertis, E.D., Saez, F.A., y Robertis, E.M.F. (1978). *Biología celular*. Ed: El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. PP: 528.
- 20.- Avers, CH.J. (1983). *Biología celular*. Ed: Grupo Editorial Iberoamérica, México, D.F. PP: 532.
- 21.- Albertis, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robertis, K., y Watson, J.D. (1983). *Biología molecular de la célula*. Ed: Omega. Barcelona, - España. PP: 1232.
- 22.- Wheeler, P.R., Burkitt, H.G., y Daniels, V.G. (1980). *Histología funcional*. Ed: JIMS. Barcelona, España. PP: 278.
- 23.- Potter, V.R. (1982). In: *Concepts in Cancer Medicine*. Grune and Stratton. Inc. J. New York, U.S.A. PP: 119-125.
- 24.- Roitt, I., Brostoff, J., y Male, D. (1986). *Immunology*. The C.V. Mosby Company. St Louis Toronto, Canadá. PP: 25.10.
- 25.- Hood, L.E., Weissman, I.L., Wood, W.B., y Wilson, J.H. (1984). *Immunology*. The Benjamin Cummings Publishing Co. Inc. California, U.S.A. - PP: 558.
- 26.- Oppenheim, J.J., Rosentrich, L.D., y Potter, M. (1981). *Cellular functions in immunity and inflammation*. Ed: Edward Arnold. U.S.A. PP: 479.
- 27.- Lesson, S.T., y Lesson, R.C. (1985). *Histology*. Ed: Nueva Editorial - Interamericana S.A. PP: 525.
- 28.- Ham, A.W., y Cormack, H.D. (1985). *Tratado de histología*. Ed: Interamericana. México, D.F. PP: 1079.
- 29.- Hamman, U., y Kramer, P.H. (1984). Activation of macrophage tumor cytotoxicity by the synergism of two T-cell derived lymphokines: Immune interferon (IFN-gamma) and macrophage cytotoxicity-inducing factor-2 (MCI2). *Eur. J. Immunology*. 15: 18-24.
- 30.- Mokoena, T., y Gordon, S. (1985). Human macrophage activation. *J.Clin Invest*. 75: 624-631.
- 31.- Golightly, M.G., Fisher, D.G., Ohlander, CH., y Koren, H.S. (1983). - Characteristics and requirements of the interaction between human monocytes and tumor cells on the single cell level. *Blood*. 61: 390-396.
- 32.- Tinonen, T., John, R.O., y Heberman, B.R. (1982). Analysis of natural killer activity of human large granular lymphocytes at a single cell level: NK cells and other natural effector cells. *Acad. Press. New York, U.S.A.* PP: 9-15.

- 33.- Zisman, B.R., y Bloom, B.R. (1985). Interferons and natural killer — cells. *British Med. Bulletin.* 41: 22-27.
- 34.- Aune, T.M. (1985). Two different pathways of interferon mediated suppression of antibody secretion. *Int. J. Immunopharmac.* 7: 65-71.
- 35.- Fleischmann, J.R., Klimpel, G.R., Tyring, S.K., Voss, W.R., y Baron, S. (1984). Interferon and cancer: Current use and novel approaches. — Acad. Press Inc. Galveston Texas. The Univ. Texas Medical Branch at — Galveston. PP: 1-22.
- 36.- Stites, P.D., Stobo, J.D., Fundenberg, H.H., y Wells, V.J. (1985). In *munología básica y clínica*. Ed: El Manual Moderno. S.A. PP: 842.
- 37.- Benacerraf, B., y Unanue, E.R. (1986) *Inmunología*. Ed: Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. PP: 240.
- 38.- Muraguchi, A., Kehrl, J.H., y Fauci, A.S. (1985). Activation, proliferation and differentiation of human B lymphocytes. *Lymphokines.* 10: — 33-56.
- 39.- Gallatin, W.M., Weissman, I.L., y Butcher, E.C. (1983). A cell surface molecule involved in organ —specific homing of lymphocytes. *Nature* 304: 30-34.
- 40.- Gallatin, W.M., John, T.P., Siegelman, M., Reichert, R., Butcher, — E.C., y Weissman, I.L. (1986). Lymphocyte homing receptors. *Cell.* 44: 673-680.
- 41.- Bessis, M. (1977). Blood smears reinterpreted. Springer International Berlin, Germany. PP: 270.
- 42.- Mingari, M.C.; Moretta, A., Maggi, E., Pantaleo, G., Gerosa, F., Romagnani, S., y Moretta, L. (1984). Frequent coexpression of cytolytic activity and lymphokine production among human T lymphocytes. Production of B cell growth factor and interleukin-2 by T8+ and T4+ cytolytic clones. *Eur. J. Immunol.* 14: 1066-1069.
- 43.- Murakawa, Y., Takada, S., Ueda, Y., Suzuki, N., Hoshino, T., y Sakane T. (1984). Characterization of T lymphocyte subpopulations responsible for deficient interleukin-2 activity in patients with systemic lupus erythematosus. *The J. of Immunol.* 134: 187-194.
- 44.- A commentary. (1984). T-cell Ia revisited. *J. Mol. Cell Immunol.* 1: — 155-156.
- 45.- De Paoli, P., Reitano, M., Battistin, S., Castiglia, C., y Santini, — G. (1984). Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: A comparative study using whole blood or nonnuclear cells separated by density gradient centrifugation. *J. of — Immunol. Methods.* 72: 349-353.
- 46.- Robins, R.A., y Baldwin, R.W. (1985). T-cell subsets in tumor rejection responses. *Immunol. Today.* 6: 55-58.

- 47.- Boss, M.A., y Wood, C.R. (1985). Genetically engineered antibodies. - Immunol. Today. 6: 12-13.
- 48.- Springer, T.A., Dustin, M.L., Kashimoto, T.K., y Marlin, S.D. (1987). The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: - cell adhesion receptors of the immune system. Annu. Rev. Immunol. In press.
- 49.- Sanchez-Madrid, F., Krensky, C.F.W., Robbins, J., Strominger, J.L., Bu rakoff, S.J., y Springer, T.A. (1982). Three distinct antigens associ ated with human T lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1 and LFA-3. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 7489.
- 50.- Meuer, S.C., Hussey, R.E., Fabbi, M., Fox, D., Acuto, O., Fitzgerald, K.A., Hodgdon, J.C., Protentis, J.P., Schlossman, S.F., y Reinherz, F G. (1984). An alternative pathway of T-cell activation: A functional role for the 50 Kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. Cell. 36: - 897.
- 51.- Shaw, S., Luce, G.E.G. Quiones, R., Gress, R.E., Springer, T.A., y -- Sanders, M.E. (1986). Two antigen independent adhesion pathways used by human cytotoxic T cell clones. Nature (Lond.). 322: 262.
- 52.- Pircher, H., Groscurth, P., Bamhutter, S., Anguet, M., Zinkernagel, T. A., y Hengartner, H. (1986). A monoclonal antibody against altered LF A-1 induces proliferation and lymphokine release of cloned T cells. - Eur. J. Immunol. 16: 172-181.
- 53.- Gros-pierre, B.L., Bohler, M.CH., Fisher, A., Mawwas, C., Springer, T. A., y Giscelli, C. (1986). Defective membrane expression of the LFA-1 complex may be secondary to the absence of the B chain in a child --- with recurrent bacterial infection. Eur. J. Immunology. 16: 205-208.
- 54.- Regnier-Vigoroux, A., Blanc, D., Pont, S., Marchetto, S., y Pierres, M. (1986). Accessory molecules and T cell activation: I. Antigen recep tor avidity differentially influences T cell sensitivity to inhibi--- tion by monoclonal antibodies to LFA-1 and L3T4. Eur. J. Immunol. 16: 1385-1390.
- 55.- Van Wauwe, J., Goosens, J., Decock, W., Kung, P., y Goldstein, G. --- (1981). Suppression of human T-cell mitogenesis and E-rosette forma--- tion by the monoclonal antibody OKT11A. Immunology. 44: 865.
- 56.- Selvaraj, P., Plunkett, M.L., Dustin, M., Sanders, M.E., Shaw, S., y Springer, T.A. (1987). The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the -- cell surface ligand LFA-3. Nature. 326: 400-402.
- 57.- Plunkett, M.L., Sanders, M.e., Selvaraj, P., Dustin, M.L., Shaw, S., y Springer, T.A. (1987). Rosetting of activated T lymphocytes with au tologous erythrocytes: Definition of the receptor and ligand molecules as CD2 and lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3). Nature - (Lond.). 165: 664-676.
- 58.- Krensky, A.M., Robbins, E., Springer, T.A., y Burakoff, S.J., (1984).

- LFA-1, LFA-2 y LFA-3 antigens are involved in CTL-target conjugation. *J. Immunol.* 132: 2180.
- 59.- Vollger, L.W., Tuck, D.T., Springer, T.A., Haynes, B.F., y Singer, K. H. (1987). Thymocyte binding to human thymic epithelial cells is inhibited by monoclonal antibodies to CD2 and LFA-3 antigens. *The J. of Immunol.* 138: 358-363.
- 60.- Dustin, M.L., Sanders, M.E., Shaw, S., y Springer, T.A. (1987). Purified lymphocyte function associated antigen-3 binds to CD-2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J. of Exp. Med.* 165: 677-692.
- 61.- Woods, G.M., y Lowenthal, R.M. (1984). Cellular interactions and IL-2 requirements of PHA-induced human T-lymphocyte colonies. *Exp. Hematol* 12: 301-308.
- 62.- Miller, R.A., Rozans, M.K., Ythier, A.A., y Strom, T.B. (1986). Stages of T cell activation: Continued antigen dependence of IL-2 producing cells after IL-2 receptor expression. *The J. Immunol.* 136: 977-983.
- 63.- Cantrell, A.D., y Smith, K.A. (1984). The interleukin-2 T cell system: A new growth model. *Science.* 224: 1312-1316.
- 64.- Milanese, G., Richardson, N.E., y Reinherz, E.L. (1986). Identification of a T-helper cell-derived lymphokine that activates resting T-lymphocytes. *Science.* 231: 1118-1122.
- 65.- Chou, Y.K., Sherwood, T., y Virella, G. (1985). Erythrocyte bound immune complexes trigger the release of interleukin-1 from human monocytes. *Cell. Immunol.* 91:308-314.
- 66.- Chu, E., Rosenswasser, L.J., Dinarello, C.H. A., Lareau, M., y Geha, R S. (1984). Role of the interleukine-1 in antigen-specific T-cell proliferation. *The J.of Immunol.* 132: 1311-1316.
- 67.- Van Furth, R., Van Der Mer, J.W.M., Van Oud, A., y Slviter, W. (1982) development of mononuclear phagocytes self-defense mechanisms. In: *Role of macrophages. A Naito Foundation Symposium.* University of Tokyo Press. PP: 373.
- 68.- Severini, A., Prasad, K.V.S., Greer, W.L., y Kaplan, J.G. (1986). Sodium ion influx: An essential early signal in lymphocyte proliferation. *Leukocytes and Host Defense.* PP: 123-130.
- 69.- Oppenheim, J.J., Lungert, T., Sztein, B.M., y Steeg, S.P. (1981). Circuit of cytokine-cell interactions that regulate immunological and inflammatory reactions. In: *Self-Defense Mechanisms. Role of the macrophages. A Naito Foundation Symposium.* University of Tokyo Press. PP: 127-136.
- 70.- Oppenheim, J.J. (1985). Antigen non specific lymphokines: An overview. *Methods in Enzymology.* 116: 357-372.

- 71.- D' Silva, H.B., y Yoshida, T. (1982). Effect of lymphokines on tumor cells. *Cancer Immunol.* 6: 216-250.
- 72.- Paul, W.E. (1986). *Fundamental Immunology*. Raven Press. New York, U.S.A. PP: 809.
- 73.- Gery, I., Schmidt, J.A. (1985). Human interleukin-1. *Methods in Enzymology.* 116: 456-467.
- 74.- Smith, K.A., Lachman, L.B., Oppenheim, J.J., y Favata, M.F. (1980). - The functional relationship of the interleukins. *J.Exp. Med.* 151: -- 1551-1556.
- 75.- Paul, W.E. (1984). Nomenclature of lymphokines which regulate B-lymphocytes. *Molec. Immunol.* 21: 343.
- 76.- Bendtzen, K. 1983. Biological properties of interleukins. *Allergy.* -- 38: 219-226.
- 77.- Nowell, P.C., Koretzky, G.A., reed, J.C., y Hannam-Harris, A.C. ---- (1985). Interleukins and inhibitors in human lymphocyte regulation. - Mediators in cell growth and dif. PP: 199-212.
- 78.- Spitz, M., Gearing, A., Callus, M., Spitz, L., y Thorpe, R. (1985). - Interleukin-2 in vivo production of and response to interleukin-2 in lymphoid organs undergoing a primary immune response to heterologous erythrocytes. *Immunology.* 54: 527-532.
- 79.- Romagnani, S., Giudizi, M.G., Maggi, E., Almerigogna, F., Biagiotti, R., Del Prete, G., Mazzeti, M., Alessi, A., Vercelli, D., y Ricci, M. (1985). Synergy of B cell growth factor and interleukin-2 in the proliferation of activated human B-cells. *Eur. J. of Immunol.* 15: 1158--1164.
- 80.- Rosenberg, S.A., Grimm, E.A., McGrogan, M., Doyle, M., Kawasaki, E., Kohts, K., y Mark, D.F. (1984). Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *E. coli*. *Science.* 223: 1412-1415.
- 81.- Ju, G., Collins, L., Kafka, K.L., Tsuen, W.H., Chizzonite, R., Crowl, R., Bhatt, R., y Kilian, P.L. (1987). Structure-function analysis of human interleukin-2. *The J. of Biol. Chem.* 262: 5723-5731.
- 82.- Robb, R.J. (1985). Interleukin-2 and it's cell-surface receptor. *Behring Inst. Mitt.* 77: 56-67.
- 83.- Jourdan, M., Combes, T., y Klein, B. (1985). Control of human T-colony formation by interleukin-2. *Immunology.* 54: 249-253.
- 84.- Le Francois, L., Klein, J.R., Pastkau, U., y Bevan, M.J. (1984). Antigen independent activation of memory cytotoxic T-cells by interleukin-2. *The J. Immunol.* 132: 1845-1851.
- 85.- Cereding, R., Lowenthal, J.W., Nabholz, M., y Mac Donald, H.R. (1985) Expression of Interleukin-2 receptors as a differentiation marker in

- trastimic stem cells. *Nature*. 314: 98-100.
- 86.- Raulet, D.H. (1985). Expression and function of interleukin-2 receptors on immature timocytes. *Nature*. 314: 101-103.
- 87.- Kabelits, D., Kirchner, H., Armerding, D., y Wagner, H. (1985). Recombinant interleukin-2 rapidly augments human natural killer cell activity. *Cell. Immunol.* 93: 38-43.
- 88.- Brodley, E.C., Konrad, M., De Groat, S., Doyle, M., Cetus Corporation, Emerville, C.A., y Lowrtz, R. (1986). *In vivo* normalization of NK activity in patients with cancer treated with interleukin-2. *Proc. of AACR*. 27: 351.
- 89.- Pestka, S., Langer, J.A., Fisher, P.B., Weinstein, I.B., Ortaldo, J., y Heberman, R.B. (1985). The human interferons: from the past in to the - future. *Mediators in Cell Growth and Dif.* PP: 262-281.
- 90.- Vose, B.M., Riccardi, C.B., y Heberman, R.B. (1983). Limiting dilution analysis of the frequency of human T-cells and large granulocytes proliferating in response to interleukin-2. *J. of Immunol.* 130: 768.
- 91.- Olabuenaga, S.E., Brooks, C.G., Gillis, S., y Henney, C.S. (1983). Interleukin-2 is not sufficient for the continuous growth of cloned NK-like cytotoxic cell lines. *J. Immunol.* 131: 2386.
- 92.- Beladi, I., Dinh, P.N., Rosztochy, I., y Toth, M. (1984). Relationship between interferons and other lymphokines. *Centr. Oncol.* 20: 63-71.
- 93.- Berthold, W., Merk., y Adolf, G.R. (1985). Immunoasay for the quantitation of human leukocyte interferon. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 35: 364-369
- 94.- Fleischmann, W.R., Fleischmann, CH. M., y Fiers, W. (1984). Potential of interferon action by mixtures of recombinant DNA-derived human interferons. *Antiviral Res.* 4: 357-360.
- 95.- Itoh, K., Tilden, A.B., y Balch, CH.M. (1985). Role of interleukin-2 -- and a serum suppressive factor on the induction of activated killer --- cells cytotoxic for autologous human melanoma cells. *Cancer Res.* 45: -- 3173-3178.
- 96.- Reem, G.H., y Yeh, N.H. (1984). Interleukin-2 regulates expression of - it's receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes. *Science.* 225: 429-430.
- 97.- Holter, W., Goldman, C.K., Casabo, L., Nelson, D.L., Greene, W.C., y -- Wildman, T.A. (1987). Expression of functional IL-2 receptors by lipopolysaccharide and interferon gamma stimulated human monocytes. *The J. of Immunol.* 138: 2917-2922.
- 98.- Robb, R.J. (1986). The suppressive effect of gangliosides upon IL-2 dependent proliferation as a function of inhibition of IL-2 receptor association. *The J. of Immunol.* 136: 971-976.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 99.- Nelson, D.L., Kurman, C.C., Fritz, M.E., Boutin, B., y Rubin, L.A. (1986). The production of soluble and cellular interleukin-2 receptors by cord blood mononuclear cells following in vitro activation. Pediatric Res. 20: 136-139.
- 100.- Diamantstein, T., Osawa, H., Graf, L., y Schirmmacher, V. (1985). Studies on interleukin-2 receptor expression and IL-2 production by murine T cell lymphomas. Br. J. Cancer. 51: 23-30.
- 101.- Jacques, Y., Mauff, B.L., Godard, A., Olive, D., Moreau, J.F., y Souliou, J.P. (1986). Regulation of interleukin-2 receptor expression on a human cytotoxic T lymphocyte clone, synergism between alloantigenic stimulation and interleukin-2. The J. of Immunol. 136: 1693-1699.
- 102.- Horst, H.J., y Flad, H.D. (1985). Binding to interleukin-2 to target cells: Determination of high and low affinity binding sites on T-lymphoblasts by differential dissociation. Clin. Exp. Immunol. 62: 579-585.
- 103.- Sancho, L., Martine, C., Nogales, A., y De la Hera, A. (1986). Reconstitution of natural killer cell activity in the new born by interleukin-2. The New J. of Med. 314: 57.
- 104.- Rabinowich, H., Goses, Y., Reshef, T., y Klajman, A. (1985). Interleukin-2 production and activity in aged humans. Mech. of Ageing and Development. 32: 213-216.
- 105.- Cheever, M.A., Greeberg, P.D., Irle, C., Thompson, J.A., Urdal, D.L., Mochizuki, D.Y., Henney, C.H.S., y Gillis, S. (1984). Interleukin-2 administered in vivo induces the growth of cultured T-cells in vivo. The J. of Immunol. 132: 2259-2265.
- 106.- Itoh, K., Tilden, A.B., y Balch, C.H.M. (1986). Interleukin-2 activation of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating in to human metastatic melanomas. Cancer Res. 46: 3011-3017.
- 107.- Itoh, K., Tilden, A.B., y Balch, C.H.M. (1986). Lysis of human solid tumor cells by lymphokine-activated natural killer cells. The J. of Immunol. 136: 3910-3915.
- 108.- Shu, S., Chou, T., y Rosenberg, S.A. (1986). In vitro sensitization and expansion with viable tumor cells and interleukin-2 in the generation of specific therapeutic effector cells. The J. of Immunol. 136: 3891-3898.
- 109.- Gately, M.K., Wilson, D.E., y Wong, H.L. (1986). Synergy depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses in vitro. The J. of Immunol. 136: 3910-3915.
- 110.- Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., y Rosenberg, S.A. (1982). Lymphokine activated killer cell phenomenon. J. of Exp. Med. 155: 1823-1841.
- 111.- Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., y Rosenberg, S.A. (1983). Lym-

phokine activated killer cell phenomenon II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus derived lymphocytes, and natural killer cells. *J. Exp. Med.* -- 157: 884.

- 112.- Tilden, A.B., Itoh, M., y Balch, CH.M. (1987). Human lymphokine activated killer (LAK) cells: Identification of two types of effector cells. *The J. of Immunol.* 138: 1068-1073.
- 113.- Ferrini, S., Miescher, S., Zocch, M.R., Von Fliedner, V., y Moretta, A (1987). Phenotypic and functional characterization of recombinant interleukin-2 (rIL*2). Induced activated killer cells: Analysis at the population and cloned levels. *The J. of Immunol.* 138: 1297-1302.
- 114.- Ettinghausen, E.S., y Rosenberg, S.A. (1986). Immunotherapy of murine sarcomas using lymphokine activated killer cells optimization of the schedule and route of administration of recombinant interleukin-2. *Cancer Res.* 46: 2784-2792.
- 115.- Mule, J.J., Ettinghausen, S.E., Spiess, P.J., Shu, S., y Rosenberg, S. A. (1986). Antitumor efficacy of lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2 *in vivo*: Survival benefit and mechanisms of tumor escape in mice undergoing immunotherapy. *Cancer Res.* 46: 676-683
- 116.- Mule, J.J., Shu, S., Schwartz, S.L., y Rosenberg, S.A. (1984). Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science.* 225: 1487-1489.
- 117.- Shu, S., y Rosenberg, S.A. (1985). Adoptive immunotherapy of newly induced murine sarcomas. *Cancer Res.* 45: 1657-1662.
- 118.- Mule, J.J., Yang, J., Shu, S., y Rosenberg, S.A. (1986). The antitumor efficacy of lymphokine activated killer cells recombinant interleukin-2 *in vivo* : Direct correlation between reduction of established metastases and cytolytic activity of lymphokine activated killer cells. *The J. of Immunol.* 136: 3899-3902.
- 119.- Lotze, M.T., Custer, M.C., Sharrow, S.O., Rubin, L.A., Nelson, D.L., y Rosenberg, S.A. (1987). *In vivo* administration of purified human interleukin-2 to patients with cancer development of interleukin-2 receptor positive cells and circulating soluble interleukin-2 receptors following interleukin-2 administration. *Cancer Res.* 47: 2188-2195.
- 120.- Lotze, M.T., Watory, Y.L., Ettinghausen, E.S., Rayner, A.A., Sharrow, S.O., Seipp, C.A.Y., Custer, M.C., y Rosenberg, S.A. (1985). *In vivo* administration of purified human interleukin-2. *The J. of Immunol.* -- 135: 2865-2875.
- 121.- Rayner, A.A., Grimm, E.A., Lotze, M.T., Chu, E.W., y Rosenberg, S.A. (1985). Lymphokine-activated killer cells. *Cancer.* 55: 1327-1333.
- 122.- Letters. (1987). Interleukin-2 therapy for disseminated cancer. *JAMA.* 257: 1729-1731.

- 123.- Durant, J.R. (1987). Immunotherapy of cancer. *The New Engl. J. of Med.* 316: 939-940.
- 124.- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T., Seipp, C.A., Simpson, C.G., y White, D.E. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *J. of Medicine.* 316: 889-897.
- 125.- Marques de Cantu, M.J. (1987). Probabilidad y estadísticas para ciencias químico-biológicas, E.N.E.P. Zaragoza, C II, U.N.A.M. México, D.F. PP: 649.
- 126.- Xicotencatl, M.L.G., Esquivel, G.F.R., y Villarreal, R.B. (1984). Estudio morfológico, bioquímico, inmunológico de células provenientes de sarcomas humanos cultivados *in vitro*. Tesis Profesional. E.N.E.P. Zaragoza, C II, U.N.A.M. México, D.F. PP:126.
- 127.- Rangel, C.R. (1986). Determinación del tipo de interacción existente entre células provenientes de tumores humanos malignos con leucocitos de sangre periférica y la función del linfocito T y monocito en este mecanismo de reconocimiento. Tesis Profesional. E.N.E.P. Zaragoza, C II, U.N.A.M. México, D.F.
- 128.- Stanley, P.L.L., Philip, D.N., Robert, E.C., Tsuyoshi, T., y Jack, A.R. (1987). Heterogenous expression of a murine B16 melanoma-associated antigen correlates with cell cycle. *Cancer Immunol Immunother.* -- 24: 106-112.