

51261
3
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES *ZARAGOZA*

LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

" CITOTOXICIDAD DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA SOBRE
CELULAS PROVENIENTES DE TUMORES DE CANCER CERVICO UTERINO EN
PRESENCIA DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE HUMANA "

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN I.B.S.H.

PRESENTA EL BIOLOGO

ALBERTO MONROY GARCIA

FALLA DE ORIGEN

MEXICO 1991



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER, EN LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "ZARAGOZA", U.N.A.M., BAJO LA DIRECCION DE LA M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA.

DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS, SE CONTO CON EL APOYO ECONOMICO APORTADO POR LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO DE LA U.N.A.M (D.G.P.A) MEDIANTE BECA DE MAESTRIA.

INDICE

	PAGINAS
RESUMEN	1-2
INTRODUCCION	3
MARCO TEORICO	4
CULTIVO DE TEJIDOS.....	4-6
PARAMETROS CELULARES.....	7-8
UNIONES INTERCELULARES.....	8-10
DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER.....	11-12
CANCER CERVICO-UTERINO.....	12-14
INMUNOLOGIA TUMORAL.....	14
Sistema Inmune.....	14-17
Estructuras de membrana involucradas en el reconocimiento tumoral.....	17-20
Immunoterapia Tumoral.....	20-22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	25
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
MATERIAL Y METODO	27
MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
SIEMBRA DE CELULAS TUMORALES.....	27-29
CONDICIONES DE CULTIVO.....	29
SUBCULTIVOS CELULARES.....	29
TECNICA DE CRIOPRESERVACION.....	30
DETERMINACION DE DESMOGLEINA.....	30
CINETICAS DE PROLIFERACION CELULAR.....	30
OBTENCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA.....	31-32
CO-CULTIVOS CELULARES.....	32
CITOTOXICIDAD DE LINFOCITOS.....	32-33
ESPECIFICIDAD DE LINFOCITOS.....	33
ANALISIS ESTADISTICO	34
RESULTADOS	35-61
DISCUSION	62-68
CONCLUSIONES	69-70
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71-84
APENDICES	85-91
AGRADECIMIENTOS	92
PUBLICACIONES	93

RESUMEN

Actualmente, gracias a la Inmunología Tumoral se han hecho estudios encaminados al reconocimiento y lisis de células tumorales por parte de los linfocitos de sangre periférica. Asimismo, aprovechando el potencial mitogénico de algunas citocinas como lo es la Interleucina-2 (IL-2) y con ayuda de métodos de co-cultivo in vitro, se han logrado obtener poblaciones linfocitarias reactivas específicamente a células tumorales en una gran proporción, útiles para ser aplicadas como terapia (Inmunoterapia Adoptiva).

El presente trabajo se efectuó con la finalidad de establecer un método in vitro de sensibilización de linfocitos de sangre periférica (LSP) de donadores normales contra células provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino (CaCu). Para ello se establecieron co-cultivos de LSP de donadores sanos con células de cinco estirpes tumorales de CaCu (CALO, T3, CRHE, GEPE e INBL) y una estirpe normal de cérvix (ENO-1) durante dos sensibilizaciones de siete días cada una, tanto en presencia como en ausencia de interleucina-2 recombinante humana (IL-2rh).

Las estirpes celulares establecidas mostraron dos formas diferentes (típica epitelial y fibroblástica), no obstante fue corroborado su origen epitelial debido a que todas ellas fueron positivas a la expresión de la proteína desmogleina-1 (DG-1); proteína característica de las células epiteliales. Además se observó una relación inversa en la expresión de la proteína DG-1 con respecto al estadio clínico de los tumores estudiados.

Se determinaron los parámetros cinéticos de cada estirpe celular, observándose entre éstos gran variabilidad tanto en tiempo de latencia (3-20 hrs), tiempo de duplicación celular (19-120 hrs) y densidad de saturación (15 000-300 000 cel/cm²). Las estirpes de morfología epitelial proliferaron más rápidamente, asimismo su densidad de saturación fue mayor que el de las estirpes con morfología fibroblástica.

Al evaluar la citotoxicidad de los LSP mediante ensayos de exclusión con azul tripano, se obtuvo que los linfocitos presensibilizados con las células tumorales mostraron mayor citotoxicidad sobre las células tumorales que los LSP no sensibilizados, además la citotoxicidad de los linfocitos sensibilizados en presencia de IL-2rh fue aún significativamente mayor que éstas, y muy semejante a la producida por linfocitos activados sólo con IL-2rh. Los linfocitos sensibilizados con células de ENO-1 no mostraron un efecto citotóxico significativo sobre esta estirpe.

Finalmente, las poblaciones de linfocitos presensibilizadas con las estirpes celulares de CaCu de estadios clínicos menos avanzados en presencia de IL-2rh, mostraron mayor efectividad de lisis sobre una línea de carcinoma de laringe (HEP), que la de los linfocitos sensibilizados con estirpes de CaCu de mayor estadio clínico.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que los LSP por sí solos tienen actividad citotóxica sobre las células tumorales y que ésta se ve incrementada significativamente al estimularlas con células tumorales e IL-2rh, asimismo es posible que los tumores de CaCu de estadio clínico más avanzado sean más inmunogénicos, y que poblaciones linfocitarias de donadores sanos histocompatibles a las células tumorales que tengan la capacidad de reconocer antígenos sobre éstas, puedan funcionar como células efectoras con probable aplicación terapéutica.

INTRODUCCION

En la actualidad se han logrado importantes avances en la terapia del cáncer con técnicas bien establecidas como son la radioterapia, la quimioterapia, la termoterapia y la cirugía, no obstante estos métodos no han resultado ser siempre muy efectivos. Este hecho ha dado como resultado el surgimiento de nuevas áreas de investigación en la búsqueda de mejores tratamientos.

Una nueva área de investigación denominada Inmunología Tumoral se encarga de estudiar las complejas interacciones entre el huésped y el tumor, vislumbrando los posibles mecanismos inmunológicos para llevar a cabo una respuesta de rechazo. En los últimos años el entusiasmo en este campo de investigación ha crecido, ya que por medio de técnicas inmunológicas que involucran la generación de células efectoras contra tumores, se ha podido obtener un número suficientemente grande de linfocitos activados que reaccionan y destruyen células tumorales.

Los métodos para obtener este tipo de células reactivas hasta el momento son básicamente dos; uno de ellos comprende la proliferación de linfocitos ex vivo para su posterior administración a los pacientes (Inmunoterapia Adoptiva), y el segundo comprende el uso de agentes inmunoestimulantes como lo es la interleucina-2 (IL-2) que hace proliferar células inmunocompetentes in vitro con las cuales se han logrado obtener buenos resultados.

El presente trabajo fue realizado con la finalidad de estudiar la citotoxicidad in vitro de linfocitos de sangre periférica (LSP) de donadores normales, sobre la proliferación de estirpes celulares derivadas de tumores de cáncer cérvico-uterino, mediante previa sensibilización de los LSP con las células tumorales en presencia de interleucina-2 recombinante humana.

MARCO TEORICO

CULTIVO DE TEJIDOS

Una de las formas de llegar a entender los procesos de transformación neoplásica, es mediante el estudio del comportamiento de las células tumorales in vitro (1).

La técnica de cultivo de tejidos desde su inicio, a principios del siglo XIX, ha tenido a través del tiempo un sinnúmero de modificaciones e implementaciones, con el objetivo de establecer el crecimiento, desarrollo y proliferación celular.

A principios del siglo XIX Schwann describe a las células como entes embebidas en material nutritivo llamado citoblastoma (2).

Más tarde Claude Bernard en 1878 demostró la importancia del medio interno al estudiar las propiedades de las células y los factores que afectan su supervivencia (2, 3). El empleo de flúidos biológicos (plasma sanguíneo, suero, exudados y extractos de órganos y tejidos) por Wilhelm Roux en 1885, F Dvon Recklinghausen en 1886, Arnold en 1887 y Ljunggren en 1898, dieron la pauta para mantener células fuera del organismo durante un tiempo prolongado (4, 5).

Posteriormente, en 1911 Baker y Carrel observaron que tejido de embrión de pollo sobrevivía en solución de Lockes suplementada con algunos aminoácidos. En 1926 estudios más detallados permitieron dar a conocer que peptonas, y otros derivados de la degradación de proteínas al ser suplementados con suero y plasma, proveían nutrimentos esenciales para las células. Estos hechos fueron apoyados por Vogelaar y Erlichman en 1933 (5). Fisher en 1940, empleando plasma, suero y extracto de embrión dializado obtuvo mejores resultados (3). El primer dato que se tiene acerca de la fabricación de medios de composición conocida, fue el reportado por White en 1946 (6). Sin embargo, Morgan, Morton y Parker en 1950 describen estos medios enriquecidos con vitaminas, aminoácidos esenciales, ácidos nucléicos y factores de crecimiento adicionales para promover continuamente la proliferación celular (7).

De esta forma, a partir de 1958 se empiezan a fabricar medios de cultivo definidos, lo que permitió el establecimiento de cultivos a largo plazo proporcionando poblaciones celulares relativamente estables y homogéneas (8, 9).

El suero como suplemento en los medios de cultivo es un elemento indispensable para mantener el crecimiento de las células in vitro, sin embargo debido a su naturaleza compleja, ya que está constituido por una gran cantidad de factores de crecimiento, de transporte, de anclaje,

y hormonas, los medios en los cuales se usa suero como suplemento no pueden considerarse "completamente definidos" (6). Sato y sus colaboradores en 1982 determinaron la importancia de las hormonas en el cultivo de tejidos glandulares, lo que condujo a crear medios suplementados con hormonas y de esta manera eliminar eventualmente la "caja negra" que representaba el uso del suero (10). La principal ventaja de estos medios libres de suero, ha sido su selectividad para llevar a cabo el crecimiento de tipos de células específicos y prevenir el crecimiento de otros tipos celulares (11).

Por otra parte, se han considerado las características que presentan los diferentes tipos celulares y sus requerimientos para hacerlos proliferar in vitro; en este contexto varios métodos han sido implementados para hacer proliferar ciertos tipos de células epiteliales como los queratinocitos, epitelio de glándulas mamarias, epitelio bronquial, epitelio de próstata y epitelio cervical, entre otros. En dichos métodos, se han requerido condiciones especiales como son sustratos alimenticios (que consisten en capas de células inactivas), medios condicionados con factores de crecimiento específico (como el factor de crecimiento de células epiteliales) y suplementos especiales (12).

Los trabajos pioneros para establecer las condiciones necesarias para el crecimiento de células in vitro fueron hechos por Ham a partir de 1965 basándose en los estudios de Lewis y Warren (13), de tal manera que en la actualidad las condiciones apropiadas para el crecimiento de células in vitro en especial las células epiteliales deben cumplir con los siguientes requisitos: a) Medio Basal Nutritivo. El cual debe contener sales inorgánicas (incluyendo elementos traza), aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, azúcares, lípidos, purinas, pirimidinas, y poliaminas (14).

b) Suplementos del Medio.

Estos consisten en:

- Componentes del suero, extractos de tejido, metales traza y nutrimentos especiales. El suero (plasmático y fetal) ha sido ampliamente usado para promover el crecimiento celular in vitro (15-17).

- Factores de crecimiento para células epiteliales. En términos generales estos incluyen hormonas y factores de crecimiento polipeptídico (18). Entre los más empleados están, el Factor de Crecimiento Epidermal (FCE) que al ser combinado con el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (FCDP) aumenta grandemente la proliferación celular, y los Factores de Crecimiento Transformante alfa y beta (FCT) que juegan un papel importante en el control de la proliferación local de las células normales y neoplásicas (19-21).

La insulina también es requerida en el crecimiento de varios tipos celulares in vitro, se ha determinado que su principal acción es la de inducir cambios metabólicos

tales como incremento en el transporte de hexosa, síntesis de glucógeno, antilipólisis, transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas y transporte de Mg^{++} , Ca^{++} , Na^{+} , y K^{+} . Además en algunos cultivos induce la proliferación celular, por ejemplo cuando es adicionada junto con otros factores de crecimiento como dexametasona o hidrocortisona tiene un efecto sinérgico en la proliferación celular. Para llevar a cabo sus funciones, la insulina se une a receptores específicos de membrana que poseen actividad tirosina quinasa y capacidad de autofosforilación (22).

Otros factores de crecimiento con actividad semejante a insulina (FCI) han sido identificados, se han reconocido dos FCI-I y FCI-II y se les atribuye el 90% de la capacidad mitogénica del suero, estos actúan sinérgicamente con otros factores para promover el crecimiento celular (23).

La vitamina A es un derivado del ácido retinoico, y se le atribuye un papel importante en el control de la proliferación y diferenciación de células epiteliales (24-25).

- Componentes Solubles de Matriz. Varios componentes solubilizados de la matriz extracelular son indispensables para facilitar la adherencia, la extensión y crecimiento de células epiteliales sobre la superficie de la caja de cultivo. Por ejemplo la laminina y fibronectina pueden ser adicionadas al medio de cultivo para facilitar el crecimiento de células epiteliales. La laminina y fibronectina son mitogénicos y actúan sinérgicamente con otros factores de crecimiento (26).

c) Sustratos de soporte. Se han diseñado varios sustratos para soportar el crecimiento de células epiteliales in vitro entre estos destacan la colágena, fibronectina, laminina y condronectina así como componentes del suero como la vitronectina, factor de expansión del suero, epibolina y fetuina y otras proteínas adhesivas (26-27).

d) Variables Controladas. Dentro de estas podemos encontrar:

- La concentración de gases disueltos en el medio de cultivo (O_2 y CO_2), (28).

- Variables fisicoquímicas tal como la temperatura (37 °C), pH (6.8-7.2), osmolaridad (260-320 mOsm/kg), potencial redox, y un sistema amortiguador en el medio de cultivo (17).

- Humedad saturante en el medio de cultivo (28).

- El uso de antibióticos como penicilina y estreptomina (28).

- Finalmente las técnicas de manejo de células durante el cultivo y subcultivo (28).

PARAMETROS CELULARES

Mediante el uso de la técnica de cultivo de tejidos, se han logrado obtener células aisladas del organismo y llevar su cultivo durante tiempo prolongado a través de varias generaciones. No obstante, se ha observado que tanto en tejidos normales como en tumorales existen posibles cambios en el número cromosómico durante las diferentes resiembras o pasajes, independientemente del tiempo de doblaje y tejido de origen. Esto ha conducido a clasificar a las poblaciones celulares en base al comportamiento que presentan in vitro durante los diferentes subcultivos (29).

Se ha denominado **cepa o estirpe celular** a una población de células derivadas de un tejido animal subcultivado más de una vez in vitro y que carece de la propiedad de subcultivarse indefinidamente, además las células preservan el número cromosómico que caracteriza al tejido de origen. Se ha asignado el término **línea celular** a una población de células derivadas de un tejido animal creciendo in vitro por subcultivos seriados y por períodos de tiempo indefinido, conduciendo éste al cambio en el número cromosómico que caracteriza a la fuente original, el cual puede ocurrir en cualquier resiembra (29).

La variabilidad genómica constituye una importante consideración en los experimentos en los cuales se utilizan líneas celulares para el estudio de marcadores metabólicos y fenotípicos de las células. El uso de clones (poblaciones de células derivadas de una célula progenitora) como medida de reducción de la variabilidad en líneas de células heteroploides es desafortunadamente limitada debido a la rápida reemergencia de un intervalo de tipos cromosómicos entre la progenie del clon. Por lo que para estos estudios es conveniente el emplear células lo más cercanamente similares al tejido de origen, es decir células de las primeras resiembras (29).

La primer línea celular proveniente de un tumor maligno obtenida en 1951 fue denominada HeLa (30), esta línea se estableció a partir de un carcinoma cérvico-uterino; desde entonces se han obtenido numerosas líneas celulares tumorales para determinar su comportamiento in vitro, lo que ha facilitado la realización de estudios encaminados a un mejor entendimiento de los procesos biológicos de las células involucradas (30).

Por otra parte, uno de los parámetros importantes a determinar en cada estirpe celular es el tiempo de duplicación de la población celular. Desde hace más de tres décadas se ha tenido el interés en determinar el crecimiento y la historia natural de los tumores humanos in vivo empleando el vernier o calíper o in vitro mediante su cinética de proliferación celular (31). Cuando se

empezó a estudiar experimentalmente el crecimiento de tumores, se observó que en la mayoría de los casos este crecimiento mantenía una curva logarítmica que fue descrita inicialmente por Gompertz en 1956 (32); simultáneamente Collins estudió cuantitativamente el crecimiento de metástasis de pulmón no tratada y observó que el tiempo de doblaje permanecía constante manteniendo una curva exponencial (33). De aquí en adelante con el advenimiento de técnicas especializadas, como la incorporación de timidina tritiada, ha permitido la medición del tiempo del ciclo celular y la proporción de células proliferantes de un sinfín de líneas celulares (31).

Estudios recientes en los cuales se han determinado algunos parámetros cinéticos en diferentes tumores, han mostrado que los tiempos de doblaje están significativamente correlacionados con el tipo histológico y son dependientes del ciclo celular, y de la proporción de células proliferantes así como la tasa de generación celular (31).

El conocer los parámetros cinéticos de las células tumorales tiene importantes implicaciones clínicas y terapéuticas como el determinar la historia natural del tumor y la respuesta de este hacia ciertas terapias. Asimismo, los parámetros cinéticos tumorales son de gran valor pronóstico en el tratamiento y cura de varios tipos de cáncer humano (34-35).

Considerando los aspectos anteriores, se ha postulado que los resultados obtenidos in vitro son de relevante importancia para el entendimiento de los procesos neoplásicos in vivo (13).

UNIONES INTERCELULARES

Para que los epitelios y otros tipos celulares lleven a cabo su función de manera integrada, presentan uniones de superficie especializadas que permiten o restringen el paso de iones o moléculas entre las células (36). Los tres principales tipos de uniones son: las uniones "tight" (estrecho), las uniones "gap" (brecha) y los desmosomas (37).

Las uniones "tight" se encuentran presentes en células epiteliales del cuerpo de los mamíferos para evitar el paso de fluidos a través de la capa celular. Las uniones impermeables también llamadas zonulae occludens, se encuentran en el lumen intestinal así como en el acinus pancreático (38).

Las uniones "gap" se distribuyen a lo largo de las superficies laterales de las células y permiten el intercambio de moléculas pequeñas, las cuales ayudan a integrar las actividades metabólicas de todas las células en

los tejidos, asegurando la participación de metabolitos (38).

Los desmosomas son estructuras subcelulares que unen a las células epiteliales y que se encuentran en los epitelios, en el miocardio y la aracnoides (39). La adhesión intercelular está mediada por el entrecruzamiento de las moléculas con desmosomas que se colocan paralelamente en las membranas plasmáticas (40-41). Los desmosomas se anclan con filamentos intermedios que pueden terminar cerca o pasar a través de la submembrana desmosomal para ayudar a mantener la unión y la morfología celular (42). Los desmosomas abundan en tejidos epiteliales estratificados expuestos a tensión mecánica como ocurre en el epitelio de la piel, del cérvix uterino, y de la vejiga, y son producidos en grandes cantidades durante la embriogénesis (39-40). En los tumores de origen epitelial que están en fase inicial de crecimiento, se observan desmosomas que mantienen unidas a las células neoplásicas; pero cuando éstas pierden desmosomas de manera estructural o funcional se separan con mayor facilidad de la masa tumoral, originándose así células metastásicas (43).

Con base en el análisis por microscopía electrónica se han distinguido tres tipos de desmosomas: en cinturón, en mancha, y los hemidesmosomas (44). Los desmosomas en cinturón se encuentran formando una franja de adhesión entre célula y célula, mientras que los desmosomas en mancha son botones de contacto entre células, formando "remaches" entre las membranas de las células adyacentes. Se cree que este tipo de desmosomas formen parte del esqueleto estructural interno de la célula dándole forma y rigidez. Los hemidesmosomas son morfológicamente similares a los desmosomas en mancha, éstos se encuentran en regiones de células epiteliales en contacto con la lámina basal, y se cree que sean las proteínas extracelulares de anclaje para la célula (45).

Por otra parte, los estudios morfológicos y bioquímicos han demostrado que los desmosomas consisten de varias proteínas, organizadas en dos dominios estructural y funcionalmente diferentes: una placa citoplásmica y un centro membranal (46-50).

La placa citoplásmica morfológicamente aparece como una placa discreta debajo de la membrana plasmática (48). Bioquímicamente esta placa está compuesta de proteínas no glicosiladas (las desmoplaquinas DP) con pesos moleculares relativamente aparentes de 250 Kilodaltones (Kd) (DP-I), 215 Kd (DP-II), 83 Kd (DP-III) también llamada Plakoglobina), y de 78 Kd (DP-IV) (51). La placa citoplásmica es el sitio de enlace para los filamentos intermedios de citoqueratina y se encuentra localizada de manera subyacente al dominio del centro membranal (49).

Por su parte, la composición bioquímica del centro membranal consiste en glicoproteínas (las desmogleínas DG) con pesos moleculares de 150 Kd (DG-I), 120 Kd/ 110 Kd

(DG-II/ DG-III), y 22 Kd (DG-IV), (49, 52-54). También se encuentra la calmodulina, con un peso de 240 Kd, que se copurifica con los desmosomas. Se cree que el dominio del centro membranal esté involucrado en la función adhesiva del desmosoma, en donde el calcio se une a la desmogleína, dando a su vez la conformación estructural para la formación de los desmosomas (53-54).

Estudios morfológicos han demostrado que los desmosomas se ensamblan rápidamente sobre las membranas plasmáticas de las células epiteliales adyacentes, bajo la inducción del contacto célula-célula. Además se ha encontrado que el ensamblaje ocurre a partir de proteínas existentes en el citoplasma y sobre la membrana plasmática, sin embargo los mecanismos que regulan la biosíntesis de los dos dominios y su ensamblaje en el desmosoma bajo el contacto célula-célula son aun desconocidos (49-55).

Se tiene reportado que las DP I/II son los dos principales componentes del dominio de la placa citoplasmática, mientras que el principal componente del dominio del centro membranal es la DG-1. La DG-1 presenta una microheterogeneidad antigénica, misma que se ha determinado mediante anticuerpos monoclonales, señalando la existencia de isotipos de la DG-1 que están relacionados con la adherencia celular (56-57). También existe la posibilidad de que tal microdiversidad esté dada por los carbohidratos que forman parte de la DG-1, o tal vez el epítipo esté formado por el polipéptido y la porción glucosídica (58).

Se ha estudiado el mecanismo de biosíntesis y transporte de la DG-1 y se ha determinado que comprende 4 estadios: la formación de un conjunto soluble de la proteína nuclear glucosilada DG-I en el retículo endoplásmico, el transporte de este grupo de proteínas al complejo de Golgi para su glucosilación, la titulación del complejo glucoprotéico hacia un grupo insoluble, y el transporte del grupo insoluble desde el Complejo de Golgi hacia la membrana plasmática. La cantidad de manosa unida a la DG-1 depende de la actividad del complejo de Golgi y se requieren 60 minutos en promedio para que la GD-1 sea transportada hasta la superficie de la membrana celular y se ensamble con otras proteínas para formar los desmosomas. En el trayecto desde el complejo de Golgi hasta la superficie de la membrana plasmática, se puede localizar esta molécula por medio de inmunofluorescencia y por microscopía electrónica (59-60).

DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

La diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula primitiva, aún sin características funcionales específicas, llega a convertirse mediante una serie de modificaciones progresivas en una célula morfológica y funcionalmente especializada (61).

Por otra parte, existe un proceso al cual se le ha denominado desdiferenciación que resulta de una profunda y persistente reorientación de los patrones del metabolismo, cuando éste se presenta persistentemente produce síntesis continua de ácidos nucleicos, de proteínas mitogénicas y enzimáticas y otras sustancias relacionadas con el crecimiento y división que caracteriza a las células que se dividen constantemente como las células tumorales (62). Este proceso está asociado al curso normal de la vida de todas las células bajo condiciones perfectamente controladas, pero cuando se modifica con desviaciones, reversiones o cambios atípicos en su biología, puede dar lugar a funciones patológicas, degeneración maligna o muerte celular (63-64).

El proceso de diferenciación celular está ligado a la biología de todo organismo, y es fundamental en el mantenimiento de la vida. En un organismo adulto gran parte de las células están constantemente degenerándose y muriendo. El organismo y los tejidos para compensar esta pérdida, continuamente están produciendo nuevas células que sustituyan la función de las células que desaparecen, pero cuando existen expresiones orgánicas de nuevas formas tisulares, originadas a expensas de un grupo celular localizado en una 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 (65).

Las neoplasias de acuerdo a su comportamiento pueden ser benignas o malignas. Las neoplasias malignas llamadas comúnmente cáncer, contrario a las benignas, son células que crecen invadiendo las estructuras y tejidos circundantes incluyendo vasos sanguíneos y conductos nerviosos; dichas células están pobremente diferenciadas, presentan una proliferación rápida, con altas tasas de mitosis y su crecimiento autónomo da lugar al proceso conocido como evolución del tumor y además producen metástasis (transferencia de la enfermedad desde un órgano afectado a otro, no directamente conectado con éste), (66-67).

El estado de diferenciación de las células cancerosas suele ser índice de su nivel de malignidad y grado de proliferación. En general, cuanto mayor sea la diferenciación, más lenta crecerá la neoplasia, y visceversa. Se piensa que estas propiedades se encuentran relacionadas con la respuesta defensiva del organismo hacia

la neoplasia, puesto que se postula que mientras más lento crece un tumor más lenta es dicha respuesta (68).

Actualmente se trata de asociar la transformación maligna a diferentes factores como son los físicos (radiación), los químicos (agentes carcinógenos) y los biológicos (virus).

Las neoplasias asociadas a virus son pocas, siendo una de ellas el carcinoma cérvico-uterino.

CANCER CERVICOUTERINO

En la actualidad se han incrementado los avances en las investigaciones en el campo epidemiológico del cáncer cérvico-uterino (CaCu), lo cual ha llevado a la aparición de nuevas hipótesis acerca de su etiología (69-72). Se ha discutido el papel que juega el cigarro, el uso de anticonceptivos, las deficiencias nutricionales, los factores dietéticos e higiénicos, el comportamiento sexual, así como la inmunosupresión asociada a la neoplasia (73-75). El CaCu se ha asociado estrechamente con la etiología viral, pues ya desde 1966 se efectuaron estudios que relacionaron a agentes virales con este tipo de cáncer (76-77). Entre estos agentes se encuentra el Papillomavirus, el Herpesviridae y en menor grado el Citomegalovirus (78). De la familia de los Papillomavirus se han clasificado más de 60 tipos en el humano (HPV-1, HPV-60) (Human Papilloma Virus) de los cuales 23 han sido detectados que puedan infectar al hombre y a la mujer, pero los más frecuentemente asociados con mucosas genitales son los HPVs 11, 16, 18 y 31 que especialmente inducen transformación de células epiteliales del cérvix así como las del cuello del útero denominadas NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical), su etiología se ha confirmado mediante estudios citológicos e histológicos de tejidos infectados, tales como condilomas o epitelio cervical (79-93).

Los Papillomavirus son virus cuya estructura está compuesta por una doble cadena de DNA que contiene aproximadamente 7800-7900 pares de bases; y son caracterizados por presentar un virión no envuelto, una cápside icosaédrica, y replicación dentro del núcleo de las células infectadas. El genoma viral puede dividirse en tres regiones: una región tardía que codifica para proteínas estructurales requeridas para el ensamblaje de partículas virales infecciosas, una región temprana que codifica para proteínas que juegan un papel en la replicación viral y tienen propiedades transformantes (oncogénicas), y una región región regulatoria URR (Upstream Regulatory Region) que se sitúa entre las regiones temprana y tardía (77).

En todos los papillomas la región tardía contiene dos grandes marcos de lectura abierta ORF (Open Reading Frames) designadas L1 y L2. Las regiones ORF no poseen codones de terminación y son potencialmente transcripcionales. Las proteínas derivadas de L1 y L2 no son detectadas en la mayoría de cánceres cervicales. Por otro lado, la región temprana de todos los papillomas contienen cinco diferentes ORF, designados como E1, E2, E4, E6, y E7. Los E6/E7 han sido los segmentos del HPV más estudiados debido a que han sido implicados como genes transformantes (oncogenes) en HPV-16 y HPV-18 (91).

La región E2 codifica al menos para dos proteínas que proveen las principales funciones regulatorias de los papillomavirus: la transactivación (la capacidad de estimular la transcripción del DNA) y la transrepresión (la capacidad de reprimir la transcripción del DNA). En células transfectadas, las proteínas derivadas de E2 aparentemente regulan la transcripción mediante un mecanismo de retroalimentación; cuando éstas se encuentran expresadas en grandes cantidades, el promotor E6 es reprimido. La represión es relevada cuando el factor de transcripción funcional CE II se encuentra presente. Este factor es funcional en líneas celulares de carcinoma humano de origen epitelial, pero no es funcional en keratinocitos humanos de prepucio (91).

El HPV produce un gran número de proteínas regulatorias y toma ventaja de los factores del huésped para sostener una productiva infección del tejido. Cuando la replicación del DNA es interrumpida, la integración del DNA viral en el cromosoma del huésped puede resultar, en consecuencia hay pérdida de los RNAs que codifican para los represores y se desreprimen los RNAs que codifican para las proteínas E6-E7. La multiplicación de las proteínas E6 y E7 en las capas basales del epitelio causa hiperproliferación de las células (formación de cilocitos), manifestándose clínicamente como neoplasia intraepitelial (NIC). Varias evidencias se tienen de que las proteínas E6 y E7 actúan de manera conjunta con otras proteínas oncogénicas (oncogenes Ha-ras, c-myc, p53, SV40, RB, etc) para producir la pérdida del control del crecimiento celular. Recientemente se ha demostrado que las proteínas E6 y E7 derivadas de HPVs oncogénicos se enlazan a productos gene supresores p53 y p105-RB (91-93), (91).

Los antígenos y lo(s) determinante(s) antigénico(s) que son compartidos por todos los Papillomavirus probablemente están localizados en la superficie interna del virión (estructura infectante del virus) y son disponibles como inmunógenos después de la fragmentación de la cápsula (94). Mediante pruebas inmunológicas que emplean suero género-específico se ha demostrado el patrón de distribución del antígeno de las partículas virales descritas en los estudios epidemiológicos y serológicos (96-97). Finalmente, la detección del ARN viral en algunos tipos de cáncer y líneas celulares derivadas de CaCu hace sugerir que para

que se manifieste este cáncer debe expresarse continuamente el gene viral (98-99).

Como se había mencionado anteriormente, otro de los virus involucrado en la carcinogénesis del CaCu es el virus Herpes Simple tipo-2 (HSV-2) (Herpes Simplex Virus) miembro de la familia Herpesviridae humana (99). Sin embargo se tiene evidencia directa de que el HSV-2 tiene potencial oncológico para producir neoplasias en animales, dado que se ha observado la presencia de antígenos específicos del virus en la membrana de células de tumores cervicales en estos animales (100-101). La mayoría de los estudios actuales consideran que el HPV es el principal agente etiológico del CaCu, además se ha propuesto un papel sinérgico del HSV con el HPV en el desarrollo de la neoplasia (102).

En conclusión existen evidencias moleculares, como es la presencia de antígenos virales (HPV y HSV), que apoyan la hipótesis de que muchos compañeros sexuales y una edad temprana de actividad sexual, son factores que pueden contribuir al desarrollo de una neoplasia cervical debido a que el paciente está expuesto a múltiples infecciones genitales. Se ha demostrado que los virus implicados alteran el comportamiento celular mediante la activación de genes celulares por mutación o carcinogénesis de manera similar a la carcinogénesis por sustancias químicas (103). Por otro lado, es conocido también el papel que juega el sistema inmune en la lucha de las infecciones producidas por virus. De tal manera, se ha puesto gran énfasis en el estudio de la interacción existente entre varios tipos de células efectoras como los linfocitos, macrófagos y células asesinas naturales o NK (Natural Killer) entre otras, que intervienen en el rechazo de las infecciones virales (Fig. 1).

INMUNOLOGIA TUMORAL

a) Sistema Inmune

Actualmente, aún se debate acerca de los acontecimientos celulares que ocurren en el cáncer, así como los mecanismos inmunológicos para llevar a cabo su rechazo.

Se conocen principalmente dos mecanismos inmunológicos para destruir al tumor, uno es innato y el otro es adaptativo. El sistema innato (Fig. 2) formado principalmente por células fagocitarias: monocitos-macrófagos así como neutrófilos polimorfonucleares, que junto con las células asesinas naturales destruyen antígenos y células tumorales de manera inespecífica. Todas la células que forman parte de este sistema tienen

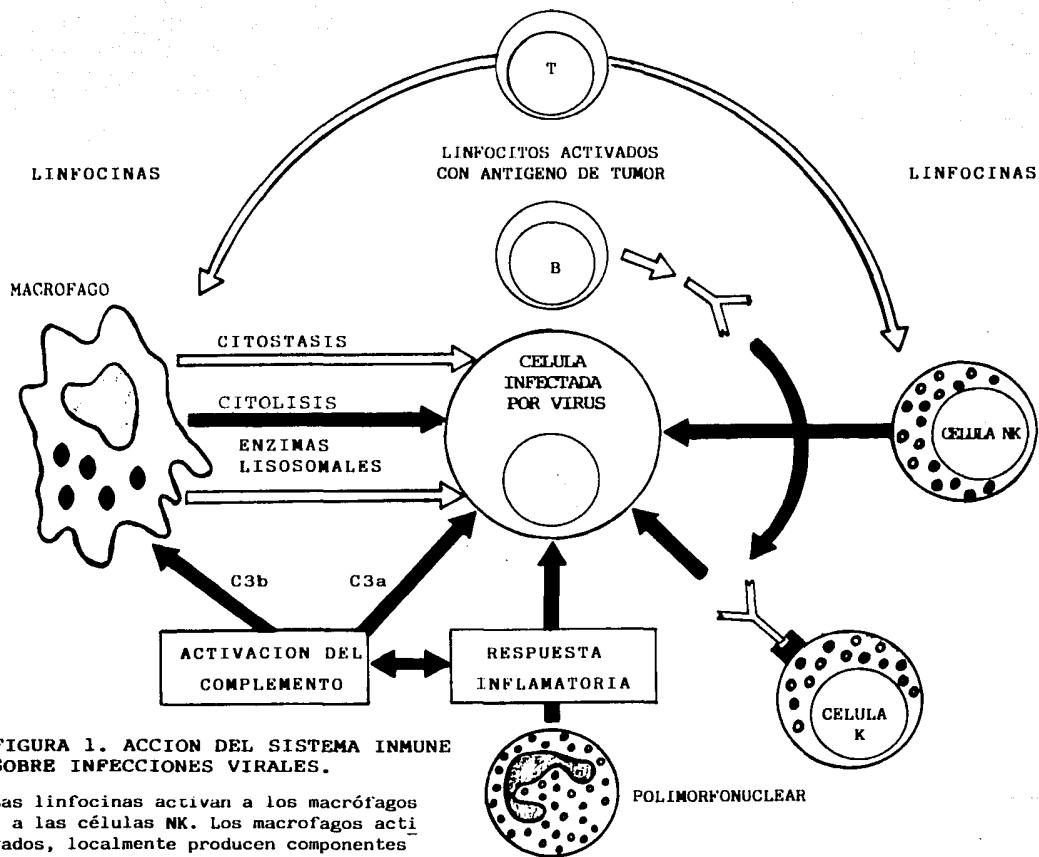


FIGURA 1. ACCION DEL SISTEMA INMUNE SOBRE INFECCIONES VIRALES.

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 citolítica 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. Tomada de ref. (104).

NEUTROFILO POLIMORFONUCLEAR

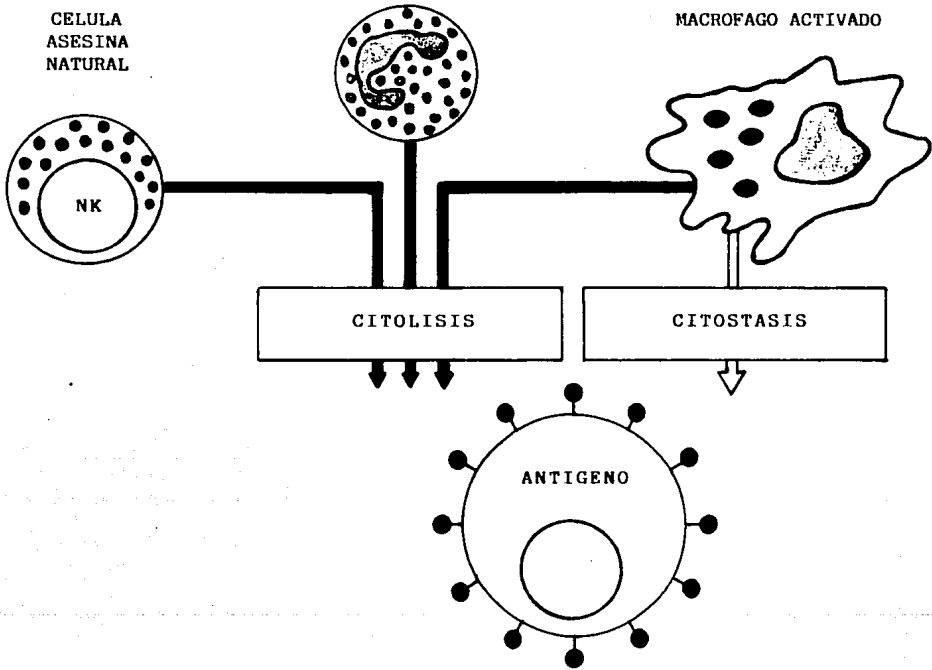


FIGURA 2. CELULAS PARTICIPANTES EN LA INMUNIDAD NATURAL O INNATA Y SUS MECANISMOS DE ACCION. La inmunidad natural es mediada por macrófagos activados, neutrófilos y células NK. Su acción puede ser citolítica, causando la lisis del antígeno o citostática, inhibiendo su crecimiento. Este tipo de inmunidad no requiere anticuerpos y no actúa sobre antígenos específicos. Tomada de ref. (104).

su origen en la médula ósea y atacan a los agentes extraños mediante lisis (citólisis), o inhibiendo su crecimiento (citótaxis), (104).

Cuando el sistema innato fracasa en su intento por detener la invasión de los antígenos o de la proliferación de las células tumorales, se pone en marcha el sistema inmune adaptativo (Fig. 3) caracterizado por la especificidad celular y generación de memoria para contrarrestar el efecto en un segundo ataque. La especificidad se basa en la generación de anticuerpos por parte de los linfocitos B (respuesta inmune humoral) o mediante el ataque lítico efectuado por los linfocitos T por medio de secreciones y moléculas con gran potencial lítico (inmunidad celular). Los linfocitos T constituidos por varias subpoblaciones contribuyen a modular la respuesta celular, ya sea amplificando o suprimiendo la respuesta. Las lincinas son secreciones celulares que tienen gran importancia en la modulación de la respuesta inmune (105-111).

La interleucina-2, también conocida como factor de crecimiento de células T fue primeramente descrita como una lincina capaz de promover el crecimiento a largo plazo in vitro de células T activadas con antígenos y/o mitógenos (112-114). Actualmente es una de las lincinas de gran uso en la proliferación de linfocitos T aplicables en inmunoterapia (115-120).

b) Estructuras de membrana involucradas en el reconocimiento tumoral.

A principios del siglo, durante los primeros estudios llevados a cabo sobre el trasplante de tumores en ratones, se observó que las células tumorales expresaban antígenos no detectables, en comparación a células no malignas, y además de que el sistema inmune del receptor era capaz de responder a esos antígenos. Aunque en las últimas dos décadas ha habido un gran progreso acerca del reconocimiento de antígenos tumorales, los mecanismos involucrados en el control del crecimiento tumoral y en el desarrollo del tumor aún no han sido resueltos (121).

En los últimos años, se ha realizado una gran cantidad de experimentos con el fin de dilucidar la respuesta del huésped hacia el tumor, esta respuesta ha sido detectada por medio de reacciones de piel del tipo de hipersensibilidad tardía, inhibición de la migración de leucocitos in vitro, estimulación de linfocitos y citotoxicidad mediada por linfocitos (112).

Dos importantes descubrimientos en las últimas dos décadas han conducido a nuevos conceptos en la inmunología celular. El primero establece la participación de productos genéticos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) en la interacción entre efectores y células blanco; el segundo ha revelado

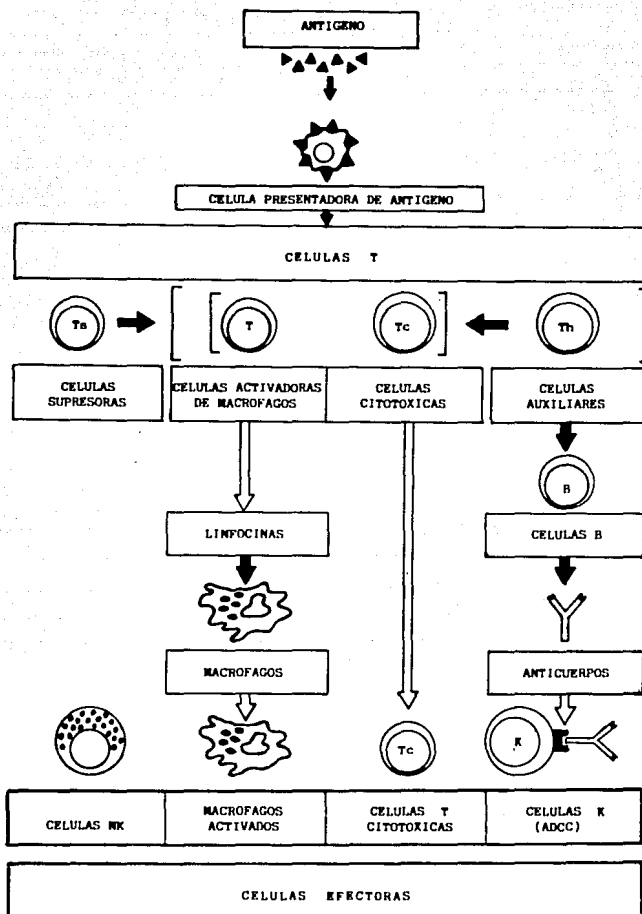


FIGURA 3. ESQUEMA DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA O MEDIADA POR CELULAS. La respuesta inmune mediada por células sigue la presentación del antígeno y activación de las células T. La activación es regulada por células supresoras y auxiliares. Ciertas células T (células activadas por el macrófago) elaboran 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. Tomada de ref. (104).

que la citotoxicidad puede ocurrir de manera indiscriminada, por ejemplo cuando la historia de los donadores de linfocitos no indica sensibilización con antígenos presentes sobre las células blanco (112).

Se ha sugerido que la "citotoxicidad natural" es un importante mecanismo antitumor y se basa en el reconocimiento de estructuras de membrana "alteradas" relacionadas al estatus maligno de las células tumorales. La distinción importante para la naturaleza de la interacción citotóxica es cuando la función efectora es mediada por un proceso de reconocimiento que involucra el receptor antígeno clonotípico de linfocitos T (Ti) y su relación con productos del CMH (104).

El CMH humano está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, esta región codifica para glicoproteínas de superficie altamente polimórficas, su función es la de permitir que las células del sistema inmune discriminen lo propio de lo extraño (122).

Las moléculas clase I del CMH llamadas antígeno HLA-A, B, C (Human Leucocyte Antigen-A, B, C) se componen de dos subunidades: una cadena, la cual es codificada dentro del CMH con peso de 45Kd y consiste de tres dominios extracelulares (N, C1 y C2), un dominio transmembrana y un componente citoplásmico (123). Los epitopos reconocidos por anticuerpos monoclonales para antígenos clase I se encuentran en los dominios N, C1 y C2, mientras que aquellos reconocidos por linfocitos T citotóxicos (LTC) están sobre los dominios N y C1. La segunda cadena (B2 microglobulina) de 12Kd es codificada por un gen diferente al CMH, localizado en el cromosoma 15 (121). Los antígenos del CMH clase I están expresados sobre todos los tipos de células nucleadas (123-124). La región del CMH también controla la expresión de moléculas clase II (DR o Antígenos Ia). Los antígenos clase II consisten de dos cadenas asociadas no covalentemente (alfa y beta; 33-34Kd y 27-30Kd respectivamente) ambas codificadas dentro de la región D o I del CMH (125). Estas cadenas tienen dos dominios extracelulares, una porción transmembrana y una parte intracitoplásmica. Las moléculas clase II humanas son referidas como antígenos HLA-D y son divididas en tres subgrupos principales DP, DQ y DR. Las moléculas clase II tienen una distribución más restringida en los tejidos en comparación a las moléculas clase I. Ellas están presentes en algunos componentes del sistema inmune, incluyendo células B, células del linaje monocito/macrófago (incluyendo células epiteliales de Langerhans y células dendríticas), epitelio tímico y células T activadas. Las moléculas clas II también son expresadas sobre algunas células tumorales (121, 124-125).

El papel principal del antígeno clase II parece ser la mediación de interacciones entre las células del sistema inmune (células T-macrófagos-linfocitos B y otras células presentadoras de antígenos) que son necesarias

para la regulación de la respuesta inmune. Los antígenos clase II también juegan un papel crucial en la estimulación de la proliferación de células alógenicas en cultivos mezclados de linfocitos (121-124).

Los antígenos del CMH clase II son co-reconocidos por células T auxiliares con fenotipo CD4+ junto con antígenos mostrados por las células presentadoras de antígenos. Similar co-reconocimiento de antígenos y productos del gene CMH existe para linfocitos T citotóxicos (LTC), ellos reconocen epitopes de antígenos junto con epitopes de moléculas clase I del CMH. Este reconocimiento dual es la base de la restricción inmunológica de los LTC. Las estructuras CD4 y CD8 determinan cuando los antígenos clase II o clase I respectivamente, están involucrados en el reconocimiento antigénico (104, 112, 126, 130).

En un sistema autólogo, cualquier antígeno tumoral puede ser inmunogénico, sólo si este es reconocido junto con la molécula del CMH (127). La expresión de antígenos del CMH (clase I) varía entre los tumores humanos. En efecto, se han observado diferencias entre células no malignas, entre tumores benignos y malignos de los mismos tejidos y también entre tumores primarios y metastásicos; asimismo se ha observado que la ausencia de antígenos del CMH clase I está asociado con el potencial metastásico del tumor (128, 132-133). De igual manera, la presencia de antígenos DR se ha sugerido que esté relacionado con el grado de diferenciación tumoral y el grado de la enfermedad (132-133).

Por otra parte, se ha observado que la falla en la expresión de antígenos de histocompatibilidad ocurren por diferentes formas: ya sea que las células carezcan de la expresión de B2-microglobulina y no puedan presentar moléculas de la cadena del CMH clase I sobre la superficie celular; que la expresión de los alelos de HLA pueda estar específicamente alterada; también que los cambios en la expresión de CMH y otras moléculas importantes de superficie de las células epiteliales puedan ser consecuencia de infecciones virales que influyen directamente en el perfil inmunológico de las células tumorales y por tanto en su inmunogenicidad (134-139).

c) Inmunoterapia Tumoral

Ciertamente, los objetivos de la inmunología del tumor son los de dilucidar las complejas interrelaciones entre el huésped y el tumor y así manejar éstas con el propósito de diagnosticar, prevenir y tratar el cáncer (105).

La Inmunología Tumoral depende casi en su totalidad del estudio de los cambios antigenicos que puedan ser identificados, tanto en el interior, como en la superficie de las células cancerosas. No obstante, además de estudiar las interrelaciones del huésped y el

tumor así como la expresión antigénica, también estudia los diferentes mecanismos para generar una mayor y más eficiente respuesta contra los tumores (140).

A través del tiempo, el entusiasmo ha crecido en este campo, lo que ha permitido llevar a cabo manipulaciones clínicas para proveer linfocitos activados que reaccionan contra el tumor de pacientes con cáncer, ya sea por la proliferación de linfocitos in vitro con IL-2 e infundiéndolos a los pacientes, o por la administración sistémica de IL-2 para la activación in vivo de los linfocitos. Evidentemente, los primeros tratamientos de tipo inmunológico se hicieron en animales de experimentación y por medio de técnicas in vitro (141-149).

La reactividad antitumoral se ha basado en el uso de dos tipos de células inmunocompetentes. Una de ellas, las células T antígeno-específicas, las cuales reconocen una gran variedad de antígenos sobre células tumorales, pueden ser generadas in vitro: ya sea por el cultivo de linfocitos de sangre periférica con células tumorales, cultivo denominado MLTC (Mixed Lymphocyte Tumor Culture), (160-166); por el cultivo de linfocitos infiltrantes en el tumor o TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes), (161); o por medio del cultivo de linfocitos heterólogos llamado MLC (Mixed Lymphocytes Culture), (156). Todas estas técnicas usualmente requieren IL-2 para la proliferación celular. Además se ha reportado que los linfocitos por sí solos son capaces de lisar a las células tumorales en un 20% de los pacientes y que al ser clonados previamente por alguna de las técnicas mencionadas, su capacidad lítica aumenta hasta en un 75% en los pacientes tratados (141).

El segundo tipo de células se refiere a una población de células efectoras que destruyen al tumor de una manera no específica, sin reconocer antígenos sobre las células tumorales, como lo hacen las células asesinas. Las poblaciones más usadas para estos tipos de respuesta son las células NK y LAK (Lymphokine Activated Killer Cells) estas últimas células son generadas por la activación con linfocinas, específicamente IL-2 (162-165).

Desde hace ocho años, la técnica de Inmunoterapia Adoptiva ya ha sido aplicada en los primeros ensayos clínicos en algunos grupos de pacientes con cáncer en estadios muy avanzados (cáncer metastásico), obteniéndose desde resultados de completa curación, hasta una regresión parcial del tumor (164-167). En estas pruebas clínicas se han presentado diversos cuadros sintomáticos muy agudos, producidos por la administración sistémica de IL-2, sin embargo éstos han sido reversibles en su mayoría (164).

Es claro, que estas complicaciones han conducido a encontrar nuevas alternativas metodológicas para la generación de linfocitos citotóxicos específicos a tumores, sin la administración exógena de IL-2. Por lo tanto el

cultivo de MLTC tiene potencial para ser utilizado en Inmunoterapia, principalmente en aquellas enfermedades en las que se sospeche de la existencia de antígenos tumorales fuertes, que en ocasiones están asociados en neoplasias, como ocurre en el cáncer cérvico-uterino.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es conocido que el carcinoma cérvico uterino (CaCu) es más frecuente en países subdesarrollados que en países altamente industrializados, lo cual se puede atribuir al nivel socioeconómico y estilo de vida. En México esta enfermedad tiene gran importancia como causa de mortalidad, ya que dentro del total de las enfermedades neoplásicas ocupa el primer lugar con un 40 % de incidencia. Aunque existen importantes avances en su tratamiento, desafortunadamente todavía el índice de mortalidad es muy alto, lo cual nos lleva a pensar que los mecanismos fisiopatológicos y de rechazo inmune no están aún bien entendidos. Es aquí donde la inmunología tumoral juega un papel importante para comprender las complejas interrelaciones entre el huésped y el tumor, con el propósito de diagnosticar, prevenir y tratar el cáncer. En base a lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo es la obtención de linfocitos citotóxicos dirigidos contra células de CaCu, así como el de estudiar su citotoxicidad sobre estas células.

HIPOTESIS

Se sabe de la capacidad que tienen los linfocitos T citotóxicos de la sangre periférica para reconocer antígenos virales y eliminar a las células que los portan; además, se tienen suficientes evidencias que indican que el cáncer cérvico-uterino (CaCu) es de etiología viral y que sus células suelen presentar antígenos virales de superficie. Asimismo, se sabe que la interleucina-2 (IL-2) es un potente mitógeno de linfocitos T y que puede ser empleada in vitro para hacer proliferar linfocitos citotóxicos.

En consecuencia, si se co-cultivan células tumorales de CaCu con linfocitos de sangre periférica en presencia de IL-2, se esperaría que se originen células T citotóxicas que tengan la capacidad de eliminar específicamente a las células tumorales que porten antígenos virales de superficie.

OBJETIVOS

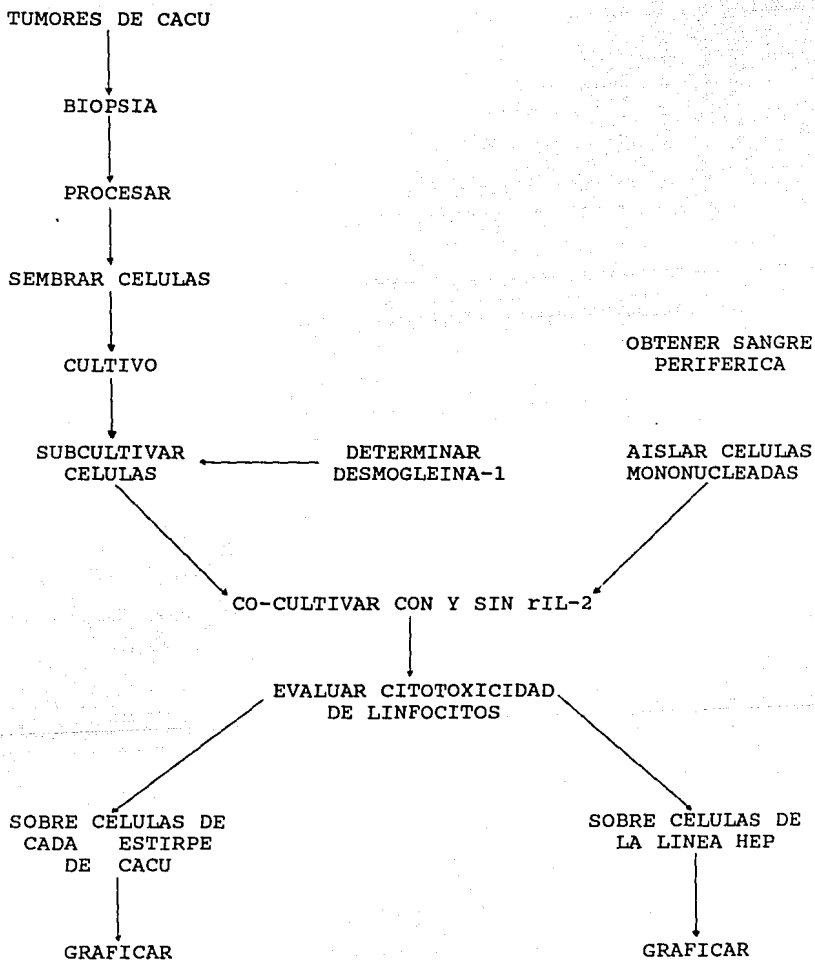
OBJETIVO GENERAL

Estudiar la citotoxicidad in vitro de linfocitos de sangre periférica sobre células tumorales de cáncer-cérvico uterino, por medio de la técnica de co-cultivo de leucocitos de sangre periférica con células provenientes de este tipo de tumor, en presencia de interleucina-2 recombinante humana.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Obtener estirpes celulares a partir de biopsias provenientes de tumores de pacientes con cáncer cérvico-uterino.
- 2.- Determinar las cinéticas de proliferación de las estirpes celulares obtenidas.
- 3.- Sensibilizar linfocitos de sangre periférica con las estirpes obtenidas en tumores de cáncer cérvico-uterino.
- 4.- Determinar la citotoxicidad de los linfocitos sensibilizados en subcultivos de células tumorales.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y METODO

Para llevar a cabo la realización de los objetivos planteados en este trabajo, se desarrolló la siguiente metodología:

MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consistió de tejido tumoral de cáncer CaCu, el cual fue obtenido por medio de biopsias en pacientes con CaCu libres de tratamiento. Las biopsias fueron tomadas en el Instituto Nacional de Cancerología y en la Clínica 4 del IMSS. Asimismo, se obtuvieron muestras de histerectomías de cérvix sano realizadas en mismas instituciones. Finalmente, las muestras de sangre periférica fueron tomadas de donadores sanos, sin enfermedad aparente.

SIEMBRA DE LAS CELULAS TUMORALES

Las muestras de tejido, tanto tumoral como normal, fueron trasladadas al laboratorio en tubos de plástico de 50ml de capacidad (Falcon U.S.A) conteniendo Medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. U.S.A.), (Apéndice 1) en una proporción del 90%, más 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB) (Microlab, Mexico) previamente desactivado (Apéndice 2) y suplementado con penicilina (Farmacéuticos Lakeside, S.A de C.V, México) 1000 U/ml y estreptomocina (Farmacéuticos Lakeside, S.A de C.V, México) 1mg/ml. El transporte se hizo en un recipiente conteniendo hielo.

Antes de procesar las muestras, éstas fueron lavadas bajo condiciones de esterilidad con una solución amortiguadora de fosfatos PBS (Phosphate Buffer Solution), (Apéndice 3). A continuación el tejido fue cortado en pequeños trozos y sembrado por diferentes métodos de cultivo dependiendo de su consistencia.

a) Método de Explante Primario, o de Adherencia por Contacto.

Una vez fragmentado y lavado el tejido en PBS, a continuación se procedió a colocar varios fragmentos en la superficie de las cajas de cultivo (Cajas Petri 60x15mm Lux Scientific Corporation, U.S.A), después las cajas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con el objeto de que el tejido se fijara perfectamente sobre la superficie de la caja.

Después de este tiempo, se adicionaron cuidadosamente 5 ml de medio de cultivo (MC) por caja, el MC consistió de medio RPMI-1640 suplementado al 10% con SFB.

Este método se empleó cuando las muestras de tejido tenían una consistencia suave y cuando éstas eran fácilmente fragmentables.

b) Método de disgregación mecánica.

Después de fragmentar al tejido en pequeños trozos con tijeras, éstos fueron llevados a un matríz erlenmeyer para someterlos a lavados intensivos con una solución salina amortiguadora de verseno (**Apéndice 4**) en un baño de agua a 37°C y con agitación constante, a intervalos de 15 minutos cada lavado.

Las células obtenidas de cada lavado del tejido, fueron lavadas tres veces con PBS mediante centrifugación a 500g, 5 minutos cada una para posteriormente ser resuspendidos en 5ml de MC y ser distribuidas en las cajas de cultivo para incubación. Este método se empleó preferentemente para muestras cuya consistencia fue muy blanda.

c) Método de Disgregación por Colagenasa-Tripsina.

De acuerdo a este método, inicialmente los trozos de tejido fueron lavados durante 15 minutos con solución de verseno en un baño de agua a 37°C con agitación constante. En seguida el sobrenadante se desechó por decantación y el tejido se sometió a la digestión con una solución de colagenasa (Tipo IV, Sigma Chemical Co. USA) al 0.1%, la disgregación se realizó a 37°C en baño de agua durante 40-60 minutos en agitación constante. Después de este tiempo, las células obtenidas en suspensión, se lavaron 3 veces con solución de PBS mediante centrifugación a 500g durante 5min, finalmente las células se resuspendieron en 5ml de MC para ser distribuidas a las cajas Petri y llevarlas a un volumen final de 5ml para incubarlas.

El tejido restante de la primera disgregación, fue sometido a una solución de tripsina (Sigma Chemical, U.S.A) a 0.025% durante 30 min a 37°C y agitación constante. Después de producir la disgregación completa del tejido, las células obtenidas fueron lavadas tres veces con PBS mediante centrifugación a 500g, para finalmente ser distribuidas en cajas de cultivo e incubarlas.

Este método se empleó cuando la consistencia del tejido fue fibrosa.

d) Método de disgregación multienzimática.

De acuerdo a este método, después del lavado de los fragmentos de tejido durante 15 minutos en verseno, el tejido fue sometido a una mezcla de enzimas compuesta por DNasa 0.002% (Sigma Chemical Co. U.S.A), Colagenasa 0.01% y Tripsina 0.01% durante 30-60 minutos dependiendo de la apariencia del disgregado, después de este tiempo, las células contenidas en el sobrenadante fueron lavadas tres veces con PBS mediante centrifugación a 500g cada una, a continuación las células se resuspendieron en 5ml de MC y se distribuyeron en las cajas de cultivo para finalmente ser incubadas.

Por otra parte, el tejido restante fue sometido a una nueva mezcla compuesta por DNasa 0.002%, Colagenasa 0.01% e Hialuronidasa (Sigma Chemical, U.S.A) 0.1% durante 30 minutos, después de este tiempo las células obtenidas fueron lavadas tres veces con PBS y resuspendidas en M.C antes de ser incubadas.

Este método se empleó cuando la consistencia del tejido fue muy rígida y fibrosa.

CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos celulares contenidos en cajas de Petri, fueron mantenidos en incubadora (Form Scientific, Division of Mallincrodt, Inc. U.S.A) a 37°C de temperatura, con una atmósfera al 10 % de bióxido de carbono y un ambiente saturado de humedad.

SUBCULTIVOS CELULARES

Tan pronto las células obtenidas en los cultivos empezaban a cubrir la superficie de las cajas, fueron subcultivadas de la siguiente manera:

Primero se retiró el medio de cultivo contenido en la caja, a continuación se adicionaron cuidadosamente 2 ml de verseno para lavar la superficie de la caja, en seguida se retiró el verseno, se adicionaron nuevamente 2 ml de verseno y se procedió a incubar durante 5 min, después de este tiempo, las células fueron removidas de la superficie de la caja mediante pipetéo suave. Las células obtenidas en suspensión fueron lavadas 3 veces con MC mediante centrifugación a 500 g durante 5 minutos cada una. En seguida, las células fueron resuspendidas en 5 ml de MC para ser distribuidas en cajas de cultivo para que finalmete fueran incubadas.

TECNICA DE CRIOPRESERVACION

Con el propósito de preservar las células que fueron obtenidas a partir de las biopsias tumorales, se aplicó la técnica de criopreservación, la cual consistió en lo siguiente:

Las células de los cultivos en fase de crecimiento exponencial (sin llegar a saturación) fueron removidas de la superficie de la caja de cultivo mediante pipeteo suave, después fueron lavadas con MC y finalmente resuspendidas en una solución para congelación compuesta por 90% de MC y 10% de Dimetil Sulfóxido (Sigma Chemical Co. U.S.A). Inmediatamente después, las células se repartieron en pequeñas ampollitas (Cooke Laboratory Products, U.S.A) de 1ml y se congelaron a -70°C durante de 24-72 hrs, después de este tiempo fueron introducidas en nitrógeno líquido a -190°C para su preservación indefinida.

DETERMINACION DE DESMOGLEINA-1 POR INMUNOFLUORESCENCIA

Para determinar el origen epitelial de las estirpes celulares se utilizó una técnica de inmunofluorescencia empleando el anticuerpo policlonal anti-desmogleina-1 (Anti-DG-1) obtenido de conejo y marcado con Fluoresceína (Sigma Chemical Co. U.S.A). Para tal efecto, las células de cada estirpe se hicieron proliferar en cubreobjetos de vidrio, una vez que éstas llegaron a la confluencia, fueron lavadas en PBS cuidadosamente. A continuación se procedió a la fijación de las células con una solución de alcohol absoluto:acetona 1:1 vol:vol, paso seguido, las placas fueron lavadas nuevamente con PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} . En seguida se adicionó el anticuerpo (Anti DG-1) con fluoresceína y después de un lavado exhaustivo con PBS y albúmina sérica al 1%, los cubreobjetos fueron montados con glicerol al 50% en solución salina tris y 1ml/ml de paradifenildiamina (Sigma Chemical Co. U.S.A). Finalmente se procedió a evaluar el porcentaje (%) de células que mostraron fluorescencia con ayuda de un microscopio de fluorescencia.

CINETICAS DE PROLIFERACION DE LAS ESTIRPES CELULARES

Con la finalidad de conocer algunos parámetros cinéticos, tales como el tiempo adaptación de las células en cultivo, o tiempo de latencia (TL), tiempo de duplicación de la población celular en proliferación (TD) así como la densidad de saturación de las células en el sustrato de cultivo (DS), se hicieron subcultivos de cada una de las estirpes celulares obtenidas.

Las células de cada una de las estirpes fueron removidas de los subcultivos en fase de proliferación exponencial con una solución de verseno y agitación vigorosa. Una vez lavadas las células con MC, se resuspendieron en un volumen de 5ml de MC. y se procedió a su evaluación mediante la ayuda de una cámara de Neubauer (American Optical, U.S.A). Después de evaluar la cantidad de células, éstas se repartieron en 20-24 cajas Petri de cultivo de 35x15 mm (Costar, U.K, U.S.A) a una densidad aproximada de 30 000 células por caja de 2.5 ml. A continuación las cajas de cultivo fueron incubadas durante varios días, con cambio parcial de MC cada 5-7 días.

Los conteos celulares se realizaron diariamente tomando un par de cajas y evaluando el número de células en cada una. Finalmente se procedió a graficar en papel semilogaritmico los datos obtenidos. A partir de las tres fases obtenidas en las gráficas (Fase de Adaptación, Fase de Proliferación y Fase de Meseta) se obtuvieron los parámetros cinéticos de las estirpes: el TL se estimó al inicio del cultivo en la fase de Adaptación, el TD se estimó interpolando dos puntos en la Fase de Proliferación y la DS se estimó en la Fase de Meseta de las gráficas. Cada cinética se llevó a cabo de 2 a 3 veces con su repetición respectiva.

**OBTENCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP)
(Técnica de Ficoll- Hypaque).**

En condiciones de esterilidad se obtuvieron 10-20ml de sangre periférica de donadores normales, mediante jeringa o tubo de Vacutainer 100 x 16 mm (Becton Dickinson and Co. U.S.A) conteniendo heparina 0.1 ml a 1000 U/ml (Rickerab/NC B, U.S.A). En seguida la sangre fue centrifugada 10 min a 500g, después de este tiempo, el plasma fue separado del paquete celular mediante pipeteo suave.

Después de este procedimiento, al plasma se le adicionó 0.1 ml de Clorhidrato de Protamina 1000 U/ml (F. Hoffmann-La Roche & Cie., S.A. Basilea/Suiza) con el fin de efectuar la coagulación de las proteínas. Una vez coagulado el plasma, se procedió a separar el suero mediante pipeteo y finalmente se desactivó durante 30 min a 56°C.

Por otra parte, el paquete celular fue lavado con RPMI-1640, adicionando un volumen igual de RPMI-1640 al del paquete celular, el lavado se hizo mediante centrifugación a 500g durante 10 minutos, después de este tiempo el sobrenadante (RPMI) fue desechado y al paquete celular se le adicionó nuevamente RPMI, en seguida se resuspendió perfectamente hasta formar una mezcla homogénea, después de esto se vertieron cuidadosamente alicuotas de 5 ml de la mezcla en tubos conteniendo 2ml de Ficoll Hypaque (Sigma Chemical, Co. U.S.A) de 1.077 de densidad, en seguida los tubos fueron centrifugados durante 30 minutos a 300g.

Transcurrido este tiempo, se separaron las bandas de células mononucleadas situadas en la interface entre el paquete de eritrocitos y el medio de RPMI, mediante pipeteo suave. Los leucocitos fueron lavados tres veces con RPMI-1640 y en seguida se resuspendieron en RPMI-1640 suplementado con L-Glutamina 2 mM para ser evaluados y distribuidos en los cultivos celulares.

CO-CULTIVOS CELULARES

Con la finalidad de que LSP contenidos en el paquete leucocitario, reconocieran posibles antígenos tumorales o virales asociados a las células de las estirpes de CaCu, se hicieron co-cultivos de los LSP con las células blanco en prueba, en una proporción aproximada de 20 LSP por una célula blanco durante una semana, en presencia y ausencia de interleucina-2 recombinante humana (IL-2rh), en RPMI-1640 con L-Glutamina 2mM y suplementado con suero humano al 10% (obtenido del donador de LSP). Después, los LSP contenidos en el sobrenadante fueron retirados y co-cultivados nuevamente con las células blanco bajo las mismas condiciones durante otra semana, finalmente antes de evaluar su citotoxicidad se determinó su viabilidad empleando un ensayo de exclusión con azul de tripano (Apéndice 5).

CITOTOXICIDAD DE LINFOCITOS SENSIBILIZADOS EN CO-CULTIVO

A los linfocitos sensibilizados en los co-cultivos con las células blanco, se les evaluó su actividad citotóxica sobre la proliferación de éstas mediante la siguiente metodología: en principio se hicieron cultivos de células blanco en placas de cultivo de 24 pozos (Nunclon, Delta, Denmark) a una densidad de 30 000 células blanco por pozo, después de 2 o 3 días de cultivo, se adicionaron los linfocitos que habían sido sensibilizados con las células blanco en presencia de rIL-2 (LS+) o en ausencia de ésta (LS-). También se ensayó la actividad citotóxica de los linfocitos LAK (Lymphocyte Activated Killer) los cuales fueron obtenidos mediante el cultivo de LSP con IL-2rh durante dos semanas con cambio de medio de cultivo e IL-2rh cada 5-7 días. Asimismo también se ensayó la actividad citotóxica de los LSP frescos sin ser activados ni sensibilizados previamente. Las poblaciones linfocitarias efectoras se co-cultivaron en una proporción de 50:1 con respecto a las células blanco.

La citotoxicidad producida en las células blanco por las poblaciones linfocitarias efectoras se evaluó mediante la exclusión de células teñidas con azul de tripano. El

porcentaje de citotoxicidad se calculó diariamente y para cada tratamiento de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de citotoxicidad} = \frac{\text{Número de C.B teñidas con A.T}}{\text{Número Total de C.B de el T.N.}} \times 100$$

En donde:

C.B= Células Blanco
T.N= Testigo Negativo
A.T= Azul de Tripano

**PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DE LINFOCITOS PRE-SENSIBILIZADOS
CON LAS ESTIRPES TUMORALES DE CaCu.**

Para determinar, si los linfocitos fueron sensibilizados específicamente contra las células tumorales con las cuales fueron sensibilizados inicialmente y contra las cuales habian mostrado citotoxicidad, se procedió a evaluar su efecto citotóxico sobre la proliferación de una línea celular diferente a la cual fueron sometidos. Para lo cual se empleó la línea celular de carcinoma de laringe denominada HEP. Células de la línea HEP se cultivaron en placas de 24 pozos a una densidad de 30 000 células pozo, después de 2-3 días de cultivo se adicionaron los linfocitos que habian sido sensibilizados con cada una de las estirpes de CaCu a una densidad aproximada de 50:1 con respecto a las células blanco. También en estos ensayos se evaluó la actividad citotóxica de las células LAK y de linfocitos que habian sido sensibilizados con la línea HEP (L-HEP).

La citotoxicidad se evaluó también por exclusión de las células blanco teñidas con azul de tripano y comparando con el testigo negativo (células HEP sin tratamiento).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

a) Morfología de las estirpes celulares y métodos de cultivo.

Para discernir si la morfología celular obtenida en los cultivos era independiente del método de cultivo empleado, se utilizó la prueba de Chi-cuadrada de Independencia, Tablas de Contingencia (Apéndice 6).

b) Cinéticas de proliferación de las estirpes celulares.

Cada una de las cinéticas de proliferación de las estirpes celulares utilizadas en este trabajo fueron calibradas mediante un Análisis de Regresión Exponencial o Semilogarítmica, (Apéndice 7) aplicado en la fase de proliferación exponencial de cada gráfica.

c) Cinéticas de proliferación de las células blanco en presencia de los tratamientos con las células efectoras (Citotoxicidad).

La comparación entre las cinéticas de dos tratamientos fueron realizadas con la ayuda de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney o Prueba del Rango para Muestras Independientes (Apéndice 8).

Por otra parte, para comparar tres o más cinéticas de proliferación de las células blanco en presencia de los tratamientos, se aplicó la prueba de Análisis de Varianza de un Factor con Bloques Aleatorios Completos por Rangos de Friedman (Apéndice 9).

RESULTADOS

CULTIVO DE BIOPSIAS DE CaCu Y CERVIX NORMAL

Con el objeto de establecer estirpes celulares a partir de biopsias de tumores de cáncer cérvico-uterino (CaCu) y de tejido de cérvix normal, se procesaron un total de 65 muestras, de las cuales 5 provinieron de cérvix normal y 60 de CaCu. Las muestras fueron procesadas por cuatro métodos de cultivo dependiendo de la consistencia del tejido, éstos fueron: por explante (E); por disgregación enzimática con colagenasa y tripsina (CT); por disgregación multienzimática (ME) empleando colagenasa, hialuronidasa y DNAsa, y finalmente por disgregación mecánica (M).

Veinte de las 65 muestras (3 normales y 17 tumorales) fueron procesadas por el método de E, de éstas 9 (2 normales y 7 tumorales) presentaron proliferación celular; obteniéndose en consecuencia un 45% de eficiencia con este método; la morfología celular obtenida fue muy variada, ya que 3 cultivos mantuvieron la morfología típica epitelial semejante a una "calle empedrada"; 3 más fibroblástica (típicamente alargada) y otros 3 con morfología mixta (Tablas 1 y 2).

Por otro lado, 15 muestras (2 normales y 13 tumorales) fueron procesadas por el método de CT, seis muestras (1 normal y 5 tumorales) proliferaron durante varios días, lográndose así un 40% de eficiencia; la morfología celular de los cultivos también fue muy variable, observándose 2 epiteliales, 1 fibroblástica y 3 mixtas (Tablas 1 y 2).

Otras 23 muestras (todas ellas tumorales) se procesaron por el método de ME, en donde sólo 6 lograron proliferar, alcanzándose así un 26% de eficiencia por este método; morfológicamente 2 cultivos fueron epiteliales, 1 fibroblástico y 3 mixtos (Tablas 1 y 2).

Finalmente, por el método de M, 5 de 7 muestras proliferaron en cultivo, lográndose en consecuencia un 71% de eficiencia; por este método las células en 4 cultivos conservaron la forma epitelial y en 1 la forma fibroblástica (Tablas 1 y 2). Podemos concluir según nuestros resultados que la morfología celular obtenida en nuestros cultivos fue independiente del método utilizado para su obtención ya que en todos los casos obtuvimos tanto células con morfología epitelial como fibroblástica ($\alpha=0.05$, $g.l=6$, $X^2=5.2787$, X^2 de Independencia-Tablas de Contingencia) (Tabla 2, Apéndice 6).

Es interesante mencionar que de los 26 cultivos proliferantes sólo 7 de ellos (2 de epitelio normal y 5 de tejido tumoral de CaCu) lograron mantenerse durante más de 10 resiembras consecutivas (aproximadamente 1 cada semana), mientras que los 19 restantes debido a su baja capacidad proliferativa fueron desechados. A los

TABLA 1

**RELACION DE BIOPSIAS DE CANCER CERVICO-UTERINO Y CERVIX
NORMAL PROCESADAS POR CUATRO METODOS DE CULTIVO**

METODO DE CULTIVO	N U M E R O D E B I O P S I A S		% DE EFICIENCIA DEL METODO
	P R O L I F E R A C I O N (+)	(-)	
E	20	9	45
C-T	15	6	40
M-E	23	6	26
M	7	5	71
	<u>65</u>	<u>26</u>	<u>39</u>
			[^] X=40

SIMBOLOGIA:

METODO DE CULTIVO

E= EXPLANTE

C-T= DISGREGACION ENZIMATICA CON COLAGENASA-TRIPSINA

M-E= DISGREGACION MULTIENZIMATICA CON COLAGENASA-HIALURONIDASA Y DNAsa.

M= DISGREGACION MECANICA

(+)= CON PROLIFERACION

(-)= SIN PROLIFERACION

TABLA 2

MORFOLOGIA DE LAS CELULAS DE LAS ESTIRPES DE CANCER CERVICO-UTERINO Y CERVIX NORMAL ESTABLECIDAS POR CUATRO METODOS DE CULTIVO

METODO DE CULTIVO	No. DE MUESTRAS	MORFOLOGIA CELULAR		
		EPI	FIB	MIX
E	9	3	3	3
C-T	6	2	1	3
M-E	6	2	1	3
M	5	4	1	0
	26	11	6	9

SIMBOLOGIA:

METODO DE CULTIVO

E= EXPLANTE
 C-T= DISGREGACION ENZIMATICA CON COLAGENASA TRIPSINA
 M-E= DISGREGACION MULTIENZIMATICA CON COLAGENASA
 HIALURONIDASA Y DNAsa.
 M= DISGREGACION MECANICA
 EPI= EPITELIAL
 FIB= FIBROBLASTICA
 MIX= MIXTA

ANALISIS ESTADISTICO
 LA MORFOLOGIA CELULAR ES INDEPENDIENTE DEL METODO DE CULTIVO EMPLEADO
 $\alpha=0.05$ g.l=6 χ^2 cal=5.2787
 Chi DE INDEPENDENCIA, TABLAS DE CONTINGENCIA

cultivos de tejido normal se les denominó ENO-1 y ENO-2 (ambos se obtuvieron por el método de E) presentando una morfología epitelial y fibroblástica respectivamente. A los cultivos tumorales (obtenidos por diferentes métodos) de morfología epitelial se les denominó T3 e INBL, mientras que a los fibroblásticos CRHE y GEPE, únicamente un cultivo que durante las primeras cinco resiembras mostró una morfología mixta y posteriormente sólo epitelial se le nombró CALO (Tabla 3).

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LAS PACIENTES Y CITOPATOLOGICAS DE LAS ESTIRPES CELULARES OBTENIDAS.

La edad de las pacientes de las cuales se obtuvieron las muestras fluctuó entre 45 y 80 años. Las estirpes normales ENO-1 y ENO-2 fueron provenientes de dos pacientes en las cuales se encontró que después de una histerectomía sus tejidos estaban libres de quistes y neoplasias. De las estirpes obtenidas de tejido tumoral, cuatro se derivaron de tumores cuyo diagnóstico fue de Carcinoma Epidermoide de Células Grandes No Queratinizado (CALO, T3, CRHE e INBL), y una de ellas (GEPE) de un Carcinoma Epidermoide de Células Grandes Queratinizantes. Desde el punto de vista microscópico, todas las estirpes celulares mostraron características neoplásicas mediante la tinción con hematoxilina eosina, ya que sus células presentaron mitosis atípicas, núcleos pleomórficos e hiper cromáticos, pérdida de la relación núcleo-citoplasma, así como la clásica formación de perlas córneas celulares (Tabla 4).

El estadio clínico de los tumores fue de IIB para las estirpes CALO y T3, IIIB para las CRHE y GEPE, (presentando en éste último metástasis a pulmón) y IVA para la INBL (Tabla 4).

PRUEBAS DE ANTIDSMOGLEINA (anti DG-1) EN LAS ESTIRPES CELULARES

Con la finalidad de verificar si las estirpes celulares establecidas tenían un origen epitelial, se evaluó la presencia de desmogleina-1 (una proteína característica de las uniones desmosomales intercelulares de los epitelios). La técnica empleada consistió en una tinción diferencial usando el anticuerpo policlonal antidesmogleina-1 (Anti-DG-1).

La estirpe ENO-1 con morfología epitelial típica, fue altamente positiva en membrana para anti-DG-1 (evaluado después de las resiembras R-10, R-15 y R-18). El 100% de las células presentaron tinción en membrana mientras que sólo el 25% en citoplasma (Tabla 5).

La estirpe ENO-2 que fue teñida en su cuarta resiembra, en la cual presentaba una morfología fibroblástica, resultó

TABLA 3

ESTIRPES CELULARES ESTABLECIDAS

ESTIRPE CELULAR	METODO DE OBTENCION	MORFOLOGIA CELULAR
ENO-1	E	EPITELIAL
ENO-2	E	FIBROBLASTICA
CALO	C-T	EPITELIAL
T3	C-T	EPITELIAL
CRHE	M-E	FIBROBLASTICA
GEPE	C-T	FIBROBLASTICA
INBL	E	EPITELIAL

SIMBOLOGIA:

METODO DE CULTIVO

E= EXPLANTE
C-T= DISGREGACION ENZIMATICA CON COLAGENASA TRIPSINA
M-E= DISGREGACION MULTIENZIMATICA CON COLOGENASA
HIALURONIDASA Y DNasa.

TABLA 4

**CARACTERISTICAS CLINICAS Y PATOLOGICAS DE LOS TEJIDOS
PRECURSORES DE LAS ESTIRPES CELULARES**

CERVIX NORMAL

ESTIRPE (ENO-1)

EDAD DE LA PACIENTE: 48 años.
DIAGNOSTICO CLINICO: Miomatosis.

ESTIRPE (ENO-2)

EDAD DE LA PACIENTE: 54 años.
DIAGNOSTICO CLINICO: Miomatosis.

CANCER CERVICO-UTERINO

ESTIRPE (CALO)

EDAD DE LA PACIENTE: 55 años.
DIAGNOSTICO CLINICO: Carcinoma Epidermoide de Células
Grandes. No queratinizado.
DESCRIPCION MICROSCOPICA: Las células muestran núcleos
pleomórficos con mitosis atípicas. Escaso citoplasma
eosinófilo y núcleos centrales. Forman grupos en mosaico.
ESTADIO CLINICO: IIB.

ESTIRPE (T3)

EDAD DE LA PACIENTE: 55 años.
DIAGNOSTICO CLINICO: Carcinoma Epidermoide de Células
Grandes. No queratinizado.
DESCRIPCION MICROSCOPICA: Células con núcleos grandes,
pleomórficos e hiper cromáticos, mitosis atípicas.
ESTADIO CLINICO: IIB.

ESTIRPE (CRHE)

EDAD DE LA PACIENTE: 80 años.
DIAGNOSTICO CLINICO: Carcinoma Epidermoide de Células
Grandes. No queratinizado.
DESCRIPCION MICROSCOPICA: Células pleomórficas, abundantes
mitosis y pérdida de la relación núcleo-citoplasma.
Infiltrado inflamatorio agudo y crónico. Flora bacteriana
cocoide.
ESTADIO CLINICO: IIIB.

ESTIRPE (GEPE)

EDAD DE LA PACIENTE: 48 años.

DIAGNOSTICO CLINICO: Carcinoma Epidermoide de Células Grandes Queratinizante.

DESCRIPCION MICROSCOPICA: Células epiteliales con escaso citoplasma eosinófilo. Células con grados variables de atipia y formación de perlas córneas.

ESTADIO CLINICO: IIB con METASTASIS.

ESTIRPE (INBL)

EDAD DE LA PACIENTE: 45 años.

DIAGNOSTICO CLINICO: Carcinoma Epidermoide de Células Grandes. No queratinizante.

DESCRIPCION MICROSCOPICA: Células grandes con núcleos hipercromáticos, mitosis atípicas y formación de perlas córneas.

ESTADIO CLINICO: IVB.

TABLA 5

**PRUEBAS DE ANTIDESMOGLEINA (ANTI-DG-1) DE LAS ESTIRPES
CELULARES OBTENIDAS EN CULTIVO**

ESTIRPE CELULAR	RESIEMBRA No.	MORFOLOGIA CELULAR	ANTI-DG-1	CARACTERISTICAS DE LA TINCION
ENO-1	10 15,18	EPITELIAL EPITELIAL	(+) (+)	++++ MEMBRANA ++++ MEMBRANA ++ CITOPLASMA
ENO-2	4	FIBROBL.	(+)	+++ CITOPLASMA NUCL.FIBRI.
CALO (IIB)	4 10,18	MIXTA EPITELIAL	(+) (+)	+++ MEMBRANA ++++ MEMBRANA ++ CITOPLASMA
T3 (IIB)	10	EPITELIAL	(+)	++++ MEMBRANA
CRHE (IIIB)	3 11	FIBROBL. FIBROBL.	(+) (+)	+ MEMBRANA + CITOPLASMA
GEPE (M) (IIIB)	6	FIBROBL.	(+)	++ CITOPLASMA
INBL (IV A)	3,6,9,12 15,18	EPITELIAL	(+)	+/- CITOPLASMA
FESH	4	FIBROBL.	(-)	- MEMBRANA

SIMBOLOGIA:

++++= 100% DE CELULAS TEÑIDAS
 +++= 75% " " "
 ++= 50% " " "
 += 25% " " "
 +/-= 10% " " "
 -= 0% " " "

(M)= METASTASIS

IIB, IIIB, IVA= ESTADIOS CLINICOS DE LOS TUMORES

ser negativa para el anticuerpo en membrana, no obstante hubo un 75% de células teñidas en citoplasma y en los nucleolos donde fue de tipo fibrilar. La estirpe CALO resultó ser positiva en membrana para anti DG-1 en todos los casos. En R-4 el 75% de células fueron teñidas en membrana y no en citoplasma, mientras que en R-10 y en R-18 la estirpe presentó un 100% de tinción en membrana y 50% en citoplasma (Tabla 5).

La estirpe T3 de morfología epitelial mostró en el 100% de las células una tinción muy intensa en membrana. (Tabla 5). La estirpe CRHE evaluada en las resiembras R-3 y R-11 con una morfología fibroblástica presentó en ambos casos una baja tinción con sólo un 25% en membrana en la R-3 y un 25% en citoplasma para la R-11, (Tabla 5).

La estirpe GEPE fue positiva en citoplasma en la R-6, observándose una tinción del 50%, (Tabla 5). Finalmente la estirpe INBL en seis diferentes resiembras presentó muy baja tinción, siendo ésta de únicamente un 10% en el citoplasma (Tabla 5).

Como testigo en este experimento, se tomó una estirpe de fibroblastos humanos (FESH), la cual resultó negativa tanto en membrana como en citoplasma (Tabla 5).

Es interesante mencionar que al observar la tinción del anticuerpo contra desmogleína 1 en las diferentes estirpes tumorales provenientes de CaCu, se encontró una tendencia a la disminución de esta proteína en aquellas provenientes de tumores con estadio clínico más avanzado. Observamos que las células de las estirpes T3 y CALO con estadios clínicos IIB presentaron la mayor positividad, a diferencia de las células de las otras GRHE, GEPE y INBL provenientes de estadios clínicos IIIB, IIIB y IVA respectivamente (Tabla 5).

CINETICAS DE PROLIFERACION DE LAS ESTIRPES CELULARES ESTABLECIDAS

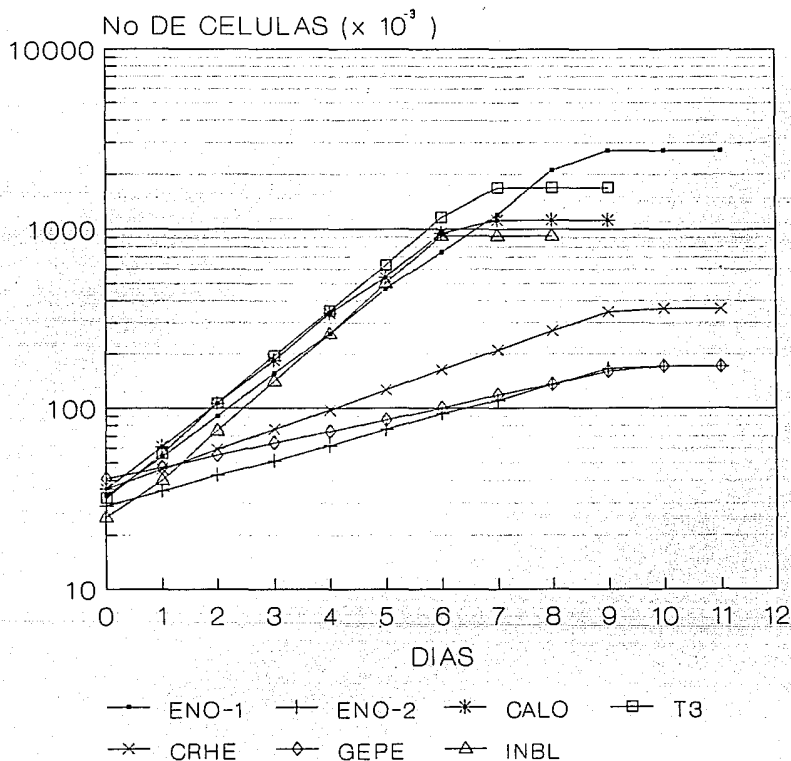
Con el propósito de conocer algunos parámetros cinéticos tales como el tiempo de latencia (TL, tiempo requerido por las células para adaptarse y empezar a proliferar en el cultivo), el tiempo de duplicación celular (TD) y la densidad de saturación celular por área de sustrato del cultivo (DS), se determinaron estas variables a cada una de las 7 estirpes celulares obtenidas.

La estirpe de epitelio normal ENO-1 durante las resiembras 10-12 mostró un TL sumamente corto el cual se estimó entre tres y seis horas de iniciado el cultivo, su TD en fase de proliferación exponencial fue de 22 ± 3 horas y su DS fue de 250 000-300 000 células/cm² (Gráfica 1), (Tabla 6).

Para la estirpe de epitelio normal ENO-2 la evaluación se determinó durante las resiembras 8-10 con

GRAFICA 1

CINETICAS DE PROLIFERACION DE LAS ESTIRPES CELULARES



CINETICAS DE PROLIFERACION DE LAS ESTIRPES DE ORIGEN NORMAL (ENO-1 Y ENO-2), Y DE CACU (CALO, T3, CRHE, GEPE E INBL)

TABLA 6**PARAMETROS CINETICOS DE ESTIRPES CELULARES PROVENIENTES DE
CANCER CERVICO UTERINO Y CERVIX NORMAL**

ESTIRPE CELULAR	MORFOLOGIA CELULAR	TIEMPO LATENCIA (HRS)	TIEMPO DUPLICACION (HRS)	DENSIDAD SATURACION (No. CELx10 ³ /cm ²)
ENO-1	EPITELIAL	3-6	22 +/-3	250-300
ENO-2	FIBROBL.	11-12	89 +/-3	18-25
CALO	EPITELIAL	3-6	25 +/-1	150-200
T3	EPITELIAL	3-6	27 +/-3	150-200
CRHE	FIBROBL.	9-10	65 +/-5	40-50
GEPE	FIBROBL.	15-20	110 +/-10	15-20
INBL	EPITELIAL	3-6	29 +/-3	120-160

un TL estimado entre 11-12 horas, su TD fue de 89 +/- 3 horas y su DS fluctuó entre 18 000-25 000 células/cm² (Gráfica 1), (Tabla 6).

La estirpe tumoral CALO, durante las resiembras 10-12 presentó un TL muy corto estimándose entre las primeras 3-6 horas de cultivo, su TD fue de 25 +/- 1 horas y su DS de 150 000-200 000 células/cm² (Gráfica 1), (Tabla 6).

La estirpe celular T3 también fue una de las que mostró un TL corto, calculándose éste entre las primeras 3-6 horas de su cultivo, su TD se calculó en 27 +/- 3 horas y su DS entre 150 000-200 000 células/cm². (Gráfica 1), (Tabla 6).

Para la estirpe celular CRHE, en las resiembras 6 y 8 se observó un TL entre 9-10 horas, su TD se estimó en 65 +/- 5 horas y su DS entre 40 000-50 000 células/cm² (Gráfica 1), (Tabla 6).

En la estirpe tumoral GEPE en las resiembras 7-8 el TL observado fué de 15-20 horas, el TD de 110 +/- 10 horas y la DS entre 15 000-20 000 células/cm² (Gráfica 1), (Tabla 6).

Finalmente la estirpe celular INBl mostró un TL corto estimado también entre las primeras 3-6 horas del cultivo, su TD se calculó en 29 +/- 3 horas y su DS entre 120-160 000 células/cm², (Gráfica 1), (Tabla 6).

En general encontramos que las estirpes con morfología epitelial mostraron tiempos de latencia y tiempos de doblaje más cortos que las de forma fibroblástica, y que las densidades de saturación de las estirpes con morfología epitelial fueron muy superiores a las presentadas por las de morfología fibroblástica (Tabla 6).

CITOTOXICIDAD DE LINFOCITOS EN CO-CULTIVO CON CELULAS DE LAS ESTIRPES DE CaCu

Con la finalidad de que linfocitos de sangre periférica (LSP) provenientes de donadores sanos reconocieran posibles antígenos tumorales, o antígenos virales asociados a las células tumorales de CaCu, los LSP aislados por la técnica de Ficoll Hypaque fueron sensibilizados mediante co-cultivo con células de las diferentes estirpes celulares durante de dos semanas, tanto en presencia de interleucina-2 recombinante humana (IL-2rh), linfocitos (LS+), como en ausencia de IL-2rh (LS-). Posterior a este período de sensibilización, se ensayó la actividad citotóxica de estas poblaciones linfocitarias sobre la proliferación de las células tumorales contra las cuales fueron sensibilizadas.

Como control citotóxico positivo en estos experimentos también se evaluó la actividad citotóxica de células LAK (obtenidas del cultivo previo de LSP con IL-2rh durante 14 días en ausencia de células tumorales). Asimismo se

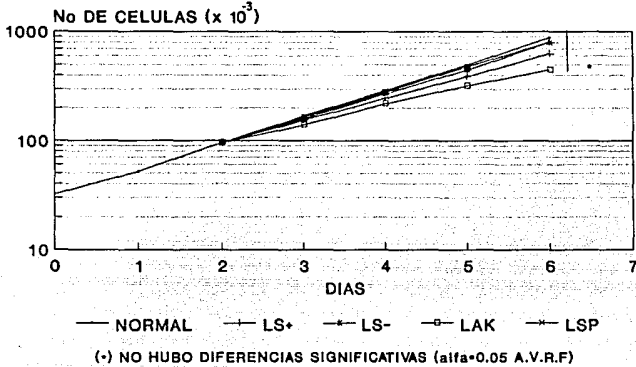
evaluó la citotoxicidad de los LSP sensibilizados con células de la estirpe de cérvix normal ENO-1.

El comportamiento de las ENO-1 en co-cultivo con los linfocitos LS+ mostró muy baja inhibición, siendo ésta inferior al 30% después de 4 días comparada con la proliferación normal (testigo negativo) (Gráficas 2-A y 2-B). Por su parte, los linfocitos LS- no tuvieron un efecto significativo sobre la proliferación de las células ENO-1 en co-cultivo y sólo se logró observar un 10% de inhibición al cabo de 4 días. La población de células LAK, fue la que logró la mayor citotoxicidad, debido a que desde el primer día se observó un 20% y muy cercana al 50% durante el cuarto día del co-cultivo (Gráficas 2-A y 2-B). Finalmente, los LSP no sensibilizados no mostraron efecto alguno sobre la proliferación de las células blanco durante todo el tiempo del co-cultivo. Al comparar el efecto citotóxico producido entre los diferentes ensayos observamos que no mostraron diferencias significativas en la proliferación de las células blanco ($\alpha=0.05$, Anál. Var. Rang. Friedman), (Gráfica 2-A). La citotoxicidad en la estirpe ENO-2 no pudo ser determinada debido a que no se contó con la cantidad suficiente de estas células para llevar a cabo los ensayos.

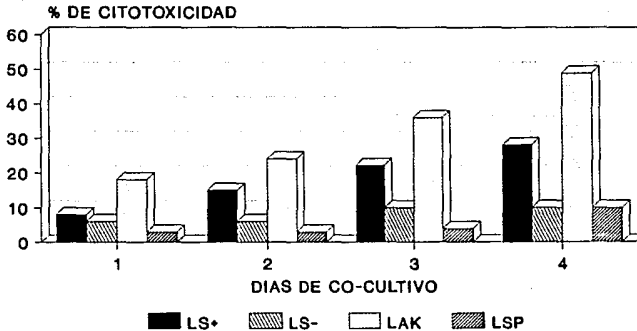
Al evaluar la citotoxicidad de las poblaciones efectoras sobre células de la estirpe tumoral CALO, se observó que los LS+ mostraron una alta inhibición, siendo de 40% al primer día y de 100% a los 4 días de co-cultivo. Los LS- mostraron una citotoxicidad significativamente menor a la producida por los linfocitos LS+ ($\alpha=0.05$, U de Mann Whitney), ya que la inhibición al primer día fue de 25% y finalmente de 85% al cuarto día de co-cultivo. Las células LAK fueron las que mostraron la máxima inhibición, lográndose el 65% al primer día y el 100% al tercer día de co-cultivo (Gráficas 3-A y 3-B). En contraste, los LSP presentaron la menor inhibición sobre la proliferación de las células blanco, obteniéndose un 50% después de 4 días de co-cultivo (Gráficas 3-A y 3-B). La inhibición observada en la proliferación de las células de la estirpe CALO, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha=0.025$, A.V.R.F), (Gráfica 3-A).

Al determinar el efecto citotóxico de las poblaciones efectoras sobre la estirpe tumoral T3, se observó que los linfocitos LS+ mostraron un gran efecto citotóxico, obteniéndose un 70% al primer día y el 100% después del cuarto día de co-cultivo (Gráficas 4-A y 4-B). Los LS- a los primeros dos días inhibieron en un 70%, y finalmente su efecto llegó hasta un 90% a los 4 días y cerca de 100% a los 5 días de co-cultivo, no obstante éste fue significativamente menor al de los linfocitos LS+ ($\alpha=0.025$, U.M.W), (Gráfica 4-A). Las células LAK inhibieron en un 90% a los dos días y en un 100% al tercer día del co-cultivo, mientras que los LSP presentaron la menor inhibición sobre las células de T3, logrando un 55% de citotoxicidad durante 5 días de co-cultivo (Gráficas 4-A y 4-B). La

GRAFICA 2-A INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA ESTIRPE ENO-1

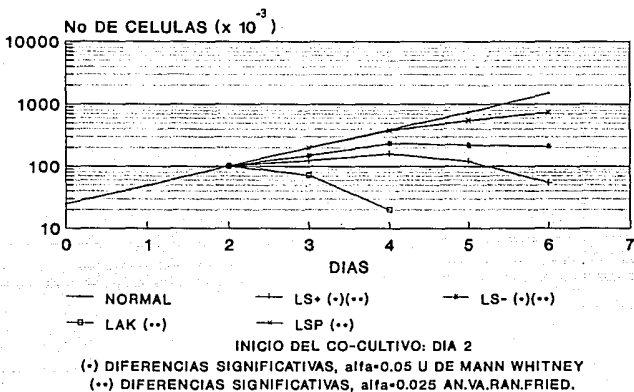


GRAFICA 2-B CITOTOXICIDAD SOBRE CELULAS DE LA ESTIRPE ENO-1

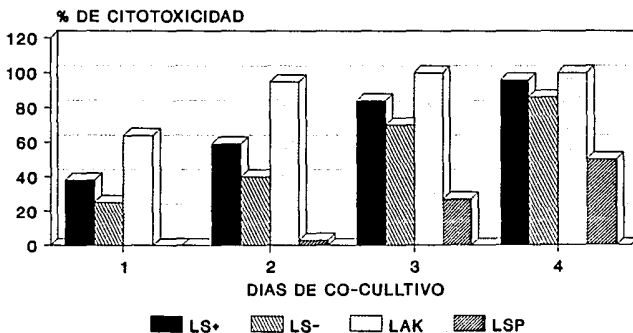


EFFECTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS EN CO-CULTIVO CON CELULAS DE ENO-1 E IL-2rh (LS+) Y SIN IL-2rh (LS-), Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE ENO-1. n = 8

GRAFICA 3-A INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA ESTIRPE CALO

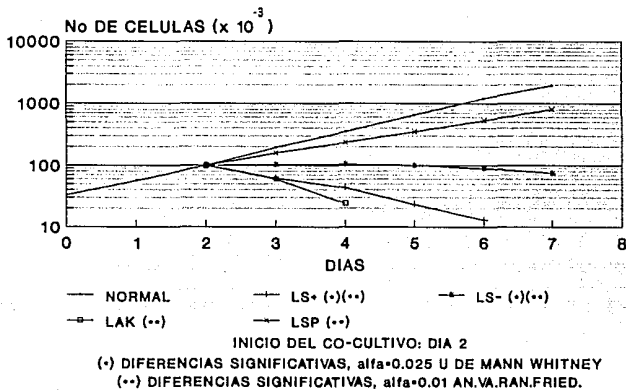


GRAFICA 3-B CITOTOXICIDAD SOBRE CELULAS DE LA ESTIRPE CALO

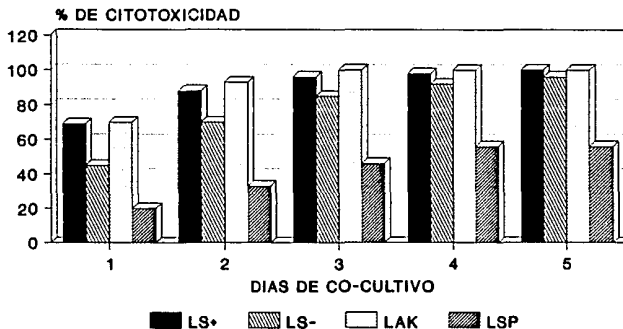


EFEECTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS EN CO-CULTIVO CON CELULAS DE CALO E IL-2rh (LS+) Y SIN IL-2rh (LS-), Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE CALO. n = 8.

GRAFICA 4-A INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA ESTIRPE T3



GRAFICA 4-B CITOTOXICIDAD SOBRE CELULAS DE LA ESTIRPE T3



EFEECTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS EN CO-CULTIVO CON CELULAS DE T3 E IL-2rh (LS+) Y SIN IL-2rh (LS-), Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE T3. n= 8.

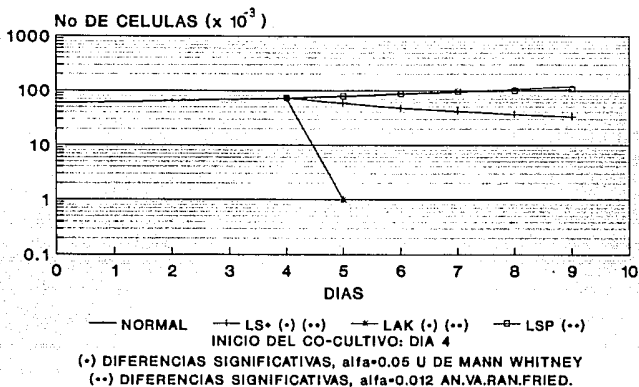
inhibición de la proliferación de las células de la estirpe T3, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha=0.01$, **A.V.R.F**), (Gráfica 4-A).

En la estirpe CRHE encontramos que los linfocitos LS+ mostraron una actividad inhibitoria de aproximadamente un 40% a los primeros dos días y de un 70% al quinto día de co-cultivo (Gráficas 5-A y 5-B). Para esta estirpe no fue posible determinar el efecto de linfocitos LS- debido a que se contaminaron con bacterias. Sin embargo las células LAK mostraron un gran efecto citotóxico prácticamente desde el inicio de el co-cultivo, eliminando a las células blanco en un 100% durante el primer día (Gráficas 5-A y 5-B). La inhibición producida por los LS+ difirió significativamente de la producida por las LAK ($\alpha=0.05$, **U.M.W**). Por su parte los LSP, sólo produjeron una inhibición de 30% después de 6 días, (Gráficas 5-A y 5-B). La inhibición de la proliferación de las células de la estirpe CRHE, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha=0.012$, **A.V.R.F**), (Gráfica 5-A).

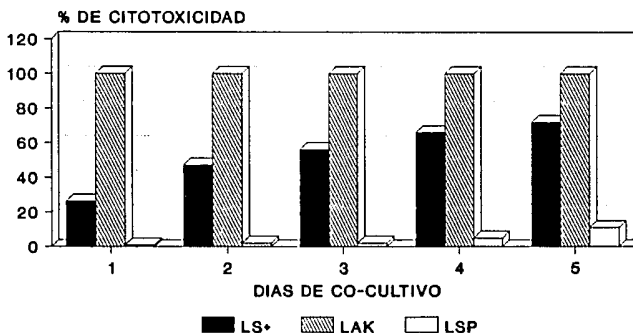
En la estirpe tumoral GEPE, el efecto inhibitorio de los linfocitos LS+ fue muy bajo al inicio del co-cultivo con 20% durante los primeros dos días, y finalmente llegó hasta un 90% a los cinco días de co-cultivo (Gráficas 6-A y 6-B). Tampoco en este ensayo se evaluó el efecto de linfocitos LS-, debido también a contaminación. La población de las células LAK mostró el mayor efecto inhibitorio, ya que éste llegó al 100% durante el primer día de co-cultivo. La citotoxicidad de las LAK fue significativamente diferente a la mostrada por los linfocitos LS+ ($\alpha=0.05$, **U.M.W**). Por su parte, los LSP sólo lograron un 20% de citotoxicidad sobre las células blanco a los 5 días de co-cultivo (Gráficas 6-A y 6-B). La inhibición observada en la proliferación de las células de la estirpe GEPE, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha=0.012$, **A.V.R.F**), (Gráfica 6-A).

Finalmente, en la estirpe INBL los linfocitos LS+ inhibieron en un 100% a todas las células blanco a partir del primer día de co-cultivo (Gráficas 7-A y 7-B). Los LS- presentaron una citotoxicidad significativamente menor que la producida por los linfocitos LS+ ($\alpha=0.025$, **U.M.W**), ya que inhibieron en un 40% durante el primer día y hasta un 90% hasta el cuarto día de co-cultivo (Gráficas 7-A y 7-B). Las células LAK inhibieron en un 80% a las células blanco durante el primer día y a un 100% al segundo día de co-cultivo. Mientras que los LSP produjeron un 60% de inhibición después de cuatro días de co-cultivo (Gráficas 7-A y 7-B). La inhibición de la proliferación de las células de la estirpe INBL, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha=0.05$, **A.V.R.F**), (Gráfica 7-A).

GRAFICA 5-A INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA ESTIRPE CRHE



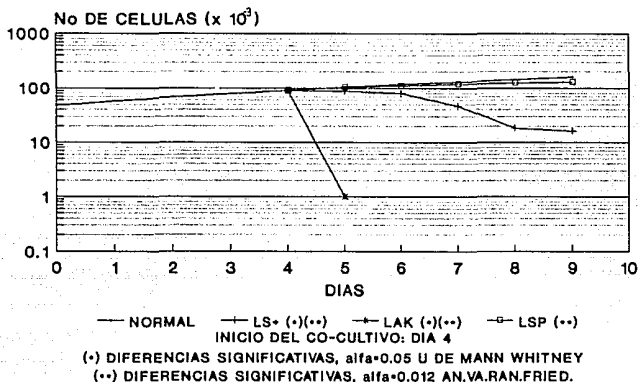
GRAFICA 5-B CITOTOXICIDAD SOBRE CELULAS DE LA ESTIRPE CRHE



EFEECTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS EN CO-CULTIVO CON CELULAS DE CRHE E IL-2rh (LS+) Y SIN IL-2rh (LS-), Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE CRHE. n = 8.

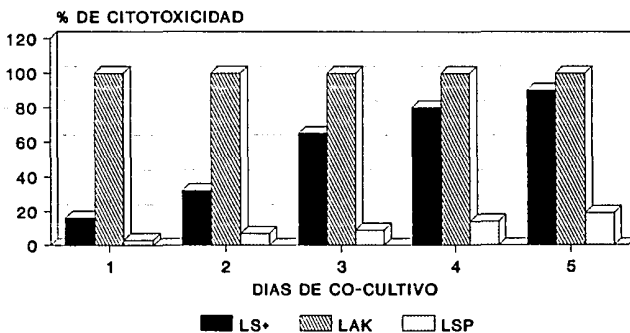
GRAFICA 6-A

INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA ESTIRPE GEPE



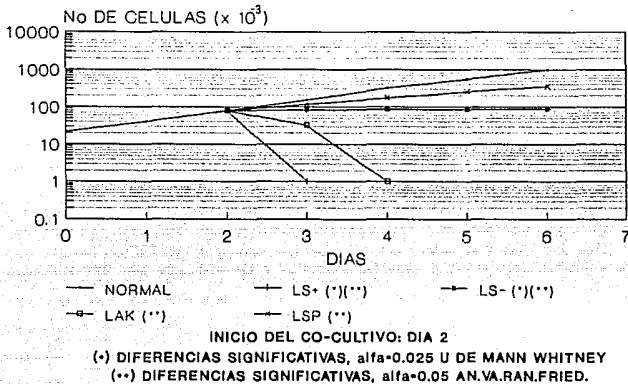
GRAFICA 6-B

CITOTOXICIDAD SOBRE CELULAS DE LA ESTIRPE GEPE

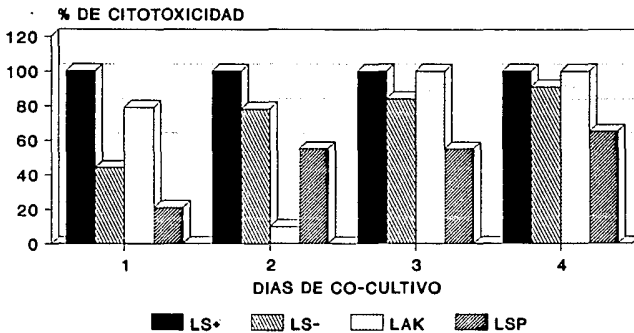


EFFECTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS EN CO-CULTIVO CON CELULAS DE GEPE E IL-2rh (LS+) Y SIN IL-2rh (LS-), Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE GEPE. n= 8.

GRAFICA 7-A INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA ESTIRPE INBL



GRAFICA 7-B CITOTOXICIDAD SOBRE CELULAS DE LA ESTIRPE INBL



EFEECTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS EN CO-CULTIVO CON CELULAS DE INBL E IL-2rh (LS+) Y SIN IL-2rh (LS-), Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE INBL. n= 8.

PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DE LINFOCITOS SENSIBILIZADOS CON LAS ESTIRPES DE CaCu

Con la finalidad de verificar si las poblaciones LS+s (L-CALO, L-T3, L-CRHE, L-GEPE Y L-INBL) tenían actividad citotóxica específica sobre las células contra las cuales habían sido estimuladas, se ensayó su citotoxicidad sobre la proliferación de células de una línea tumoral proveniente de un carcinoma de laringe (HEP). En estos experimentos, también se ensayó la citotoxicidad de linfocitos sensibilizados con la línea celular en prueba (L-HEP), y la de las células LAK.

Los L-CALO inhibieron en un 50% a las células HEP durante el primer día y finalmente en un 100% a los 4 días de co-cultivo (Gráficas 8-A y 8-B). La citotoxicidad de los linfocitos L-HEP no difirió significativamente de la mostrada por los linfocitos L-CALO ($\alpha=0.05$, U.M.W), ni de la producida por las células LAK ($\alpha=0.05$, U.M.W), (Gráfica 8-A). La inhibición de la proliferación de las células de la línea HEP, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha=0.039$ A.V.R.F), (Gráfica 8-A).

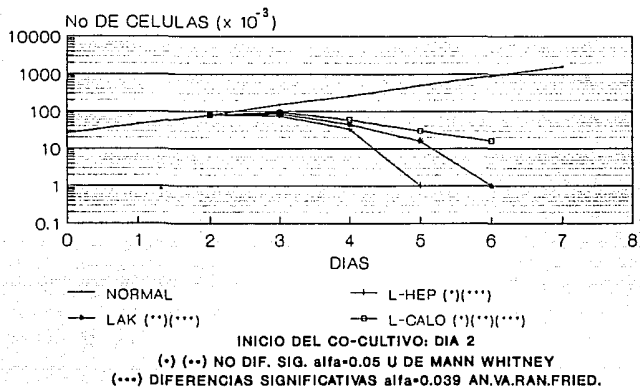
Al evaluar el efecto citotóxico de linfocitos L-T3 sobre la proliferación de las células HEP también se observó un alto efecto inhibitorio, siendo éste del 40% al primer día y de 90% al cuarto día del co-cultivo (Gráficas 9-A y 9-B). Por su parte, los L-HEP mostraron una citotoxicidad muy similar a la de los linfocitos L-T3 ($\alpha=0.05$, U.M.W), mientras que las células LAK en este caso presentaron una inhibición mayor a la producida por L-T3 y L-HEP ($\alpha=0.05$, U.M.W). La inhibición de la proliferación de las células de la línea HEP, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha=0.039$, A.V.R.F), (Gráfica 9-A).

Al evaluar la citotoxicidad de los linfocitos L-CRHE sobre la línea HEP, no se observó un efecto inhibitorio tan marcado como en los casos anteriores, dado que fue del 70% hasta después del cuarto día de co-cultivo (Gráficas 10-A y 10-B). La citotoxicidad producida por linfocitos L-HEP fue mayor a la originada por los L-CRHE ($\alpha=0.025$, U.M.W), ya que los L-HEP inhibieron en un 45% en el primer día y en un 100% al cuarto día. Las células LAK también produjeron un efecto inhibitorio mayor al de los L-CRHE ($\alpha=0.025$, U.M.W), llegando a un 100% a los 4 días, el cual fue muy similar al producido por la población L-CRHE. (Gráficas 10-A y 10-B). Finalmente, la inhibición de la proliferación de las células de la línea HEP, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha=0.039$, A.V.R.F), (Gráfica 10-A).

Cuando se evaluó la citotoxicidad de linfocitos L-GEPE sobre células de la línea HEP, se encontró un 40% de inhibición a los dos días y un 80% al cuarto día (Gráficas 11-A y 11-B). Las poblaciones L-HEP y LAK, presentaron citotoxicidad muy similar, alcanzando el 100% al cuarto día

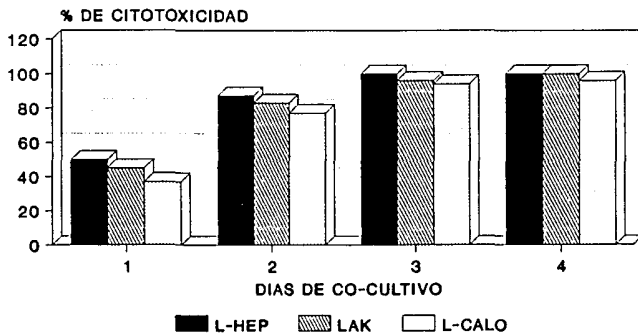
GRAFICA 8-A

INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA HEP POR L-CALO



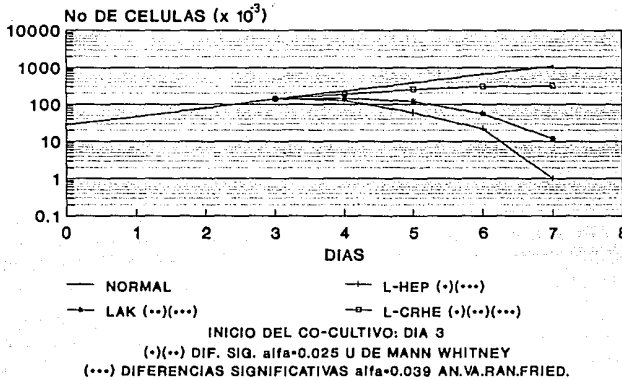
GRAFICA 8-B

CITOTOXICIDAD DE L-CALO SOBRE CELULAS DE LA LINEA HEP

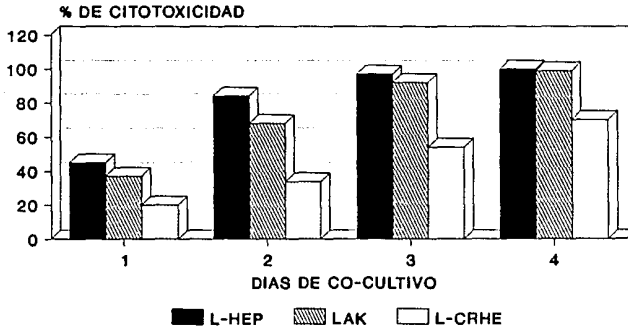


EFFECTO DE LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS CON CALO E IL-2rh (L-CALO), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS CON LA LINEA HEP E IL-2rh (L-HEP) Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE LA LINEA HEP. n= 8

GRAFICA 10-A INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA HEP POR L-CRHE



GRAFICA 10-B CITOTOXICIDAD DE L-CRHE SOBRE CELULAS DE LA LINEA HEP



EFFECTO DE LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS CON CRHE E IL-2rh (L-CRHE), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS CON LA LINEA HEP E IL-2rh (L-HEP) Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE LA LINEA HEP. n = 8.

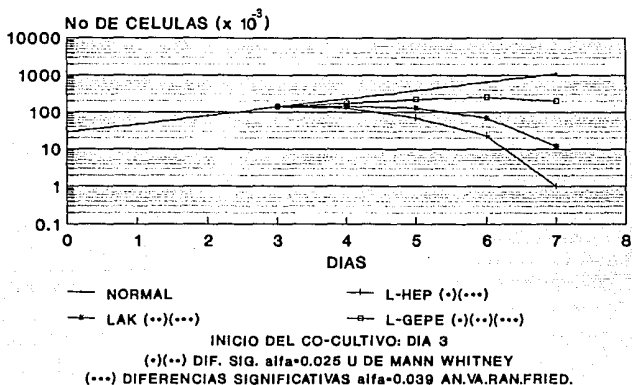
del co-cultivo. Por otra parte, el efecto inhibitorio de L-HEP fue mayor al producido por los L-GEPE, ($\alpha = 0.025$, U de Mann Whitney). Asimismo al comparar el efecto de LAK contra el de L-GEPE también se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.025$, U.M.W), (Gráficas 11-A y 11-B). La inhibición de la proliferación de las células de la línea HEP, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha = 0.039$, A.V.R.F), (Gráfica 11-A).

Por último, al evaluar la actividad citotóxica de los linfocitos L-INBL sobre la proliferación de las células HEP, se encontró un 60% de inhibición hasta después del cuarto día de co-cultivo. Por su parte, los linfocitos L-HEP mostraron una inhibición mayor que la de los L-INBL ($\alpha = 0.025$, U.M.W) ya que desde el primer día produjeron un 40% de citotoxicidad, la cual llegó hasta un 90% al cuarto día. En contraste a éstos, la población LAK mostró la máxima citotoxicidad debido a que en el segundo día del cultivo lisaron completamente a las células blanco. Al comparar el efecto inhibitorio de las células LAK con el de los linfocitos L-INBL, también se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.025$, U.M.W) (Gráficas 12-A y 12-B). La inhibición de la proliferación de las células de la línea HEP, fue significativamente diferente entre los ensayos realizados ($\alpha = 0.039$, A.V.R.F), (Gráfica 12-A).

Finalmente, es importante mencionar que en los ensayos de citotoxicidad, los linfocitos que fueron sensibilizados con las estirpes de CaCu de estadios clínicos más avanzados (L-CRHE, L-GEPE y L-INBL), mostraron una menor citotoxicidad sobre las células HEP que aquellos que fueron sensibilizados con células de las estirpes de CaCu de estadios clínicos menos avanzados (L-CALO y L-T3), (Gráficas 8-12).

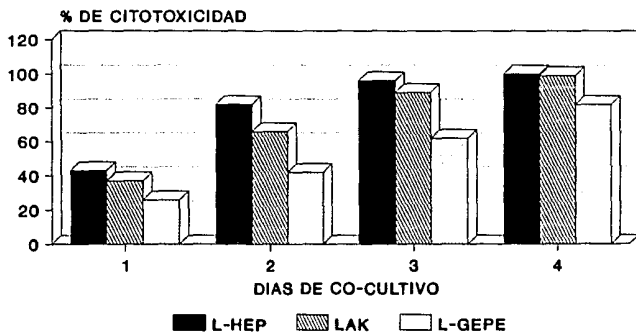
GRAFICA 11-A

INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA HEP POR L-GEPE



GRAFICA 11-B

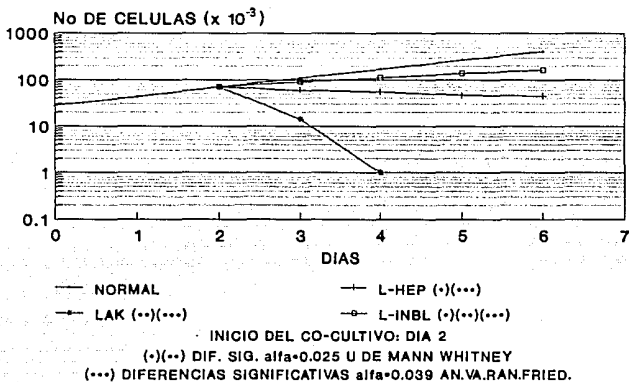
CITOTOXICIDAD DE L-GEPE SOBRE CELULAS DE LA LINEA HEP



EFFECTO DE LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS CON GEPE E IL-2rh (L-GEPE), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS CON LA LINEA HEP E IL-2rh (L-HEP) Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE LA LINEA HEP. n= 8.

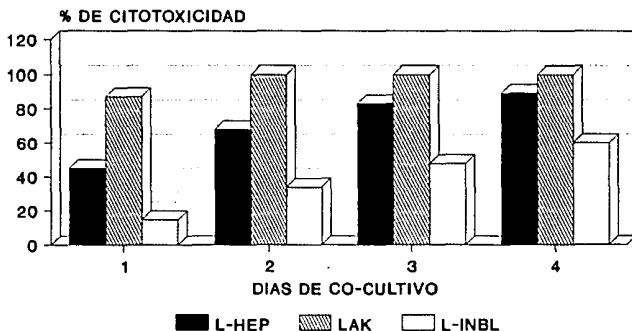
GRAFICA 12-A

INHIBICION EN LA PROLIFERACION DE LA LINEA HEP POR L-INBL



GRAFICA 12-B

CITOTOXICIDAD DE L-INBL SOBRE CELULAS DE LA LINEA HEP



EFEECTO DE LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS CON INBL E IL-2rh (L-INBL), LINFOCITOS PRESENSIBILIZADOS CON LA LINEA HEP E IL-2rh (L-HEP) Y DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON IL-2rh (LAK) SOBRE LA PROLIFERACION DE LA LINEA HEP. n= 8.

DISCUSION DE RESULTADOS

El establecimiento de estirpes celulares humanas y su mantenimiento durante tiempos prolongados en cultivo, siempre ha presentado cierto grado de dificultad debido a los métodos disponibles para ello. En el caso especial de carcinoma cérvico uterino (CaCu), se han implementado varias metodologías, entre las cuales destacan el cultivo en agar, así como los cultivos sobre capas celulares de tejido conectivo, lográndose en éstos últimos eficiencias de hasta 30% de las muestras procesadas, asimismo la duración máxima de sus cultivos ha sido hasta de 22 pasajes seriados (13, 29-30). Bajo nuestras condiciones, el empleo de cuatro métodos cultivo permitió la obtención de células viables en un 40% de las biopsias trabajadas (26 de 65 muestras), no obstante sólo 7 estirpes celulares se lograron llevar a más de 10 resiembras y actualmente 3 de ellas han rebasado las 30 resiembras. Consideramos, que la contaminación inherente a la zona en donde se desarrolla el tumor es uno de los factores que reduce significativamente el número de cultivos viables, además de que su infiltración en los tejidos dificulta grandemente su eliminación aún con antibióticos a altas concentraciones.

Por otra parte, es importante considerar que la necrosis celular que presentaban algunas muestras de tejido, también fue un factor importante en la viabilidad de las células en cultivo, causa por lo cual muchas de ellas difícilmente se mantuvieron en proliferación celular por varias semanas. Asimismo, también es importante tomar en cuenta el método de cultivo utilizado durante el procesamiento de las biopsias, debido que al emplear métodos mecánicos como el de explante, o como el de disgregación mecánica se evita un mayor daño a las células y por lo tanto mantienen una mayor viabilidad celular con respecto a los métodos enzimáticos que además de disgregar la matriz extracelular, en ocasiones dañan a las membranas celulares (17,26).

Por otro lado, las diferencias citopatológicas entre las células provenientes del tejido normal y del tejido tumoral permitieron diferenciar a uno de otro. En nuestro caso todas las estirpes celulares provenientes de CaCu presentaron características típicas de células malignas, tales como núcleos celulares grandes que perdían la relación núcleo:citoplasma, así como un elevado número de mitosis y la presencia de varios nucleolos sobreteñidos (168-169).

En las estirpes establecidas se observó una heterogeneidad morfológica, la cual parece no depender de la técnica empleada para su obtención debido a que en los cuatro métodos empleados se obtuvieron diferentes morfologías, sino más bien parece estar relacionada con

la capa celular derivada del epitelio multiestratificado que caracteriza al tejido cervical, el cual además muestra un alto grado del pleomorfismo celular (168-170). Aunado a esto, el mantener células en cultivo nos permite de cierta forma inducir la proliferación de las células in vitro, y en consecuencia inducir la proliferación de la(s) forma(s) celular(es) predominante(s) en el cultivo (169).

Cabe destacar que a pesar de todos los problemas metodológicos derivados en la obtención y establecimiento de las estirpes celulares, consideramos de gran importancia el seguir manteniendo 3 estirpes celulares de CaCu en cultivo in vitro, debido a su posterior utilidad en futuros estudios con células de este tipo tumoral.

Los desmosomas son estructuras subcelulares que unen a las células epiteliales y que se encuentran de manera abundante en epitelios sometidos a tensión mecánica como ocurre en la piel, el cérvix uterino y la vejiga (40-41), asimismo la adhesión intercelular proporcionada por estas estructuras es mediada por el entrecruzamiento de las moléculas desmosómicas que se colocan paralelamente a las membranas plasmáticas (47-47). La desmogleína-1 (DG-1) además de ser un componente importante en la organización y estabilidad de las uniones celulares, es una molécula desmosomal que presenta una microheterogeneidad antigénica, lo que ha permitido la fabricación de anticuerpos monoclonales para señalar la existencia de isotipos de esta molécula que están relacionados con la adherencia celular (57-59). Por tal motivo, la técnica de inmunofluorescencia fue empleada para determinar el origen epitelial de las células de las estirpes obtenidas, debido a que entre éstas se habían obtenido dos tipos morfológicamente diferentes.

El empleo de la técnica de inmunofluorescencia para DG-1, nos permitió caracterizar el origen epitelial de las estirpes estudiadas, por el hecho de que todas ellas tuvieron positividad al anticuerpo tanto en membrana como en citoplasma independientemente de su morfología celular observada. Sin embargo, las estirpes celulares de morfología fibroblástica a pesar de que presentaron bajos porcentajes de tinción con el anticuerpo en membrana, mostraron un patrón de tinción citoplasmática en forma de gránulos sobretodo alrededor del núcleo. Este comportamiento puede deberse a dos aspectos principales: primero, las células de morfología fibroblástica no formaban las colonias o grupos de células típicas de "calle empedrada" que caracterizan a los epitelios en cultivo, y sólo crecían de forma semiaislada, lo que en principio no permitiría la unión intercelular y en consecuencia la expresión de la DG-1 en la membrana citoplásmica; y segundo, la detección de la proteína DG-1 en la región perinuclear obedece a que la mayor parte de este material corresponde posiblemente a vesículas endocíticas conteniendo

proteínas desmosómicas, las cuales para ser detectadas se requirió de la "permeabilización" de las membranas celulares con la solución de metanol:acetona, para que el anticuerpo pudiera tener acceso a los epítopes de la DG-1 en la placa desmosomal (59).

Otro aspecto importante observado en nuestros resultados, fueron las diferencias entre la concentración de DG-1 en las células de las estirpes provenientes de tumores, ya que en aquellas que derivaron de tejido con estadio clínico avanzado (CRHE y GEPE de III B e INBL de IVA) mostraron menores porcentajes de marcaje del anticuerpo anti-DG-1 con respecto a las estirpes provenientes de tejido tumoral de estadio clínico menos avanzado (CALO y T3 de IIB), aun así cuando la morfología entre ellas fue diferente. Este fenómeno puede estar relacionado con las propiedades metastásicas de las células, ya que se ha observado que en tumores de origen epitelial que están en la fase inicial de su crecimiento, muestran desmosomas que mantienen unidas a las células neoplásicas; pero cuando hay pérdida de desmosomas de manera funcional o estructural, las células suelen separarse con mayor facilidad de la masa tumoral, originándose células metastásicas (43). En consecuencia, sería de gran interés el corroborar dicha relación en este tipo de neoplasia ya que nos permitiría contar con una herramienta útil para diferenciar las propiedades biológicas de cada tumor, mejorando su diagnóstico y por lo tanto adecuándolo hacia un mejor tratamiento.

El conocer los parámetros cinéticos de los tumores ha tenido como consecuencia varias implicaciones importantes, tales como el entendimiento de la historia natural del tumor, el establecimiento de un método terapéutico, así como dar un valor pronóstico en la cura del tumor (31-35). En nuestro estudio, se establecieron algunos parámetros cinéticos de las células de las estirpes tanto de tejido de cérvix normal como de carcinoma cérvico-uterino, entre los dos tipos morfológicos identificados (fibroblástico y epitelial) existieron diferencias muy marcadas en su comportamiento in vitro; los de morfología epitelial presentaron menores TL y TD que los presentados por las estirpes de forma fibroblástica, asimismo las DS de los epiteliales fueron mayores a la de los fibroblásticos. Esto nos hace sugerir que al cultivar tejido cervical in vitro, podemos mantener dos tipos celulares morfológicamente diferentes, con propiedades diferentes tanto en el tejido normal como en el tumoral. Ahora bien, es muy probable que los TL y TD obtenidos para las estirpes en estudio estén influenciadas por la proporción de células proliferantes y consecuentemente por la tasa de proliferación celular que a su vez está relacionada con el ciclo celular y la información genética propia (32), puesto que las estirpes con morfología fibroblástica llegaron a un menor número

de resiembras que aquellas de morfología típica epitelial.

Es conocido que el tiempo de doblaje de una estirpe celular in vitro está relacionado con su grado de diferenciación, de tal forma que a mayor diferenciación la proliferación tiende a disminuir, mientras que cuando se presenta una desdiferenciación ésta conduce a una mayor proliferación (62). Por tanto, consideramos que el hecho de que las cinéticas de proliferación de las distintas estirpes celulares estudiadas mostraran una gran heterogeneidad (de 24 hrs para CALO hasta 110 hrs para GEPE), puede deberse a que entre ellas existe un grado de diferenciación distinto, independientemente de sus diferencias morfológicas.

Varios investigadores han reportado la obtención de linfocitos citotóxicos específicos hacia células de tumor autólogo, mediante el cultivo de leucocitos de sangre periférica con células del tumor autólogo en cultivos denominados MLTC (Mixed Lymphocyte Tumor Culture) y su activación con el factor de crecimiento de linfocitos T ó Interleucina-2 IL-2 (150-157, 171). Asimismo tal citotoxicidad ha sido altamente específica y restringida por antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, sugiriéndose que es mediada por linfocitos T citotóxico específicos (LTC) que son diferenciados como resultado de un reconocimiento específico (131, 172-175). Por otro lado, mencionaremos que la técnica de MLTC ya se ha empleado para inducir la selección de clones de células T que responden a antígenos asociados al tumor (176-183), de tal manera que varios modelos (autólogos y heterólogos) se han establecido con la finalidad de estimular a las células efectoras de manera específica (184-188).

En nuestro estudio se emplearon linfocitos de sangre periférica (LSP) de donadores normales como células efectoras y las células de carcinoma cérvico-uterino (CaCu) como células estimuladoras. El posible reconocimiento de los LSP sobre células de CaCu se esperaba, por una parte por la etiología viral del CaCu a la cual se han asociado antígenos virales (como el Papilloma virus del tipo 16 (HPV-16) y 18 (HPV-18) así como el Herpes virus y Citomegalovirus (69, 71, 75, 78, 80, 82, 88, 189-195)), por otra parte por la participación de varias subpoblaciones efectoras de linfocitos capaces de reconocer antígenos asociados a células tumorales, dentro de las cuales podemos considerar a los LTC (en los que se ha demostrado gran diversidad fenotípica y funcional, desde aquellos que se restringen a antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (125, 127, 131, 181), así como aquellos que han mostrado reactividad cruzada a tumores del mismo tipo histológico y de diferentes tumores (184-188)), y finalmente a aquellas subpoblaciones efectoras que son semejantes a las células asesinas naturales y que tienen la capacidad de adherirse a células tumorales que

muestran alteraciones en membrana, y que no se restringen al CMH (196-199).

Es interesante mencionar que al evaluar la citotoxicidad ejercida por las diferentes subpoblaciones de linfocitos mediante la inhibición de la proliferación de seis estirpes celulares (1 normal y 5 provenientes de tumor), encontramos diferencias significativas. En efecto observamos que las poblaciones sensibilizadas previamente en co-cultivos MLTC tanto en presencia como en ausencia de IL-2 recombinante humana (IL-2rh), (LS+ y LS- respectivamente) mostraron mayor citotoxicidad sobre las células blanco, que aquellas que no fueron previamente estimuladas. Esta diferencia en citotoxicidad indica que muy probablemente durante la sensibilización los linfocitos LS+ y LS- llevaron a cabo el reconocimiento de algún antígeno en las células blanco. Es conveniente agregar que los linfocitos LS+ siempre mostraron mayor citotoxicidad que los LS-. Este resultado era de esperarse pues es conocido el papel importante de activación a la citotoxicidad ejercido por la IL-2.

Es conveniente hacer notar, que la actividad de las células LAK en las estirpes tumorales fue mucho mayor que en la estirpe normal, tal comportamiento ilustra el hecho conocido de que las células LAK no interaccionan con células normales por carecer éstas de neoantígenos o de antígenos tumorales. En consecuencia creemos que las diferencias encontradas en la inhibición de la proliferación tanto de células provenientes de tumores de CaCu como de células normales, se deba a neoantígenos expresados en dichas células.

Como era de esperarse en la mayoría de las estirpes de CaCu (cuatro de las cinco), las células LAK fueron más efectivas en lisar a las células blanco que los LS+, sin embargo en interesante señalar que en las estirpes de proliferación más lenta (CRHE y GEPE) esta actividad fue mayor. En efecto se redujo el período para lisis total de entre 3 y 2 días a sólo 1 día de co-cultivo. Consideramos estas diferencias en citotoxicidad se deban por una parte a lo ya conocido sobre el hecho de que en presencia de IL-2 las células LAK mantienen una citotoxicidad altamente inespecífica y no restringida a antígenos del CMH y por otra, en resultados previos obtenidos por nuestro grupo (200), en el cual hemos encontrado que la actividad de LAK sobre células provenientes de biopsias tumorales mantienen un mayor grado de inhibición sobre las células con mayor tiempo de doblaje que en las de menor.

Ahora bien si tomamos en consideración que dentro de las poblaciones LS+ pudieran existir tanto LTCs como células LAK (debido a que todos los LPS fueron activadas en presencia de IL-2), entonces se esperaría que la citotoxicidad generada por las LS+ fuera superior a la efectuada sólo por LAK. Sin embargo ésta fue menor en la mayoría de los casos lo que creemos se deba al tipo de técnica de co-cultivo empleada, ya que los subcultivos se efectuaban en nuevas cajas de petri

eliminando a todas las células adheridas a los cultivos precedentes que generalmente son las células LAK. No obstante, en uno de nuestros ensayos (en la estirpe INBL), encontramos que una mayor actividad citotóxica fue obtenida con los LS+ que con LAK, ésto nos ilustra el caso ideal que se busca encontrar con la metodología utilizada, en donde tratamos de obtener linfocitos citotóxicos específicos hacia las células tumorales. En consecuencia consideramos que para la INBL si pudimos generar células efectoras contra antígenos asociados a células de CaCu.

Según lo ya establecido de la incapacidad de la población LAK de interactuar a células normales cabe mencionar que aunque leve en nuestros resultados encontramos cierta citotoxicidad contra la estirpe normal (ENO-1). Sin embargo consideramos que dicha citotoxicidad pueda ser atribuida al posible reconocimiento de antígenos del CMH entre los grupos celulares confrontados. Por el momento no contamos con datos suficientes del tipo de CMH de los pacientes y de los donadores de LSP y por tanto no podemos determinar si el diferente grado de inhibición a la proliferación encontrada con las estirpes celulares sea por diferencias en sus CMH.

Otro aspecto de llamar la atención, fue el hecho de que en los diferentes ensayos las poblaciones de LSP sin activación presentaron una ligera inhibición de la proliferación de las estirpes tumorales de CaCu. Consideramos que esta leve citotoxicidad se deba a que dentro de toda población leucocitaria existen células con capacidad asesina natural, o sea células que por sí solas reconocen antígenos en la superficie de las células blanco.

El haber encontrado en este trabajo que los linfocitos sensibilizados con estirpes provenientes de tumores con estadio clínico más avanzado fueran menos inespecíficos durante la lisis, nos sugere que las estirpes de CaCu en estadio clínico más avanzado son más inmunogénicas y por tanto más susceptibles de ser reconocidas por los linfocitos. En consecuencia podríamos suponer que los tumores más avanzados y en los cuales las terapias existentes en la actualidad no sean suficientemente efectivas, la terapia de inmunología adoptiva sea una alternativa viable.

Finalmente mencionaremos que en nuestro estudio al emplear un modelo heterólogo nos indica que es posible sensibilizar linfocitos de donadores normales con células tumorales de CaCu, lo cual evitaría tener que sangrar al paciente como hasta ahora se hace en este tipo de terapias. Asimismo consideramos que las células efectoras así obtenidas pueden tener gran utilidad clínica si se emplean muestras sanguíneas con LSP histológicamente compatibles con las células tumorales, evitando de esta manera rechazos inmunes asociados a diferentes CMH. No hay que dejar de lado el hecho de que con un número bastante pequeño de leucocitos

se puede generar suficientes células efectoras en un tiempo relativamente corto.

Es evidente que las interpretaciones de aplicación clínica hasta aquí vertidas se basan en la suposición de que el comportamiento in vitro sea semejante al que se presenta in vivo y es obvio ésto se tiene que demostrar antes de poder proceder a una aplicación en el ser humano. Sin embargo creemos que nuestros resultados apuntan en esta dirección. Además muchos tumores más tendrán que ser analizados y con diversos LSP para poder generalizar nuestros resultados.

CONCLUSIONES

1.- Se obtuvieron siete estirpes celulares; cinco a partir de biopsias de tumores de cáncer cérvico-uterino y dos de epitelio de cérvix normal. Asimismo se encontraron dos diferentes morfologías entre éstas: la típica epitelial y la fibroblástica.

2.- La morfología celular observada entre las estirpes, fue independiente del método utilizado para su obtención.

3.- Las estirpes celulares obtenidas mostraron positividad al anticuerpo policlonal (ANTIDESMOGLEINA-1) independientemente de la morfología celular que presentaron, confirmando así su origen epitelial.

4.- La expresión diferencial de la desmogleína (DG-1) encontrada en membrana celular de células tumorales de CaCu, nos puede proporcionar información acerca del grado de avance tumoral.

5.- Las estirpes celulares con morfología celular fibroblástica presentaron mayores tiempos de latencia y tiempos de doblado, así como menores densidades de saturación con respecto a las estirpes celulares con morfología epitelial.

6.- La citotoxicidad de los linfocitos presensibilizados durante 14 días con células de estirpes de CaCu en presencia de IL-2rh mostraron una actividad citotóxica significativamente mayor que linfocitos sensibilizados en ausencia de IL-2rh así como de aquellos sin sensibilizar.

7.- Las células provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino de estadios clínicos más avanzados fueron lisadas se forma más específica que aquellas de estadios clínicos menos avanzados.

8.- La técnica de co-cultivo de células provenientes de tumores de CaCu con linfocitos de sangre periférica en presencia de IL-2rh, permite sensibilizar a linfocitos de manera citotóxico-específica contra las células tumorales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Paul, J. 1973. Cell y Tissue Culture. Ed: Churchill Livingstone. G. B. pp:430.
- 2) Carrel, A. 1931. The New Citology. The Rockefeller Institute for Medical Res. 73:297-303
- 3) Parker, R.C. 1961. Methods of Tissue Culture. Ed. Churchill livingstone, G.B. pp:430.
- 4) Paul, J. 1973. Cell and Tissue Culture. Ed:Churchill Livingstone, G.B. pp:430.
- 5) Fisher, G. G., y Weiser, R.J. 1983. Hormonally Defined Media. Ed: Springer-Verlag. Berlin Hedilberg, Germany. pp:455.
- 6) Sigma, Cell Culture reagents. 1986. Powdwred Media for Serum-Free Cultures. The Source. Sigma Chemical Company. 2(4).
- 7) Morgan, J.E., 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 Canada. 73:1-8.
- 8) Lehninger, A.L. 1981. Bioquímica. Ed: Omega. Barcelona España. pp:752.
- 9) Adams, R.L.P. 1980. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Ed:esevier North Holland Biomedical Press. New York. U.S.A. pp:430.
- 10) Sato, G.H. 1982. Cell Culture and Physiology Acad. New York. U.S.A. pp:45-52.
- 11) Sato, G.H. 1983. Divining the Role of serum in Cell Culture. In: Hormonally Defined Media. Edited by Fisher, G., Weiser, R.J. Ed:Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp:2-3.
- 12) Ham, R. G. 1983. Growth of Normal Human Cells in Defined Media. Edited by Fisher, G., Weiser, R.J. Ed:Springer-Verelag. Berlin, Germany. pp:16-30.
- 13) Vasiliev, J. M., y Gelfand, I.M. 1981. Neoplastic and Normall Cells in Culture. Cambridge. Univ. Press. Great Britain. pp:372.
- 14) Ham, R.G., y McKeehan, W.L.. 1979. Media and Growth Requirements Methods Enzymol. 58:44-93.
- 15) Orly, J., Sato, G.H., y Erikson, G.F. 1980. Serum Suppresses the Expression of Hormonally Induced Functions in Cultured Granullosa Cells. 20:817-827.
- 16) Barnes, D.W. 1987. Serum-Free Animal Cell Culture. Biotechniques 5:534-541.
- 17) Norman, J.T., y Fine, L.G. 1989. Regulation of Epithelial Cell Growth in vitro Functional Epithelial Cells in Culture:165-191.
- 18) Sato, G., y Ross. R. 1979. Hormones and Cell Culture. Cold Spring Harbor. N Y. Col Spring Harbor Press. pp:2-3
- 19) Delwichi, E.F. Raines, E., y Powell, J. 1985. Platelet-Derived Growth Factor Enhaces in vitro Erythropoiesis via Stimulation of Mesenchimal Cells. J Clin Invest 76:137-14.

- 20) Keskkioja, J., Loef, E.B., Lyons, R.M., Coffey, R.J., y Mosesw, H.L. 1987. Transforming Growth Factors and Control of Neoplastic Cell Growth. *J. Cell Biochem.* 33:95-107.
- 21) Massague, J. 1987. The TGF-beta family of growth and Differentiation Factors. *Cell.* 49:437-438.
- 22) Rizzino, A., Rizzino, H., y Sato, G. 1979. Defined Media and Determination of Nutritional and Hormonal Requirements of Mammalian Cells in Culture. *Nutr. Rev.* 37:369-378.
- 23) Froesch, E.R., Schmidt, C., Schwander, J., y Zapf, F. 1985. Actions of Insulin-Like Growth Factors. *Annu. Rev. Physiol.* 47:443-467.
- 24) Chytil, F. 1984. Retinoic Acid. *Biochemistry, Pharmacology, Toxicology, Therapeutic Use. Pharmacol. Rev.* 36:93-100.
- 25) Green, S., y Chambon, P. 1986. A Superfamily of Potentially Oncogenic Hormone Receptors. *Nature.* 324:615-617.
- 26) Barnes, D. W. 1984. Attachment Factors in Cell Culture. In *Mater J.P (ed) Mammalian Cell Culture. The Use of Serum-Free, Hormone-Supplemented Medium.* New York. Plenum Press. pp:195-238.
- 27) Emerman, J.T., y Pitelka, D. 1977. Maintenance and induction of Morphological Differentiation in Dissociated Mammary Epithelium Cells on Floating Collagen Membranes. *In vitro* 13:328-346.
- 28) Waymouth, C.H. 1981. *The Growth Requiriments of Vertebrate Cells in vitro.* Cambridge Univ. Press. pp:542.
- 29) Hayflick, L., y Morhead, P.S. 1961. The Serial Cultivation of Human Diploids Cells Strains. *Exp. Cell. Res.* 25:585-621.
- 30) Gey, G. O., et al. 1952. Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium. *Can. Res.* 12:264.
- 31) Tubiana, M., y Kosciely S. 1988. Kinetics, growth rate and the natural history of breast cancer. *Eur. J. Cancer. Clin. oncol.* 24:9-14.
- 32) Tubiana, M.L.H. 1989. Tumor Cell Proliferation Kinetics and Tumor Growth Rate. *Reviews in Oncology* 2. In: *Acta Oncologica.* 28 (Fasc. 1):113-121.
- 33) Collins, V.P., Loeffler, R.K., y Tivey, H. 1956. Observations on Growth Rates of Human Tumors. *AJR.* 76:988-1000.
- 34) Tubiana, M.L.H. 1982. Gray Medal Lecture: Cell Kinetics and Radiation Oncology. *Int. J. Radial Oncol. Biol. Phys.* 8:1471-89.
- 35) Tubiana, M., y Malaise, E.P. 1976. Growth rate and cell kinetics in human tumours: some prognostic and therapeutic implications. In: *Symington T, Carter R.L, eds. Scientific Foundation of Oncology.* London: William Heineman. pp:126-136.
- 36) Edelman, G., y Thiery, J.P. 1985. Adhesions as functions as morphogenetic determinants. *The cell in contact.* New York: John Wiley & Sons. pp:390-8.

- 37) Darnell, J., Lodish, H., y Baltimore, D. 1990. Molecular Cell Biology. Scientific American Books. U.S.A. pp:1102.
- 38) Stachelin, L.A y Hull, B.E. 1978. Junctions between cells. *Sci. Am.* 238:140-152.
- 39) Stachelin, L.A. 1974. Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.* 39:191-283.
- 40) Mc Nutt, N.S. y Weinstein, R.S. 1973. Membrane ultrastructure at mamalian intercellular junctions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 26:45-101.
- 41) Skerow, C.J. y Matoltsy, A.G. 1974. Isolation of epdermal desmosomes. *J. Cell. Biol.* 63:515-523.
- 42) Edelman, G. 1983. Cell adhesion molecules. *Science.* 19:450-57.
- 43) Drochmans, P.C., Frendestein, J.C. Wanson, L., Lewrent, T.W. Keenan, J. Stadlei, R. Leloup y Franke, W.W. 1978. Structure and biochemical composition of desmosome and tonofilaments isolated from calf muzzle epidermis. *J. Cell. Biol.* 79:427-443.
- 44) Martinez, R.D. 1986. El cáncer y las metástasis asociadas al tabaquismo. *Mensaje Bioquímico, Méx.* 9:186-203.
- 45) Kelly, D.E. 1966. Fine structure of desmosomes hemidesmosomes and an epidermal globular layer in developing newt epidermis. *J. Cell. Biol.* 28:51-72.
- 46) Kelly, D.E. y Shienvold, F,L. 1976. The desmosome: fine structure studies with freeze-fracture replication and tannic acid staining of sectined epidermis. *Cell Tissue Res.* 172:309-323.
- 47) Cohen, S. M., Gorbsky, G. y Steinberg, M.S. 1983. Immunochemical characterization of related families of glycoproteins in desmosomes. *L. Biol. Che.* 258:2621-2627.
- 48) Cowin, P. y Garrod, D.R. 1983. Antibodies to epithelial desmosomes show wide tissue and species cross reactivity. *Nature (Lond)* 302:148-150.
- 49) Cowin, P., Mattey D.L. y Garrod D.R. 1984. Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab. *J.Cell. Sci.* 70:41-60.
- 50) Cowin, P., Kapprell, H.P. y Franke, W.W. 1985. The complement of desmosomal plaque proteins in different celltypes. *J. Cell. Biol.* 101:1442-1454.
- 51) Suhrbier, A. y Garrod, D. 1986. An investigation of the molecular components of desmosomes in epithelial cells of five vertebrates. *J. Cell. Sci.* 81:223-242.
- 52) Cowin, P., Kapprell, H.P., Franke, W.W., Tamkun, J. y Hynes R.G. 1986. Plakoglobina: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell.* 46:1063-1073.
- 53) Kapprell, H.P., Cowin, P. y Franke, W.W. 1985. Biochemical characterization of desmosomal proteins isolated from muzzle epidermis amino acid and carbohydrate composition. *Eur. J. Cell. Biol.* 36:217-229.
- 54) Gorbsky, G, y Steinberg, M.S. 1981. Isolation of the intercellular glycoproteins of desmosomes. *J. Cell. Biol.* 90:243-248.

- 55) Cohen, S.M., Gorbsky, G, y Steinberg, M.S. 1983. Immunochemical characterization of related families of glycoprotein in desmosomes. *J. Biol. Chem.* 258:2621-2627.
- 56) Pasdar, M. y Nelson, W.J. 1988. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact I. *Bioch. Analysis. J. Cell. Biol.* 106:677-685.
- 57) Pasdar, M. y Nelson, W.J. 1988. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. II. *Morphological Analysis. J. Cell. Biol.* 106:687-695.
- 58) Pasdar, M. y Nelson, W. J. 1989. Regulation of desmosome assembly in epithelial cells. Kinetics of synthesis, transport, and stabilization of desmoglein-I a mayor protein of the membrane core domain. *J. Cell. Biol.* 109:163-177.
- 59) Martínez, R.D. 1991. Caracterización de la desmogleína de células renales en cultivo. *Rev. Alergia Méx.* 38:59-64.
- 60) Penn, E.J., Hobson, C.H., Ress, D.A y Magee, A.I. 1987. Structure and assembly of desmosome functions: protein and glicoprotein components in cultured epithelial cells. *J. Cell Biol.* 105:57-68.
- 61) Marinello, Z. 1983. *Nociones y Reflexiones Sobre Cáncer.* Ed: Científico Técnica. La Habana, Cuba. pp:189.
- 62) Wyke, J. A. 1986. Viruses and Cancer. In: *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer.* Franks, L.M., Feich, Editors. Oxford, U.K. pp:3-20.
- 63) Markert, C.L. 1968. Neoplasia: A Disease of Cell Differentiation. *Cancer Research* 28:1908-1914.
- 64) 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.
- 65) Wheeler, P.R., Bukitt, H.G., y Daniels, V.G. 1980. *Histología Funcional.* Ed: JIMS. Barcelona España. pp:278.
- 66) De Vita, V.T., Hellman, S., y Rosenberg, S.A. 1989. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* 3rd Ed. J.B. Lippincott Co. U.S.A. pp: 149-347.
- 67) Potter, V.R. 1982. In: *Concepts in Cancer Medicine.* Grune and Stratton. Inc. J.N.Y. U.S.A. pp:119-125.
- 68) Pérez, T.R. 1975. *Patología Molecular, Subcelular y Celular.* Depto Patología, Instituto, Nacional de la Nutrición. Ed: Fournier, Méx. pp:6-38.
- 69) Brinton, L.A. 1986. Current Epidemiological Studies- Emerging Hypothesis in Viral Etiology of Cervical Cancer. Ed: R. Peto., H. Zur Hausen. Cold Spring Harbor Lab. pp:17-25.
- 70) Devesa, S.S., Young, J.L. Jr., Brinton, L.A., y Fraumeni, J.F. Jr. 1989. Recent trends in cervix uteri cancer. *Cancer.* 64:2184-90.
- 71) Crawford, L. 1984. Papilloma Virus and Cervical Tumors. *Nature.* 310:16.
- 72) Fu, Y.S., Reagan, J.W., y Richart, R.M. 1983. Precursors of cervical cancer. *Cancer Surv.* 2:359-60.

- 73) Zang, A., Wynder, E.L., y Harris, R.E. 1989. Exposure to Cigarette Smoke and Cervical Cancer. JAMA. 262:499.
- 74) Zur Hausen, H., De Vilers E., y Gismann. 1981. Papilloma Viruses Infection and Human Genital Cancer. Gynecologic Oncology. 12:124.
- 75) Durst, M., Gissman, L., Ikenberg H., y Zur Hausen, H.A. 1983. Papilloma Virus DNA from a Cervical Carcinoma and its Prevalence in Cancer Biopsy Sample from Different Geographycal Regions. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 80:3812.
- 76) Naib, Z.M., Nahamias A.J., y Josey, W.E. 1986. Cytology and Histopatology of Cervical Herpes Simplex Infection. Cancer. 19:1026.
- 77) Wright, T.C., y Richart, R.M. 1989. REVIEW. Role of human Papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. Gynecologic Onc. 37:151-164.
- 78) Rapp, F., y Jenkins, F.J. 1981. Genital Cancer and Viruses. Gynecol. Oncol. 12:525-528.
- 79) Kaur, P., McDougall, J.K., y Cone, R. 1989. Immortalization of Primary Human Epithelial Cells by Cloned Cervical Carcinoma DNA Containing Human Papillomavirus Type 16 E6/E7 Open Reading Frames. J.Gen. Virol. 70:1261-1266.
- 80) Baird, J.P. 1983. Serological Evidence of Papillomaviruses and Cervical Neoplasia. The Lancet. 17.
- 81) Gissman, L., y Zur Hausen, H. 1980. Partial Characterization of Viral DNA from Human Genital Warts (Condylomata Acuminata). Int. J. Cancer. 25:605-611.
- 82) Zur Hausen, H. 1977. Human Papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinoma. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 78:1-3.
- 83) Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., et al. 1984. Human Papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopses and in cell lines derived from cervical cancer. Eur. Mol. Biol. Org. J. 3:1151-1158.
- 84) Crum, C., Ikenberg, H., Richart, R., et al. 1984. Human Papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. N. Engl. J. Med. 310:880-883.
- 85) Kurman, R.J., Schiffman, M.H., Lancaster, W.D., et al. 1988. Analysis of individual human Papillomavirus types in cervical neoplasia. A possible role for type 18 in rapid progression. Am. J. Obstet, Gynecol. 159:293-296.
- 86) King, L.A., Tase, T., Twiggs, L.B., et al. 1989. Prognostic significance of the presence of human Papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. Cancer. 63:897-900.
- 87) Mc Canci, D.J., Campion, M.J., clarkson, R.K., et al. 1985. Prevalence of human Papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical carcinoma of the cervix. Brit. J. Obstet. Gynecol. 92:1101-1105.
- 88) Lorincz, A.t., Temple, G.F., Kurman, R.S, et al. 1987. Oncogenic association of specific human Papillomavirus types with cervical neoplasia, J. Natl. Cancer. Inst. 79:671-677.

- 89) Wilczynski, S., Bergen, S., Walker, J., et al. 1988. Human Papillomavirus and cervical cancer. Analysis of histopathologic features associated with different viral types. *Hum. Pathol.* 19:697-704.
- 90) Storey, A., Osborn, K y Crawford, L. 1990. Co-transformation by human Papillomavirus types 6 and 11. *J. of Gen. virol.* 71:165-171.
- 91) Villa, L.L. y Brentani, R.R. 1990. Human Papillomavirus up date. *Int. J. Cancer.* 48:163-166.
- 92) zur Hausen, H. 1989. Papillomavirus in anogenital cancer: the dilemma of epidemiologic approaches. *J of Nat. Cancer Inst.* 81:1680-1681.
- 93) Coleman, D.V., y Evans, D.M.D. 1989. Biopsy pathology and cytology of the cervix. Ed Chapman and Hall Medical London, Great Britain. pp:52-74.
- 94) Seedorf, K., Oltersdorf, P., Kramer, G., y Rowekamp, W. 1986. Identification of Early Proteins of the Human Papillomavirus Type (HPV-16) and Type 18 (HPV-18) in Cervical Carcinoma Cells. *EMBO. J.* 6:139-145.
- 95) Nakai, Y., Lancaster, W.D., Lim. L.V., y Jenson, A.B. 1986. Monoclonal antibodies to genus and type-specific Papillomavirus structural antigens. *Intervirology.* 25:30-37.
- 96) Gupta, J., Schneider, H., y Shah, K. 1986. Detection of Papillomavirus Antigen and DNA in Cells and Tissues in "Viral Etiology of Cervical Cancer" 21 Branbury Report. Ed: R.Peto and Zur Hausen. Col. Spring Harbor Lab. pp:247.
- 97) Dillner, J., Dillner, L., Robb, J., willems, J., Jones, I., Lancaster, W., Smith, R., y Lerner, R. 1989. A synthetic peptide defines a serologic IgA response to a human Papillomavirus-encoded nuclear antigen expressed in virus-carrying cervical neoplasia. *Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3838-3841.
- 98) Smotkin, D., y Wettstein, O.F. 1986. Transcription of Human Papillomavirus Type 16 Early Genes in a Cervical Cancer and Cancer Derived Cell Line and Identification of the E7 Protein. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 83:4680-4686.
- 99) Stupar, M. 1989. The presence of human Papillomavirus-16 genome in the Caski Cervical Carcinoma DNA. *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. acta.* 25:45-52.
- 100) Macnab, J.C. 1987. Herpes Simples and Human Cytomegalovirus: Their Role in Morphological Transformation and Genital Cancers. *J. Gen. Virol.* 68:2525-2532.
- 101) Aurelian, L., Schuman, B., Marcus, R.L., y Davis, H.J. 1973. Antibodies to HSV-2 Induced Tumor Specific Antigens in Serums from Patients with Cervical Carcinoma. *Science.* 181:161-168.
- 102) Zur Hausen, H. 1986. Intracellular surveillance of persisting viral infections: Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* 2:489-491.
- 103) Peto, R., y Zur Hausen. 1986. Viral Etiology of Cervical Cancer. 21 Branbury Report. Col. Spring Harbor Lab. pp:245.

- 104) Roitt, I., Brostoff, J., y Male, D. 1986. Immunology. The C.V. Mosby Co. St. Louis Toronto, Canada. pp:25.10.
- 105) Stites, P.D., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H. y Wells, V.J. 1985. Immunología Básica y Clínica. Ed:El Manual Moderno. S.A. México. pp:842.
- 106) Benacerraf, B., y Unanue, E.R. 1986. Immunología. Ed: Médica, Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp:240.
- 107) Minagari, M.C., Moretta, A., Maggi, E., Pantao, 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. of Immunol. 14:1066-1069.
- 108) Murakawa, Y., Takada, S., Ueda, Y., Suzuki, N., y Sakane, T. 1984. Characterization of T Lymphocyte Subpopulations Responsible for Deficient Interleukin-2 Activity in Patients with Systemic lupus Erythematosus. The J. Immunol. 134:187-194.
- 109) A Commentary. 1984. T-Cell Ia Resisted. J. Mol. Cell. Immunol. 1:155-156.
- 110) 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 Monoclear Cells Separated by Density Gradient Centrifugation. J. of Immunol. Methods. 72:349-353.
- 111) Robins, R.A., y Baldwin, R.W. 1985. T-Cell Subsets in Tumor Rejection Responses. Immunol. Today. 6:55-58.
- 112) Paul, E.E. 1986. Fundamental Immunology. Raven Press. N.Y. U.S.A. pp:809.
- 113) Abbas, A.K. 1989. Interleukin-2 After a Decade. Science. 244:994.
- 114) Cantrell, D.A. y Smith, K.A. 1984. The interleukin-2 T-cell system: A new cell Growth Model. Science. 224:1312-1316.
- 115) Churilla, A.M., Braciale, T.J., y Braciale, V.L. 1989. Regulation of T Lymphocyte Proliferation: Interleukin-2 Mediated Induction of c-myc Gene Expression is Dependent on T Lymphocyte Activation State. J.Exp. Med. 170:105-121.
- 116) Ettinhausen, 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. Can. Res. 46:2784-279
- 117) Mulé, J.J., Ettinhausen, 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 Scape in Mice Undergoing Immunotherapy. Can. res. 46:676-683.
- 118) Mulé 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.
- 119) Shu, S., y Rosenberg, S.A. 1985. Adoptive Immunotherapy of Newly Induced Murine Sarcomas. Can. Res. 45:1657-1662.

- 120) Mulé, J.J., Yang, J., Shu, S., y Rosenberg, S.A. 1986. The Antitumor Efficacy of Lymphokine Activated Killer Cells with 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.
- 121) Vánky, F. 1986. Membrane structures involved in autotumor recognition. *Biochimica et Biophysica Acta.* 865:253-265.
- 122) Kronenberg, M., Malissen, B., y Eisen, H. 1985. Genes, structures and function of T lymphocyte antigen receptors. *Immunol. Today* 6:281-284.
- 123) Benacerraf, B., y Mc Devitt, S.V. 1972. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 175:273-275.
- 124) Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.V., Ting, A., y Morris, P.J. 1984. The detailed distribution of HLA-ABC antigens in normal human organs. *Transplantation.* 38:287-290.
- 125) Forman, J. 1984. T cells, the MHC, and functions. *Immunol. Rev.* 81:203-205.
- 126) Rognum, T.O., Brandtzaeg, P., y Thorud, E. 1983. Is heterogeneous expression of HLA-DR antigens and CEA along with DNA-profile variations evidence of phenotypic instability and clonal proliferation in human large bowel carcinomas?. *Br. J Cancer* 48:543-550.
- 127) Vánky, F., Stuber, G., Rotstein, S., y Klein, E. 1989. Auto-tumor recognition following in vitro induction of MHC antigen expression on solid human tumors. Stimulation of lymphocytes and generation of cytotoxicity against the original MHC-antigen-negative tumor cells. *Can. Immunol. Immunother.* 28:17-21
- 128) De-Vries, J.E., Yssel, H., y Spits, H. 1989. Interplay between the TCR/CD3 complex and CD4 or CD8 in the activation of cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 109:119-141.
- 129) Brown, M.H., Cantrell, D.A., Bratlsand, G., Crumpton, M.J., y Gullberg, M. 1989. The CD2 antigen associates with the T-cell antigen receptor CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Nature.* 339:551-3.
- 130) Bierer, B.E., y Burakoff, S.J. 1988. T cell adhesion molecules. *FASEB J.* 2:2584-90.
- 131) Vánky, F., Stuber, G., Willems, J., Sjowall, K., Larsson, B., Book, K., Ivert, T., Peterffy, A., y Klein, E. 1988. Importance of MHC antigen expression on solid tumors in the in vitro interaction with autologous blood lymphocytes. *Can. Immunol Immunother.* 27:213-222.
- 132) Callagen, G.N. 1985. Products of the major histocompatibility complex on tumor cells. In: Sell, S, Reisfeld, R.A. (eds) *Monoclonal antibodies and cancer.* Human Press. New Jersey. pp: 97-121.

- 133)** Vánky, F., Wang, P., Patarroyo, M., y Klein, E. 1990. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens of human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes in vitro. *Cancer Immunol. Immunother.* 31:19-27.
- 134)** Natali, P.G., Bigotti, A., Nicosta, M.R., Viotra, M., Manfredi, D., y Ferrone, S. 1984. Distribution of human class I (HLA-ABC) histocompatibility antigens in normal and malignant tissues of non-lymphoid origin. *Cancer Res.* 44:4679-4686.
- 135)** Katzav, S., Tartokowsky, B., de Baetselier, P., Isakov, N., Feldman, M., y Segal, S. 1983. Role of MHC encoded glycoproteins in tumor dissemination. *Transplant Proc.* 15:62-69.
- 136)** Momburg, F., y Koch, S. 1989. selective loss of B2-microglobulin in RNA in human colon carcinoma. *J. Exp. Med.* 169:309-314.
- 137)** Natali, P.G., Nicotra, M.R., Bigotti, A., Venturo, I., Marcenaro, L., Giacomini, P. y Russo, C. 1989. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci (Wash).* 86:6719-6723.
- 138)** Schrier, P.L., Bernards, R., Vaessen, R.T.M.J., y Howveling, A. 1983. Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature (Lond).* 305:771-775.
- 139)** Connor, M.E., y Stern, P.L. 1990. Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int. J. Cancer.* 46:1029-1034.
- 140)** Durant, J.R. 1987. Immunotherapy of Cancer. *The New Engl. J. of Med.* 316:939-940.
- 141)** Anichini, A., Fossati, G., y Parmiani, G. 1987. Clonal Analysis of the Cytolytic T-Cell Response to Human Tumors. *Imm. Today.* 8:385-390.
- 142)** Uchida, A., y Moore, M. 1984. Lysis of Fresh Human Tumor Distinct Killing Activities Induced by Coculture with Autologous Tumor. *JNCI.* 73:1285-1292.
- 143)** Strauser, J.L., Mazumder, A., grim, E.A., Lotze, M.T., y Rosenberg, S.A. 1981. Lysis of human solid tumors by autologous cells sensitized in vitro to alloantigens. *J.of Immunol.* 127:266-271.
- 144)** Maleckar, J.R., Friddell, C.S., Sferruzza, A., Thurman, G.B., Lewko, W.M., West, W.H., Oldham, R.K., y Yannelli, J.R. 1989. activation and expansion of tumor-derived activated cells for therapeutic use. *J of Nat. Can. Inst.* 81:1655-59.
- 145)** Vánky, F., y Klein E. 1989. Auto-tumor lysis by blood lymphocytes in vitro. Strongly activated lymphocytes lack selectivity. *Cancer Immunol. Immunother.* 29:125-132.
- 146)** Vánky, F., y Klein, E. 1982. Specificity of auto-tumor cytotoxicity exerted by fresh, activated and propagated human T lymphocytes. *Int. J. Cancer.* 29:547-552.

- 147) Sharma, B., y Terasaki, P.I. 1974. In vitro immunization to cultured human tumor cells. *Cancer Res.* 34:115-121.
- 148) Jamieson, B.D., y Ahmed, R. 1989. T cell memory: Long-term persistence of virus-specific cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* 169:1993-2005.
- 149) Cerundolo, D., y Engers, H.D. 1987. Functional Activity in vivo of Effector T Cell Populations. III Protection Against Moloney Murine Sarcoma Virus (M-MSVO) Induced Tumors in T Cell Deficient Mice by Adoptive Transfer of a M-MSV-Specific Cytolytic T Lymphocyte Clone. *Eur. J. Immunol.* 17:173-178.
- 150) Ichino, Y., y Ishikawa, T. 1985. Generation of Human Cytotoxic T Lymphocytes Against Autologous Solid Tumors by Autologous Mixed Lymphocyte Tumor Culture with T Cell Growth Factor. *Auris. Nasus Larynx.* 2:226-232.
- 151) Bagnasco, M., Pesce, G., Pronzato, C., y Canonica, G.W. 1990. Functional involvement of LFA-1/ICAM-1 adhesion system in the autologous mixed lymphocyte reaction. *Cell. Immunol.* 128:362-369.
- 152) Ichino, Y., y Ishikawa, I. 1984. Generation of human cytotoxic T lymphocytes against fresh autologous and allogeneic solid tumors by mixed lymphocyte tumor cell culture with T cell growth factor. *Grann.* 75:436-442.
- 153) Vánky, F., Gorsky, T., Gorsky, Y., Masucci, M.G., y Klein, E. 1982. Lysis of tumor biopsy cells by autologous T lymphocytes activated in mixed cultures and propagated with T cell growth factor. *J. Exp. Med.* 155:83-88.
- 154) Vose, B.M., y White, W. 1983. Tumor reactive lymphocytes stimulated in mixed lymphocyte and tumour culture stimulated in mixed lymphocyte and tumour culture, clonal analysis of effector cells in cytotoxic and proliferative assays. *Cancer Immunol. Immunother.* 15:227-232.
- 155) Allavena, P., Lo Presti, P., Di Bello, M., Lucchini, V., Lissopni, A., Zanetta, G., Mangioni, C., y Mantovani, A. 1988. Proliferative response of lymphocytes from ovary cancer patients response to autologous tumor cells. *Can. Immunol. Immunother.* 27:69- 76.
- 156) Stuber, G., Vanky, F., Pocsik, E., Benzur, M., y Klein, E. 1990. expression of interleukin-2 receptor on blood lymphocytes stimulated with allogeneic lymphocytes or autologous tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 31:76-80.
- 157) Uchida, a., Moore, M., y Klein, E. 1988. Autologous mixed lymphocyte-tumor reaction and autologous mixed lymphocyte reaction II. Generation of specific and non specific killer cells capable of lysing autologous tumor. *Int. J. Cancer.* 41:651-656.
- 158) Di Bello, M., Lucchini., Chiari, S., Colleoni, R., Colombo, N., et al. 1988. Carcinoma cells does not correlate with their capacity to elicit an autologous proliferative response. *Cancer Immunol. Immunother.* 27:63-68.

- 159) Fossati, G., Balsari, A., Taramelli, D., Sensi, M.L., Pellegris, G., Nava, M., y Parmiani, G. 1982. Lysis of autologous human melanoma cells by in vitro allosensitized peripheral blood lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 14:99-104.
- 160) Kuwakami, Y., Rosenberg, S.A., y Lotze, M.T. 1988. Interleukin-4 Promotes the Growth of Tumor Infiltrating Lymphocytes Cytotoxic for Human Autologous Melanoma. *J. Exp. Med.* 168:2183-2191.
- 161) Rabinowich, H., Steiner, Z., y Klajman, A. 1987. Clonal analysis of human tumor infiltrating lymphocytes reactive with autologous tumor cells: different target cell specificities of NK-like and cytotoxic T-cell clones. *Cell Immunol.* 104:210-17.
- 162) Vujanovic, N.L., Heberman, R.B., Maghazachi, A., y Hiserodt, J.C. 1988. Lymphokine Activated Killer Cells in Rats. III A Simple Method for the Purification of Large Granular Lymphocytes and Their Rapid Expansion and Conversion in to Lymphokine-Activated Killer Cells. *J. Exp. Med.* 167:15-29.
- 163) Melder, R.J., Whiteside, T.L., Vujanovic, N.L., Hiserodt, J.C., y Heberman, R.B. 1988. A New Approach to Generating Antitumor Effectors for Adoptive Immunotherapy Using Human Adherent Lymphokine-Activated Killer Cells. *Can. res.* 48:3461-3469.
- 164) 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 Med.* 316:889-897.
- 165) Migliori, R.J., Gruber, S.A., Sawyer, M.D., Hoffman, R., Ochoa, A., Bach, G.H., y Simmons, R.L. 1989. Lymphokine activated killer (LAK) cells can be focused at sites of tumor growth by products of macrophage activation. *Surgery.* 102:155-62.
- 166) Moertel, Ch, G. 1986. On Lymphokines, and Breakthroughs. *JAMA.* 256:3141.
- 167) Podack, E.R. 1985. The Molecular Mechanism of Lymphocyte-Mediated Tumor Cell Lysis. *Immunol. today.* 6:21-27.
- 168) Fentanes de Torres, E., y Guevara, C.E. 1980. *Citología clínica.* Ed: La prensa médica mexicana. pp:29-111.
- 169) Bissell, M.J. 1981. The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture. *Int. Rev. Cytol.* 70:27-100.
- 170) Turyk, M.E., Golut, T.R., Wood, N.B., Hawkins, J.L., y Wilbanks, G.D. 1989. Growth and characterization of epithelial cells from normal human uterine ectocervix and endocervix. *In Vitro Cell Div. Biol.* 25:544-56.

- 171) Stuber, G., Vánky, F., Pocsik, E., Benezur, M., y Klein, E. 1989. Expression of interleukin-2 receptor on blood lymphocytes stimulated with allogeneic lymphocytes or autologous tumor cells. *Cancer Immunol Immunoth.* 31:76-80.
- 172) Vánky, F., Roberts, T., Klein, E., y Willems, J. 1987. Autotumor immunity in patients with solid tumors: participation of CD3 complex and MHC class I antigens in the lytic interaction. *Immunol. Lett.* 16:21-23.
- 173) Vánky, F., Vose, B.M., Fopp, M., y Klein, E. 1979. Human tumor lymphocyte interaction in vitro: VI. Specificity of primary and secondary autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Natl. Can. Inst.* 62:1407-1412.
- 174) Hersey, P. 1989. Detection of immunity to human neoplasms. *Current Opinion in Immunol.* 1:895-899.
- 175) Vánky, F., y Klein, E. 1982. Human T cell cultures with selective autotumor reactivity. *Cancer Immunol. Immunother.* 14:73-77.
- 176) Vose, B.M., y Bonnard, G.D. 1982. Specific cytotoxicity against autologous tumor and proliferative responses of human lymphocytes grown in interleukin-2. *Int. J. Cancer.* 29:33-39.
- 177) Mukherji, B., Chakraborty, N.G., y Sivanandham, M. 1990. T-cell clones that react against autologous human tumors. *Immunological Reviews.* 116:35-62.
- 178) Chem, B.P., Hank, J.A., Kraus, E.E., y Sondel, P.M. 1989. Selective lysis of target cells by interleukin-2 expanded peripheral blood mononuclear leukocyte clones. *Cellular Immunol.* 118:458-469.
- 179) Keever, C.A., Flomenberg, N., Grazzola, M.V., Pekle, K., Yang, S.Y., Small, T.N., Collins, N.A., y O'Reilly, R.J. 1990. Cytotoxic and proliferative T-cell clones with antitumor reactivity from a patient transplanted for severe combined immunodeficiency disease. *Human Immunol.* 29:42-55.
- 180) Parmiani, G. 1988. Proliferative and or cytotoxic activity of lymphocyte clones to autologous human melanoma. *Int. J. Cancer.* 42: 239-245.
- 181) Degiovanni, G., Lahaye, T., Herin, M., Hainaut, P., y Boon, T. 1988. Antigenic heterogeneity of a human melanoma tumor detected by autologous CTL clones. *Eur. J. Immunol.* 18:671-676.
- 182) Shaw, S., Ginther Luce, G.E., Quinones, 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.* 323:262-264.
- 183) Fukiage, T., Murakami, H., Eura, M., Ikawa, T., y Ishikawa, T. 1991. Killer cells induced by stimulation with allogeneic tumor cells and subsequent culture with recombinant interleukin-2. *Cancer Immunol. Immunother.* 33:139-145.
- 184) Weynants, P., Wanters, P., Coulie, P.G., Van Den Eynde, B., Symann, M., y Boon, T. 1988. Cytolytic response of human T cells against allogeneic small cell lung carcinoma treated with interferon gamma. *Cancer. Immunol. Immunother.* 27:228-233.

- 185)** Ikawa, T., Ishikawa, T., y Eura, M. 1988. Study of head and neck cancer treatment by administration of autologous cytotoxic lymphocyte induced by stimulation with tumor cells. Induction of killer cells by stimulation with allogeneic tumor cell. *J. Otolaryngol. Jpn.* 91:2079-2085.
- 186)** Ishikawa, I., Ikawa, T., Eura, M., Fukiage, T., y Masuyama, K. 1989. Adoptive immunotherapy for head and neck cancer with killer cells induced by stimulation with autologous or allogeneic tumor cells and recombinant interleukin-2. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 107:346-354.
- 187)** Slingsluff, C.L., Darrow, T.L., y Seigler, H.F. 1989. Melanoma-specific cytotoxic T cells generated from peripheral blood lymphocytes. *Ann. Surg.* 210 :194-202.
- 188)** Hallan, N., Gibson, P., Green, J., y Charnock, M. 1989. Detection and typing of human Papillomavirus infection of the uterine cervix by dot blot hibridisation: comparison of scrapes and biopsies. *J. Med. Virol.* 27:317-321.
- 189)** Shirasawa, H., Tomita, Y., Fuse, A., Yamamoto, T., Tanzawa, H., Sekiya, S., Takamizawa, H y Simizu. B. 1989. Structure and expression of an integrated human Papillomavirus type 16 genome amplified in a cervical carcinoma cell line. *J. Gen. Virol.* 70:1913-1919.
- 190)** Spence, R.P., Murray, A., Banks, L., Kelland, L.R., y Crawford, L. 1988. Analysis of human Papillomavirus Sequences in cell lines recently derived from cervical cancers. *Cancer Res.* 48:324-328.
- 191)** Lee, K., Bao, J., Wang, J., Zhao, W., Liu, S., Si, J., Wang, Y., Zhang, W., y Jiang, J. 1987. Ultrastructural study of the morphogenesis of Herpes Simplex virus type 2 in organ cultured human uterine cervix and the interactions between virus and host cell. *J. Elec. Microsc. Tech.* 7:73-84.
- 192)** Walker, J., Bloss, J.D., Liao, S.Y., Berman, M., Bergen, S., y Wilczynski, S.P. 1989. Human Papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uteri cervix. *Obstet. Gynecol.* 74:781-5.
- 193)** Loning, T.H., y Milde, K. 1987. Viral tumor markers. In: *Pathology of cell receptors and tumor markers.* Edited by: G. Seifert, (Hamburg) and K. Hubner (Frankfurt/Main). Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York. pp: 98-109.
- 194)** Kitchener, H.C. 1988. Genital virus infection and cervical neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 95:182-91.
- 195)** Gajewski, T.F., Schell, S.R., Nan, G., y Fitch, F.W. 1989. Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol. Rev.* 111:79-110.
- 196)** Matera, L., Foa, R., Massaina, M., Giovarelli, M., Veglia, F., Cesano, A., Lusso, P., Piazza, A., y Santoli, D. 1989. B cells from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients are strong inducers of proliferation and major histocompatibility complex (MHC)-unrestricted natural killer (NK)-like cytotoxicity in normal T-lymphocytes. *J. Clin. Immunol.* 9:329-37.

- 197) Yamamoto, S., Hoon, D.S., Chandler, P., Schmid, I y Irie, R.F. 1990. Generation of Lymphokine-activated killer cell activity by low-dose recombinant interleukin-2 and tumor cells. *Cell. Immunol.* 128:516-527.
- 198) Ritz, J., Schmidt, R.E., Michon, J., Hercend, T., y Schlossman, S.F. 1988. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv. Immunol.* 42:181-211.
- 199) Tompkins, M.B., Pang, V.F., Michaely, P.A., Feinmehl, R.I., Basgall, E.J., Baszler, T.V., Zachary, J.F. y Tompkins, W.A.A. 1989. Feline cytotoxic large granular lymphocytes induced by recombinant human IL-2. *J. of Immunol.* 143:749-754.
- 200) Monroy, G.A., Rangel, C.R., Rodríguez, C.S., y Weiss, S.B. 1990. Inhibición in vitro de la proliferación de células tumorales por leucocitos de sangre periférica activados con interleucina-2 recombinante. *Cancerología, México.* 36:980-986.
- 201) Marqués De Cantú, M. J. 1988. Probabilidad y Estadística para ciencia químico-biológicas. ed: ENEP Zaragoza UNAM, México. pp.657

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 2 matraces. se adicionan 16.4 grs./l de medio RPMI-1640 en polvo (Sigma Chemical, Cell Culture Reagents, U.S.A) agitándose suavemente, se agregan 3.7grs. de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina y 2 mM de L-glutamina. 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 μ .

El medio RPMI-1640, fue desarrollado por Moore et al., en el Roswell Park Memorial Institute (RPMI), la fórmula se basa en la del medio RPMI-1630 utilizando un sistema amortiguador de bicarbonato y alteraciones en las cantidades de aminoácidos y vitaminas.

APENDICE 2

DESACTIVACION DEL SUERO FETAL DE BOVINO

Se toma una botella de Suero Fetal de Bovino (Gibco, U.S.A) y se coloca a baño de agua a temperatura ambiente para que sea descongelado, posteriormente se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 min, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular como son las proteínas del complemento, que pueden interferir 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	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de sodio.....	8.0
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 durante 20 min.

APENDICE 4

PREPARACION DE VERSENO

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

SUSTANCIAS	CONCENTRACION (g/l)
Tris base.....	3.04
Cloruro de sodio.....	8.00
Cloruro de potasio.....	0.40
Etilén-diamin-tetra-acético (EDTA).....	0.20

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

APENDICE 5

PREPARACION DEL COLORANTE AZUL DE TRIPANO

Para pruebas de viabilidad, generalmente se empleó una dilución del colorante Azul de Tripano (Sigma de México S.A) al 0.3% en PBS. Antes de utilizarlo, el colorante fue filtrado mediante el uso de un filtro (Whatman, England) del número 2.

APENDICE 6

PRUEBA DE CHI-CUADRADA DE INDEPENDENCIA-TABLAS DE CONTINGENCIA

Otro uso de la chi-cuadrada es la prueba de hipótesis de que dos criterios de clasificación, cuando son aplicados a las mismas unidades elementales, son independientes.

La clasificación en dos criterios de los mismos individuos se hace en las llamadas **tablas de contingencia**, en la cual la "f" filas representan los niveles de un criterio u las "c" columnas representan los niveles del otro criterio de clasificación puede ser los ingresos anuales por familia y el otro criterio las zonas donde viven los habitantes de una ciudad. Si los ingresos anuales por familia y las zonas donde viven **son independientes**, entonces tendríamos que en todas las zonas de la ciudad vivirían la misma proporción de familias de bajos, medios y altos ingresos.

Una tabla de contingencia mostrando esta situación sería como la siguiente:

INGRESOS

ZONAS	Bajos	Medios	Altos	Total
A	n11	n12	n13	n1.
B	n21	n22	n23	n2.
C	n31	n32	n33	n3.
D	n41	n42	n43	n4.
Total	n.1	n.2	n.3	n

Estamos interesados en probar la hipótesis nula de que en la población, los dos criterios de clasificación son independientes. Si se rechaza la hipótesis nula, concluimos que los dos criterios de clasificación no son independientes sino dependientes.

Un cuadro ij cualquiera de la tabla formada por la interacción de un nivel de uno de los criterios con un nivel de otro criterio se llama celda. Las frecuencias observadas se designan por O_{ij} y las esperadas por E_{ij} . El estadígrafo de prueba viene dado por:

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^f \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad \text{con } (c-1)(f-1) \text{ grad. de lib.}$$

Las frecuencias esperadas E_{ij} de una celda cualquiera ij se obtiene multiplicando la frecuencia relativa correspondiente a la fila i por la frecuencia relativa correspondiente a la columna j por el tamaño de la muestra.

$$\text{Así } E_{ij} = \left(\frac{n_{i.}}{n}\right) \left(\frac{n_{.j}}{n}\right) (n) = \frac{(n_{i.})(n_{.j})}{n} \quad \text{puesto que si}$$

son eventos independientes la probabilidad de la intersección es el producto de las probabilidades.

Finalmente el valor calculado para χ^2 se compara con el valor teórico de χ^2 .

APENDICE 7

ANÁLISIS DE REGRESIÓN NO LINEAL

Regresión exponencial o semilogarítmica.

A partir del diagrama de dispersión o de la teoría, podemos conocer que la relación entre las dos variables puede representarse adecuadamente sólo por cierta función matemática curvilínea (no lineal), por ejemplo la tendencia general del crecimiento poblacional que sigue un crecimiento exponencial positivo, o el decaimiento radiactivo que sigue un modelo exponencial negativo. (Tomado de ref. 201)

Cuando se sospecha que la relación es de tipo exponencial, proponemos una ecuación de regresión de la forma:

$$y = c d^{\hat{x}}$$

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

Por necesidad teórica y conveniencia práctica transformamos nuestra ecuación de regresión a otra, tomando logaritmos a ambos lados:

$$\log \hat{Y} = \log c + X \log d \quad (1)$$

Ahora hacemos: $\log c = a$
 $\log d = b$

sustituyendo en (1) queda:

$$\log \hat{Y} = a + b X \quad (2)$$

que es una ecuación lineal en $\log Y$ y X , la cual es una función semilogarítmica, de manera que si llevamos los puntos a papel semilogarítmico obtendremos una recta.

Para transformar de nuevo la ecuación (2) a la forma original sólo necesitamos tomar la función inversa del logaritmo, esto es la función exponencial de la base adecuada según haya sido la base de los logaritmos con que se esté trabajando; es es, si tomamos logaritmos comunes (de base 10), entonces:

$$c = 10^a$$

$$d = 10^b$$

$$\hat{Y} = (10^a)(10^b)^X$$

APENDICE 8

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 media de dos muestras independientes cuando los datos no alcanzan a ser de tipo cuantitativo sino cualitativo (ordinales o nominales). (Tomado de ref. 201).

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 la dos U_1 ó U_2 , se obtiene otro valor.

$$U' = n_1 n_2 - U$$

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 9

ANALISIS 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 por que se necesitan resultados con urgencia. Una prueba no paramétrica para estos casos es el Análisis de Varianza por Rangos de Friedman. (Tomado de la ref. 201)

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^2_r se calcula por:

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

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

Los valores críticos para χ^2_r , para varios valores de r y k se obtienen de tablas.

Cuando los datos son medias en vez de rangos, se les asignan rangos basados en magnitud dentro de los bloques. Si hay empate se toma la medida como rango.

AGRADECIMIENTOS

Expreso firmemente mi agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider y a la M. en C. Rosalva Rangel Corona por su excelente asesoría, apoyo y confianza depositada en mí para la realización del presente trabajo.

De la misma forma, agradezco al Dr. José Miguel Betancourt Rule, al Dr. Alejandro Mohar Betancourt, al M en C. Jorge Flavio Mendoza Rincón, al Dr. Rubén Darío Martínez, al Dr. Rubén Marroquín Segura, a la M en C. María de Lurdes Mora García y a la M en A. María José Marqués de Cantú por la excelente revisión crítica de la tesis, por sus acertadas observaciones y útiles consejos.

Asimismo, agradezco al M.D., Ph.D. Steven A. Rosenberg del Departamento de Cirugía, e la División del Tratamiento del Cáncer, Bethesda, Maryland, U.S.A., por su generosa donación de la IL-2rh para la realización del presente trabajo.

Deseo también expresar mi agradecimiento especial al Biólogo Miguel Ángel Ramírez Romero por su valiosa colaboración, consejos y crítica en la elaboración de ésta tesis.

También doy la gracias a los Srs. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su valiosa colaboración técnica.

Finalmente manifiesto my profundo agradecimiento a todos mis compañeros de la maestría I.B.S.H: Angélica, Elia, Julia, Leticia, Ma. Elena, José Luis, Joaquin, Marcelo y Moisés, por su enorme paciencia, apoyo y comprensión.

PUBLICACIONES

INHIBICION IN VITRO DE LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES POR LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA ACTIVADOS CON INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE. Biol. Alberto Monroy García, M en C. Rosalva Rangel Corona, Dr. Sergio Rodríguez Cuevas, Dr. Benny Weiss Steider.
Cancerología VOL. 36, Núm.1. ENE-MZO. 1990.

ESTABLISHMENT OF CERVICAL CANCER CELLS LINES WITH FIBROBLASTIC MORPHOLOGY AND POSITIVE FOR ANTIDESMOGLEIN. R. Rangel, L. Rocha, A. Monroy, R. Martínez, G. Solorsa. J. López Cueto, C. Trejo, B. Weiss-Steider.

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN PRESENCIA DE SUEROS DE PACIENTES CON CANCER CERVICO-UTERINO E INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE. M en C. Rosalva Rangel Corona, Biól. Alberto Monroy García, Biól. Leticia Rocha Zavaleta, Biól. Catalina Trejo Becerril, Dr. Alejandro Mohar Betancourt, Dr. José Luis Ramírez Gaitán, Dr. Luis Méndez Morán y Dr. Benny Weiss Steider.
En Prensa. Cancerología, VOL.38, Núm.1. ENE-MZO 1992.

INHIBICION *IN VITRO* DE LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES POR LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA ACTIVADOS CON INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE

Biol. Alberto Monroy García, M. en C. Rosalva Rangel Corona,
Dr. Sergio Rodríguez Cuevas, Dr. Benny Weiss Steider

RESUMEN

Se determinó el efecto citostático de leucocitos de sangre periférica normal (LSP) en ausencia y presencia de interleucina 2 recombinante (rIL-2) sobre la proliferación de células provenientes de cuatro diferentes biopsias tumorales. En todos los experimentos se utilizó como control fibroblastos normales obtenidos de prepucio sano. Nuestros resultados muestran que los co-cultivos con LSP pueden llegar a inhibir la proliferación de las células provenientes de los tumores, pero que en presencia de rIL-2 esta inhibición siempre estuvo presente y significativamente mayor que la encontrada sin este factor. Finalmente se discute tanto la posibilidad de que el aumento de inhibición detectada se deba al reconocimiento de algún antígeno tumoral, así como la utilidad de este tipo de ensayos *in vitro* como una herramienta que permita mejorar los tratamientos de pacientes con cáncer mediante el diseño de un protocolo de inmunoterapia adoptiva.

Cancerología VOL. 36, Núm. 1, ENE.-MZO. 1990

SUMMARY

The cytostatic effect of normal peripheral blood leucocytes (PBL) on the proliferation of cell from four different tumour biopsies in the absence and presence of recombinant Interleukin 2 (rIL-2) was determined. Fibroblast were isolated from a child's prepucce and used as normal controls in all the experiments. Our results showed that the co-cultures of tumour cell with PBL can in some cases inhibit cell proliferation, and that in the presence of IL-2 this inhibition was always present and significantly higher than in the cultures without this factor. Finally we discuss the possibility that the high inhibition of tumour cell proliferation by PBL found in this work in the presence of rIL-2 is a consequence of the recognition of a tumor antigen by these leukocytes, as well as the importance of these type of assays in the development of adoptive immunotherapy protocols.

Cancerología VOL. 36, Núm. 1, ENE.-MZO. 1990

INTRODUCCION

Actualmente es innegable la importancia del sistema inmune en la defensa del organismo contra agentes patógenos, así como de su capacidad de eliminación de células defectuosas o infectadas (1). Sin embargo,

el posible papel que pueda desempeñar este sistema en la defensa del organismo contra células tumorales aún no está bien entendido (2).

Aunque la rama de la ciencia que estudia el posible control de la transformación neoplásica por células inmunocompetentes llamada Inmunología Tumoral tiene ya más de 89 años, el desarrollo de una terapia efectiva contra el cáncer mediante manipulación inmune no ha sido aún logrado (3-6). Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una técnica llamada Inmunoterapia Adoptiva la cual ha demostrado tener buenas posibilidades de éxito (7-10). Esta técnica se basa en la proliferación *in vitro* de células con propiedades antineoplásicas para posteriormente ser transfundidas al paciente (11-14).

Como una consecuencia del estudio del rechazo

Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, COE/IDA, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Servicio de Cabeza y Cuello del Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional (CMN), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México, D.F. Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Mediante Becas de Licenciatura y Maestría.
Correspondencia: Benny Weiss Steider, ENEP Zaragoza, Apartado Postal 9 020, 15000 México, D.F.

inmune, se ha encontrado la existencia de una familia de moléculas localizadas en la superficie celular llamadas Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), que intervienen en el rechazo contra células normales heterólogas, o sea que presentan distintos CMH (15). Por ejemplo para determinar la compatibilidad entre dos individuos, para evaluar una posible donación de órganos o tejidos, se efectúa una prueba llamada de Cultivo Mixto de Linfocitos (CML) (16). En esta técnica se ponen en co-cultivo los leucocitos de sangre periférica (LSP) de los posibles donadores y del paciente para detectar la probable proliferación de linfocitos inducida por el reconocimiento de CMH diferentes. Asimismo se encuentra bien identificado el factor que secretan estos linfocitos al ser activados, llamado Interleucina 2 (IL-2) el cual tiene además de la función de inducción a la proliferación de este tipo de células, la de activación de células citotóxicas (13, 17, 18).

Por otro lado se ha reportado que los LSP pueden ser activados en cultivo *in vitro* con IL-2 recombinante (rIL-2) para producir células citotóxicas dirigidas contra células tumorales (19). A tales células se les ha llamado células LAK (del inglés: *Lymphokine Activated Killer Cells*) y tiene la capacidad de lisis un amplio rango de células tumorales (20-23). Según estudios recientes este sistema efector parece ser diferente al de los linfocitos citotóxicos, pero semejante a las células NK (del inglés: *Natural Killer*) (19, 24-26).

El presente trabajo se efectuó con la finalidad de evaluar primero la posibilidad de obtener, en nuestras condiciones experimentales, cultivos celulares a partir de biopsias de tumores humanos, y segundo la de activar LSP heterólogos con rIL-2 para producir células LAK con capacidad citostática sobre estas células. La utilización de LSP heterólogos tiene como objeto la de desarrollar una técnica semejante a la del CML, que permita en un sólo ensayo evaluar el efecto citostático de las células LAK sobre células tumorales y tener una medida de histocompatibilidad. Ya que si se pudiera encontrar algún donador cuyos LSP sean activables a células LAK y simultáneamente compatibles con las del enfermo, entonces se podría evitar, para beneficio del paciente, la utilización de sus LSP autólogos en el tratamiento de inmunología adoptiva como se hace hoy en día.

MATERIAL Y METODOS

Condiciones de Cultivo. El medio de cultivo (MC) consistió de medio mínimo esencial de Eagle (Gibco, N.Y., EUA) complementado con 20% de suero fetal de bovino (Microlab, México) previamente desactivado a

57 °C durante 30 min. Al MC antes de ser utilizado se le agregó 100 U/ml de penicilina G (Lake-side, Toluca, México) y 50 ug/ml de estreptomitina (Lake-side, Toluca, México). Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de esterilidad e incubados a 37 °C en una atmósfera con 10% de óxido de carbono y humedad saturante a punto de rocío.

Material Biológico. Las células de origen tumoral fueron obtenidas a partir de biopsias de tres carcinomas diferentes (de pulmón, basocelular y de tiroides) y un sarcoma (osteosarcoma) de pacientes del Hospital de Oncología del CMN del IMSS. La línea de Células fibroblásticas de piel humana normal fueron donadas al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en México. La sangre periférica fue obtenida mediante punción venosa en presencia de 100 U/ml de heparina (20th Century Chemical de México, Guadalajara México) de cuatro donadores normales. La rIL-2 (Cetus Corporation, California, EUA) 100 U/ml fue donada por el M.D. Steven A. Rosenberg del Instituto Nacional del Cáncer en Bethesda, EUA.

Obtención de Células del Tejido Tumoral. Las biopsias fueron obtenidas en el quirófano y colocadas en MC. El traslado al laboratorio, en donde se procesaron estas biopsias, nunca tardó más de 12 hrs. después de la cirugía. Una vez llegada la muestra al laboratorio las biopsias fueron cortadas en pequeños trozos de aproximadamente 1 mm³ y lavados en MC suplementado con triple cantidad de antibióticos. Se emplearon dos métodos para la obtención de las células a partir del tejido tumoral. El primero fue por explante primario; el cual consistió en colocar los pequeños trozos de tejido tumoral en la superficie de cajas de cultivo de 60 x 15 mm (Costar, Cambridge, EUA) durante 15 min para facilitar su adhesión, para posteriormente adicionarles MC. Una vez que emigraron las células del tejido tumoral formado un explante, se procedió a separarlas del sustrato de cultivo mediante tripsinización para poder ser subcultivadas.

El segundo método empleado para la obtención de células del tejido tumoral fue mediante dos pasos de disgregación enzimática; para ello el tejido fue previamente mantenido en una solución amortiguadora de Verseno en incubación a 37 °C durante 15 min en agitación constante, para la eliminación de cargas de superficie. En seguida se llevó a cabo una digestión parcial con una solución de collagenasa Tipo IV (Sigma Chemical, St. Louis, EUA) al 0.125% durante 60 min a 37 °C en baño maría. Las células y el tejido parcialmente digerido fueron lavados mediante centrifugación. Este lavado consistió en resuspender la células en una solución salina amortiguada con

fosfatos (SAF) y centrifugarlas a 500 g durante 10 minutos para posteriormente desechar el SAF; este procedimiento se repite tres veces más y en la última centrifugación se resuspende en MC en lugar de SAF. Se completó la digestión del tejido tumoral mediante el empleo de una solución de tripsina al 0.25% (Sigma Chemical, St. Louis, EUA) durante 30 min a 37 °C en agitación continua en baño maría. Las células así obtenidas fueron nuevamente lavadas en SAF y resuspendidas en MC para finalmente ser puestas en cultivo.

Una vez que las células procedentes de los tejidos tumorales saturaron los sustratos de cultivos, estas fueron subcultivadas un par de veces más antes de ser empleadas en los experimentos.

Subcultivos celulares. Todos los subcultivos celulares se efectuaron mediante la técnica de tripsinización. Para esta técnica el MC de las células a ser subcultivadas es substituido por una solución de tripsina al 0.025% en SAF durante 5 minutos a temperatura ambiente, para desprender las células del sustrato de cultivo. Por lo general las células así obtenidas son sembradas en un número de 3×10^4 por caja de cultivo.

Obtención de Leucocitos de Sangre Periférica (LSP). Para cada ensayo se utilizó de 5 a 15 ml de sangre. Esta fue colocada en un gradiente con 5 ml de Ficoll-

Hypaque (Sigma Chemical, St. Louis, EUA) centrifugada durante 30 minutos a 1500 g para separar las células mononucleares. A continuación estos leucocitos fueron lavados y cuantificados para finalmente proceder a co-cultivarlos con las células provenientes del tejido tumoral. Por lo general 1×10^6 leucocitos se emplearon para cada co-cultivo.

RESULTADOS

Determinación de las Cinéticas de Proliferación de las Células Provenientes de las Biopsias Tumorales (CPBT).

Para determinar la cinética de proliferación que presentaban las diferentes CPBT se hicieron subcultivos utilizando 3×10^4 células en cajas de Petri de 35×15 mm (Costar, Cambridge, EUA) con un volumen final de 2.5 ml de MC. La cinética de proliferación se determinó contando el número de células en cultivo cada tercer día hasta llegar a saturación mediante un hemocitómetro Neubauer (American Optical, EUA). Obtuvimos que todos los tejidos tumorales dieron origen a células con diferentes tiempos de doblaje *in vitro* (Figs. 1-5).

Las CPBT con proliferación más lenta provienen de un osteosarcoma (OSX-4) y presentaron un tiempo de doblaje de 121 hrs. Otras dos CPBT provenientes

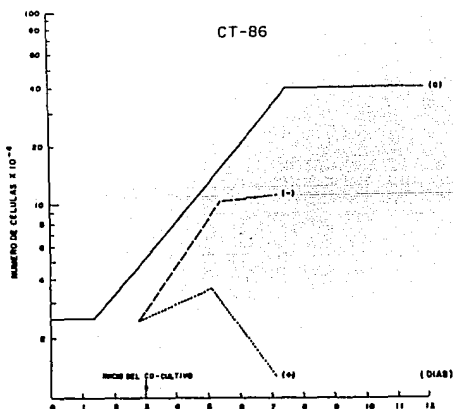


FIG. 1 Cinéticas de proliferación de células provenientes de una biopsia de carcinoma de tiroides (CT-86) en condiciones normales (0), en co-cultivo con leucocitos de sangre periférica (LSP) (-) y en co-cultivo con LSP en presencia de 100 U/ml de Interleucina-2 recombinante (rIL-2) (+).

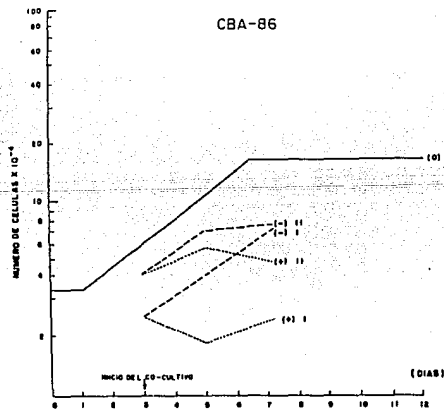


FIG. 2 Cinéticas de proliferación de células provenientes de una biopsia de carcinoma basocelular (CBA-86) en condiciones normales (0), en co-cultivo con leucocitos de sangre periférica (LSP) (-), y en co-cultivo con LSP en presencia de 100 U/ml de Interleucina-2 recombinante (rIL-2) (+).

de un carcinoma de pulmón (CPL-1) y de un carcinoma basocelular (CBA-86) presentaron una proliferación intermedia, con valores de tiempo de doblaje de 62.5 y 59 hr respectivamente. Por último las células que presentaron mayor poder de proliferación con un tiempo de doblaje de 40.6 hrs fueron aquellas CPBT provenientes de un carcinoma de tiroides (CT-86). Es interesante hacer notar que las células normales de tipo fibroblástico (VC-2) presentaron un tiempo de doblaje mucho menor al de las CPBT, con solamente 33 horas.

Determinación de la Inhibición de la Proliferación de las CPBT por co-cultivo con Leucocitos de Sangre Periférica (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 CPBT en presencia de LSP, así como del papel que juega la IL-2 en este proceso, se evaluó la cinética de proliferación de cada CPBT en co-cultivo con 1×10^6 LSP, tanto en ausencia como en presencia de 100 U/ml de rIL-2.

No en todos los casos de co-cultivos con LSP se presentó inhibición a la proliferación de las CPBT, sin embargo cuando esta inhibición estaba presente siempre fue menor a la encontrada en los co-cultivos con la rIL-2 (Figs. 1-5). Asimismo siempre obtuvimos una inhibición a la proliferación de las CPBT en presencia simultánea de LSP y rIL-2. La inhibición

por LSP no pudo ser evaluada en la CPL-1 pues estas CPBT se perdieron por contaminación.

En ninguno de los co-cultivos con LSP en ausencia de rIL-2 se presentó inhibición a la proliferación de las CPBT durante los primeros dos días de cultivo. Probablemente esto refleje el hecho de que las LSP que reconocen el CMII no se activen antes de este período de tiempo. En sólo dos casos (Fig 1 y Fig 2) se presentó una inhibición a partir del tercer día de co-cultivo. No sabemos la razón del porque algunos co-cultivos son inhibidos por LSP heterólogos antes que otros, pero creemos que justamente tiene que ver con la histocompatibilidad entre las LSP y las CPBT. Esta suposición es reafirmada por el hecho de que cuando el CBA-86 fue co-cultivado con LSP de dos diferentes donadores; en un caso (I) no se presentó inhibición alguna, mientras que en el otro (II) la inhibición fue importante (Fig. 2).

Consideramos que la inhibición de los CPBT mediada por los LSP en presencia de rIL-2 fue mucho mayor que en ausencia de este factor debido a dos probables mecanismos. Uno se explicaría por la activación citotóxica de las células que reconocen el MHC, y el otro por la presencia de células LAK que reconocen antígenos tumorales. Es importante hacer notar que el co-cultivo con células normales (BC-2) fue el único caso en donde se observaron diferencias poco significativas entre los co-cultivos con rIL-2 de aquellos

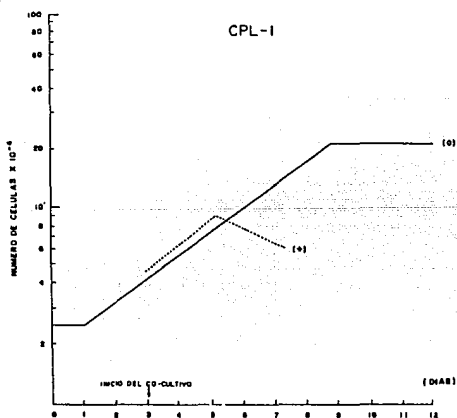


FIG. 3 Cinéticas de proliferación de células provenientes de una biopsia de carcinoma de pulmón (CPL-1) en condiciones normales (O) y en co-cultivo con leucocitos de sangre periférica en presencia de 100 U/ml de Interleucina-2 recombinante (+).

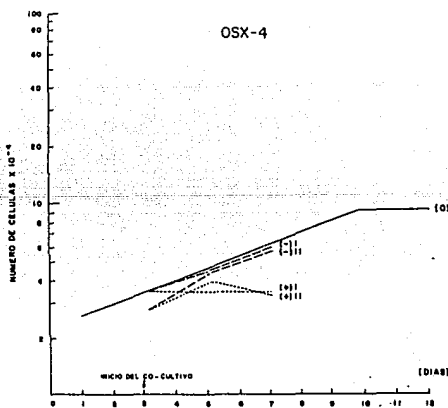


FIG. 4 Cinéticas de proliferación de células provenientes de una biopsia de osteosarcoma (OSX-4) en condiciones normales (O), en co-cultivos con leucocitos de sangre periférica (LSP) (-) y en co-cultivo con LSP en presencia de 100 U/ml de interleucina-2 recombinante (rIL-2) (+).

sin el factor (Fig. 5). Este comportamiento ilustra el hecho conocido de que las células LAK no interactúan con células normales por carecer estas de antígenos tumorales. En consecuencia creemos que las diferencias encontradas en la inhibición de la proliferación de las CPBT en presencia de rIL-2 bien pudo deberse a la existencia de neoantígenos de dichas células.

Es importante hacer notar que en dos casos los co-cultivos con sólo LSP no inhibieron la proliferación de las CPBT aún después de cuatro días, mientras que cuando se agregó la rIL-2 esta inhibición fue muy fuerte aún desde el comienzo del co-cultivo (Figs. 2 (I) y 4 (II)). Este comportamiento ilustra el caso ideal que se busca encontrar con esta técnica, en donde no se presenta inhibición a la proliferación en ausencia de rIL-2, por la posible existencia de semejanzas en los MHC de las células en co-cultivo, y por el otro lado una muy fuerte acción citostática al agregar la rIL-2, probablemente por que las LSP reconocen algún antígeno tumoral.

DISCUSION

Hoy en día los investigadores biomédicos tanto básicos como clínicos hacen grandes esfuerzos por tratar de entender los mecanismos asociados a la proliferación neoplásica. Muchos de estos estudios están

encaminados al diseño de tratamientos cada vez más adecuados para este tipo de enfermedad. 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 basadas principalmente en los conocimientos derivados de la investigación y del desarrollo tecnológico de nuestra época. Entre estos esfuerzos destacan aquellos que se apoyan en la supuesta acción antitumoral del sistema inmune. Una de estas alternativas de terapia se encarga de aumentar *in vitro* el número de células con capacidad de eliminar células malignas, para después ser transfundidas *in vitro*. Esta técnica llamada Inmunoterapia Adoptiva ha demostrado recientemente importantes avances en pacientes con cáncer metastásico. Por tanto se abren grandes posibilidades de aplicación de esta técnica en oncología.

La Inmunoterapia adoptiva ha sido ya aplicada en algunos pacientes con cáncer avanzado, reportándose curaciones completas en aproximadamente 5% de los cánceres metastásicos a vísceras y también en melanomas (27). No obstante, en el 95% de pacientes restantes en los cuales la Inmunoterapia adoptiva no les fue de utilidad, se presentaron efectos altamente tóxicos principalmente asociados al uso de la Interleucina-2 recombinante (rIL-2). Es evidente pues que surge la necesidad de desarrollar técnicas más eficaces y menos tóxicas si se desea ayudar a un grupo más amplio de pacientes con cáncer. Una posibilidad de estudio lo representa el desarrollo *in vitro* de pruebas de inmunosensibilidad que pueda determinar que paciente es susceptible de seguir un tratamiento con Inmunoterapia adoptiva y no tener que someter a aquellos que no vayan a responder positivamente a un proceso tan desgastante física y moralmente.

Si se parte del hecho de que las células malignas tiene en su superficie neoantígenos, o sea antígenos tumorales capaces de ser reconocidos por las células inmunocompetentes, entonces una prueba *in vitro* podría estar diseñada justamente para tal detección. De tal manera que se podrían generar células Inmunes reactivas específicamente a antígenos tumorales con una gran actividad citotóxica.

La inhibición encontrada en éste trabajo de la proliferación de células provenientes de biopsias tumorales (CPBT) de 4 diferentes tumores por leucocitos de sangre periférica (LSP) de 4 diferentes tumores por leucocitos de sangre periférica (LSP) de donadores heterólogos, nos hace suponer que estos últimos reconocen cierta estructura de las CPBT que desencadenan su activación. Es probable que estas estructuras sean tanto del complejo mayor de histocompa-

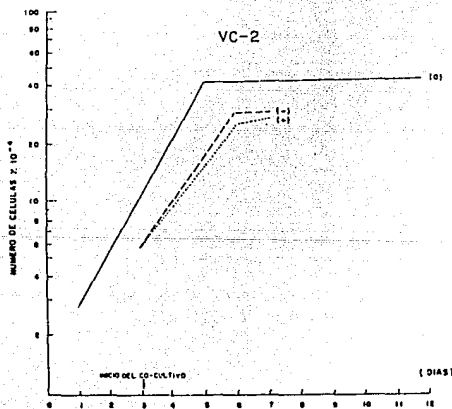


FIG. 5. Cinéticas de proliferación de células de fibroblastos normales (VC-2) en condiciones normales (0), en co-cultivo con leucocitos de sangre periférica (LSP) (-) y en co-cultivo con LSP en presencia de 100 U/ml de Interleucina-2 recombinante (rIL-2) (+).

bilidad (CMH), como de la existencia de neoantígenos tumorales. Por el momento no contamos con datos suficientes del tipo de CMH de cada uno de los pacientes y del donador de LSP y por tanto no se puede determinar si el diferente grado de inhibición a la proliferación de las CPBT sea por la existencia de diferentes CMH.

Sin embargo, cuando se utilizan los co-cultivos con rIL-2 se sabe que se desarrollan células asintomas que reconocen exclusivamente neoantígenos y no los CMH. Por tanto las diferencias de inhibición encontradas en las diferentes CPBT en los co-cultivos con rIL-2 tiene grandes posibilidades de reflejar la existencia de antígenos tumorales en dichas células. En el control en el cual se utilizó células fibroblásticas de un donador normal no se obtuvo una inhibición diferente cuando se utilizaron sólo las LSP heterólogoas y cuando la rIL-2 estaba presente. Suponemos que en el caso de las células normales no se presentó el aumento de inhibición por el hecho de que en este tipo de células no se encuentran antígenos tumorales.

Creemos que el tipo de ensayo aquí descrito pueda tener una ventaja importante respecto a los ya existentes ya que al utilizar células de donadores normales para la obtención de células efectoras no se sangra al paciente. Por otro lado cuando en nuestro ensayo se detecta que existe inhibición muy importante en presencia de rIL-2 y casi ninguna en ausencia de este factor, se podría suponer que este ensayo con LSP es ideal para ser utilizada en la inmunoterapia adoptiva del paciente cuyo tumor dio origen a las CPBT, puesto que la activación contra el MHC es leve mientras que contra algún otro determinante de la célula tumoral es fuerte. Por otro lado si las LSP solas presentan una gran inhibición a la proliferación de las células tumorales aún en ausencia de rIL-2, entonces podríamos suponer que estas son incompatibles con el paciente y no deben ser utilizadas.

Evidentemente nuestra suposición se basa en que el comportamiento *in vitro* sea semejante al que se presenta *in vivo* y esto se tiene que demostrar clínicamente antes de poder ser aceptado como una alternativa de tratamiento. Además muchos tumores más tendrán que ser analizados y con diversos LSP para poder generalizar nuestros resultados. Sería conveniente efectuar pruebas de histocompatibilidad para poder confirmar el hecho ya bien establecido de que no hay inhibición *in vitro* cuando no existen diferencias entre los MCH de los LSP y las células blanco.

Consideramos que si los resultados aquí expuestos se corroboran mediante estudios más exhaustivos, se podrá contribuir de forma importante a la aplica-

ción de la inmunoterapia adoptiva en pacientes en donde se esperaría una respuesta positiva, y no en forma indiscriminada como hasta hoy en día.

BIBLIOGRAFIA

1. B Benacerraf, R Unanue E: *Inmunología. Editado por Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1986.*
2. IM Rollit, J Brostoff, D Male: *Immunology. Edited by The C.V. Mosby Co., St Louis Toronto, Canada, 1985.*
3. D Stites P, D Slobó J, Funderberg III, J Well V: *Inmunología básica y clínica. Editado por El Manual Moderno S.A. 1985.*
4. Mule JJ, Shu S, Schwartz SL, Rosenberg SA: *Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cell and recombinant interleukin-2. Science 225: 1-187, 1984.*
5. Sondel PM, Hank JA, Koller PC, Chen BP, Mini-coll DZ, Molenda JA: *Destruction of autologous human lymphocytes by interleukin-2 activated cytotoxic cells. J. Immunol. 137:502, 1986.*
6. Salup RP, Williford RH: *Adjuvant immunotherapy of established murine renal cancer by interleukin-2 stimulated cytotoxic lymphocytes. Cancer Res. 46: 3358, 1986.*
7. Shu S, Rosenberg SA: *Adoptive immunotherapy of newly induced murine sarcomas. Can Res. 45: 1657, 1985.*
8. Riddell S, Cheever MA, Greenberg PD: *Interleukin-2 in cancer immunotherapy. Atlas of Sci. Immunology, 175, 1988.*
9. Durant JR: *Immunotherapy of cancer. The New Engl. J. of Med. 316: 939, 1987.*
10. Muul LM, Director EP, Hyatt CL, Rosenberg SA: *Large scale production of human activated killer cells for use in adoptive immunotherapy. J. Immunol. Methods, 88: 265, 1986.*
11. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, Seipp CA, Simpson CG, White DE: *A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine*

- activated killer cell and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *J. of Med.* 316: 889, 1987.
12. Shu S, Chou T, Rosenberg SA: *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, 1986.
 13. Gately MK, Wilson DE, Wong HL: Synergy depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses *in vitro*. *The J. of Immunol.* 136: 3910, 1986.
 14. Klein HG, Leitman SF: *Adoptive immunotherapy in the treatment of malignant disease*. *Transfusion* 29 (2): 170, 1989.
 15. WE Paul: *Fundamental immunology*. Edited by Raven Press, New York, USA, 1986.
 16. Vanky F, Gorsky J, Gorsky Y, Massucci M, Klein E: *Lysis of tumor biopsy cells by autologous T lymphocytes activated in mixed cultures and propagated with T cell growth factor*. *J. Exp. Med.* 155: 83, 1982.
 17. Rosenberg SA, Grimm EA, McGrogan M, Doyle M, Kawasaki E, Kohls K, Mark DF: *Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in E coli*. *Science* 223: 1412, 1984.
 18. Bendtsen K: *Biological properties of interleukins*. *Allergy* 38: 219, 1983.
 19. Anichini A, Fossati G, Parmiani G: *Clonal analysis of the cytolytic T-cell response to human tumors*. *Immunol. Today* 8 (12): 385, 1987.
 20. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA: *Lymphokine activated killer cell phenomenon*. *J. Exp. Med.* 155: 1823, 1982.
 21. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA: *Lymphokine activated killer cell phenomenon II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocyte, memory cytotoxic thymus derived lymphocyte, and natural killer cells*. *J. Exp. Med.* 157: 884, 1983.
 22. Tilden AB, Itoh K, Balch ChM: *Human lymphokine activated killer (LAK) cells: identification of two types of effector cells*. *The J. of Immunol.* 138: 1068, 1987.
 23. Rayner AA, Grimm EA, Lotze MT, Chu EW, Rosenberg SA: *Lymphokine-activated killer (LAK) cells: Analysis of factors relevant to the immunotherapy of human cancer*. *Cancer* 55(6): 1327, 1985.
 24. Morgan DA, Russell SW, Gallo RC: *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*. *The Science* 193: 1007, 1976.
 25. Kabelts D, Kirchner H, Armending D, Wagner H: *Recombinant interleukin-2 rapidly augments human natural killer cell activity*. *Cell. Immunol.* 93: 38, 1985.
 26. Brodley EC, Konrad M, De Groat S, Doyle M, Celus Co, Emerville CA, Lowrtz R: *In vivo normalization of NK activity in patients with cancer treated with interleukin-2*. *Proc. of AACR* 27: 351, 1986.
 27. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, Selpp CA, Simpson CG y White DE: *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, 1987.



**Poster Presentation
Tumor Progression/
Invasion/Metastasis**

A 2

A2 096.06

Expression of cellular oncogenes in murine carcinoma cells with different metastatic potential

A. Sacchi, D. Perrotti, L. Cimino, and S. Ferrari, Italy

A2 096.07

Diverse specificities of mouse monoclonal antibodies reacting with neuraminidase treated human erythrocytes and breast carcinoma cell lines

E. Roller, B. Benz, B. Fritz, B. Klump, and K. Schumacher, Fed. Rep. of Germany

A2 096.08

Lectin binding differences between AKR lymphoma malignancy variants

O. Klein, A. Pinchassov, and J. Leibovici, Israel

A2 096.09

The evaluation of malignant tumors potential according to their influence on the secondary messengers system of autologous lymphocytes

N. Volodko and T. Yuk, USSR

A2 096.10

Purification and characterization of tumor invasion inhibitory factors

A. Isoai, Y. Hama, K. Shinkai, M. Mukai, T. Akedo, and H. Kumagai, Japan

A2 096.11

Localization of cathepsin B in human lung carcinoma cell lines

G. Treitz, M. Erdel, A. Brünig, E. Spiess, and W. Ebert, Fed. Rep. of Germany

A2 096.12

Neoglycoenzymes detect metastasis-associated differences in murine tumor model systems

H.-J. Gabius, V. Schirmacher, S. S. Joshi, H. Franz, and S. Gabius, Fed. Rep. of Germany

A2 096.13

Difference in attachment to organs of AKR lymphoma variants of malignancy

M. Huszar, O. Klein, A. Staroselsky, M. Michowitz, and J. Leibovici, Israel

A2 096.14

Recombinant tumor necrosis factor promotes a hematogenic metastasis formation in lungs of C57BL/6 mice

V. G. Pinchouk, I. Kudryavets, and L. P. Didkovskaya, USSR

A2 096.15

Establishment of cervical cancer cells in lines with fibroblastic morphology and positive for antidesmoglein

R. Rangel, L. Rocha, A. Monroy, R. Martinez, J. Martinez, G. Solorsa, J. Lopez-Cueto, C. Trejo, and B. Weiss-Steider, Mexico

A2 096.16

GnRH-analog therapy reduces plasminogen activator inhibition - a longitudinal study of fibrinolysis

U. Winkler, K. Bühler, S. Koslowski, and A. E. Schindler, Fed. Rep. of Germany

A2 096.17

Liver colonization of F9 teratocarcinoma cells: Organ specific effects

D. Rusciano, P. Lorenzoni, and M. M. Burger, Switzerland

A2 097.01

Induction of complete cure of mouse leukemia by timely cyclophosphamide therapy with an optimal dose

A. Matsuzawa, Y. Takeda, and H. Ozawa, Japan

A2 097.02

Hypoxic influence upon tumorigenicity

D. C. Giuliani, USA

A2 097.03

Withdrawn

A2 097.04

Selection and characterization of human melanoma xenograft lines with different liver-colonizing capacity

A. Ládányi, J. Timár, and K. Lapis, Hungary

**Poster Presentation
Tumor Progression/
Invasion/Metastasis**

A2 097.05

Penile and vulva cancer

Müller-Mattheis, Kaurmann, Fed.

A2 097.06

Host organ microhomology of tumor abilities

L. Puricelli, D. Gori, E. Bai de Kier Joh

A2 097.07

Differences between the metastatic potential related to the acid phosphatase activity

Kjonniksen, H. O. Fodstad, Norway

A2 098.01

Relationship between expression of neural cell adhesion molecules

M. Kenmotsu, A. H. Kashino, and

A2 098.02

In vitro study of cells, with specific cancer cell adhesion

S. Igarashi, T. Ki

A2 098.03

Detection of fibrinogen secreted by cultured cells

H. Wakabayashi, Japan

A2.096.12

NEOGLYCOENZYMES DETECT METASTASIS-ASSOCIATED DIFFERENCES IN MURINE TUMOR MODEL SYSTEMS.

H.-J. GABLIUS, V. SCHREMMACHER, S.S. JOSHI,
H. FEENZ, S. GABRIUS

The physiological importance of selective protein-carbohydrate interactions in tumor biology is increasingly appreciated and exploited (H.-J. Gablius, Angew. Chem. Int. Ed. 27, 1267, 1995). To quantify cell surface expression of sugar receptors (lectins) of native cells, chemical glycosylation of *E. coli* β -galactosidase leads to a versatile glycoecytological tool (S. Gablius et al., Anal. Biochem., in press). Model systems of strongly versus weakly metastatic cells including the lymphoma Eb/Esb, the lymphosarcoma RAW117 P/H10 and the melanoma B16 F1/F1a were quantitatively assessed for cell surface binding using a panel of neoglycoenzymes, carrying components of the carbohydrate part of cellular glycoconjugates. Significant differences in receptor quantity were revealed, e.g. for galNAc-exposing probes. Differential binding of tumor cells to plastic-immobilized neoglycoproteins substantiated that such alterations can translate into notable changes of lectin-mediated adhesion. Moreover, modulation of lectin expression was seen after chemically induced differentiation. The measured differences may have a bearing on adhesive contacts during the metastatic process.

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Hermann-Rein-Str. 3, D-3400 Göttingen, FRG

A2.096.13

DIFFERENCE IN ATTACHMENT TO ORGANS OF AKR LYMPHOMA VARIANTS OF MALIGNANCY

M. HUSZAR, O. KLEIN, A. STAROSELSKY, M. MICHOWITZ and J. LEIBOVICI

The cell properties which determine the complex phenotype of metastasis are not yet fully understood. One model for the study of the metastatic process is the use of malignancy variants of the same tumor. We have developed such a model in the AKR lymphoma. Three variants differing markedly in their metastatic capacity, were recently been isolated and characterized: the TAU-29, TAU-33, and TAU-38, of low (LM), intermediate (IM), and high (HM) malignancy, respectively. The variants have been found to differ in the late phase of the metastatic process. In the present study, organotropism of the 3 variants was evaluated by an *in vitro* model. The attachment of tumor cells to organ sections (fresh frozen sections heated at 37°C) of normal AKR mice was examined. The cells derived from the variant of highest aggressiveness, TAU-38, attached with the highest avidity (3-4 times) to liver sections as compared to the two other variants. The 3 variant cells attached in large numbers to spleen sections. A quantitative comparison was however not possible with this organ since tumor cell attachment was not homogeneously distributed. The lymphoma cells attached preferentially to the red pulp regions, leaving the white pulp free. Attachment to kidney sections was minimal. Information on cell properties essential for the completion of the metastatic process may eventually lead to a better programming of drugs suitable for the treatment of metastatic disease.

Department of Pathology, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University, 69978 Tel-Aviv, Israel.

A2.096.14

RECOMBINANT TUMOR NECROSIS FACTOR PROMOTES A HEMATOGENIC METASTASIS FORMATION IN LUNGS OF C57BL/6 MICE

V.G. PINCHOUK, YU. I. KUDRYAVETS, L.P. DIDKOV-

SKAYA

The recombinant tumor necrosis factor (rTNF) was injected intravenously to the C57BL/6 mice at a dose of 10 μ g. in 1, 4 or 24 hours before or in 4 Hrs after the i.v. inoculation of the LL (Lewis carcinoma) or MM-4 (B-16 melanoma) cells. The significant increase of the hematogenic metastasis in the lungs of animals was observed. The above rTNF effect could be considerably inhibited with a single heparin injection (5 μ g.)

It provides supposition of involvement into the metastasis stimulating rTNF effect its ability to modulate the endothelial cells hemostatic properties.

252022, R.E.Kavetsky Institute for Oncology Problems, Ukrainian SSR Academy of Sciences, Kiev.

A2.096.15

ESTABLISHMENT OF CERVICAL CANCER CELLS LINES WITH FIBROBLASTIC MORPHOLOGY AND POSITIVE FOR ANTIDSMOGLEIN.

R. RANGEL, L. ROCHA, A. MONROY, *R. MARTINEZ, **J. MARTINEZ, ***G. SOLARSA, ***I. LOPEZ-CUETO, **C. TELLO, B. WEISS-STEIDER

Cells from one normal cervical and from two cervical tumours biopsies were obtained by enzymatic digestion and maintained in tissue culture. Two different types of cell morphology developed. One had the typical "epithelial" appearance, while the other had the typical dispersed fibroblastic one. Nevertheless both cell types resulted positive for antidesmoglein, thus pointing to their epithelial origin. The fibroblast looking cells were positive only in the cytoplasm, while the epithelial looking cells were also positive on the cell membrane. Taking into consideration that the previous publications concerning the establishment of malignant cervical cell lines, all the cells with fibroblastic morphology were considered as contaminant and thus discarded, these results suggest the use of a simple test to avoid eliminating the possible malignant cells. Our results also point to the fact that some tumour cervical cells have lost the possibility to form desmosomes

© 1995 ICAAC

Re mark: CIPROIT and CIPAA, 1996 for scientific publications.
Laboratory of Cellular Differentiation and Cancer, ENEP-SARAGOZA, National University of Mexico, A.P. 9-020, Mexico 06100, D.F. Mexico, no.
*Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Secretaría de Salud, México, D.F.
**National Cancer Institute of Mexico, D.F.

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN PRESENCIA DE
SUEROS DE PACIENTES CON CANCER CERVICO-UTERINO E INTERLEUCINA-2
RECOMBINANTE.

M en C. ROSALVA RANGEL CORONA, BIOL. ALBERTO MONROY GARCIA, BIOL.
LETICIA ROCHA ZAVALA, BIOL. CATALINA TREJO BECERRIL, DR. JOSE
LUIS RAMIREZ GAITAN, DR. LUIS MENDEZ MORAN, DR BENNY WEISS
STEIDER.

LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER, ESCUELA NACIONAL
DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA, SECRETARIA DE INVESTIGACION,
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO (U.N.A.M.), SERVICIO DE
TUMORES GINECOLOGICOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA DE
LA SECRETARIA DE SALUD, SERVICIO DE GINECOLOGIA ONCOLOGICA DE LA
CLINICA DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA No. 4 (I.M.S.S.), MEXICO
D.F.

APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT)
Y LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO DE LA
U.N.A.M (DGAPA) MEDIANTE BECAS DE LICENCIATURA Y MAESTRIA.

CORRESPONDENCIA: DR. BENNY WEISS STEIDER
E.N.E.P. ZARAGOZA
APARTADO POSTAL 9-020
MEXICO 15000, D.F.
MEXICO.

Recibido
8/11/91
Aliviado