

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES \* ZARAGOZA \*

LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

"ANTI-CD3 UNIDO A MONOCITOS SINERGIZA EN LA PROLIFERACION DE  
LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CANCER  
CERVICO-UTERINO INDUCIDA POR INTERLEUCINA-DOS"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
B I O L O G O  
P R S E N T A  
MIGUEL ANGEL RAMIREZ ROMERO

MEXICO, D. F.

MAYO DE 1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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.

## INDICE

	PAGINAS
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MARCO TEORICO	
EL SISTEMA INMUNE.....	3
INMUNIDAD NATURAL.....	4
INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	8
LINFOCITO B.....	9
LINFOCITO T.....	11
EL COMPLEJO MOLECULAR RCT-CD3.....	13
INTERLEUCINA DOS.....	16
CANCER CERVICO-UTERINO.....	18
LA INMUNOTERAPIA.....	19
HIPOTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL Y METODO.....	23
RESULTADOS.....	31
DISCUSION DE RESULTADOS.....	53
CONCLUSIONES.....	63
SUGERENCIAS.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	66
APENDICES.....	76

## RESUMEN

Los linfocitos T se encargan de la respuesta inmune celular contra células tumorales. Se han desarrollado investigaciones para inducir la activación a la proliferación de estas células mediante varios factores, destacando entre ellos la interleucina-2 y más recientemente anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el complejo molecular *CD3*; que se encuentra presente en todas las células T y cuya función es la de transmitir señales hacia el núcleo.

La activación de linfocitos T citotóxicos via el receptor *CD3*, puede tener importantes implicaciones en el tratamiento del cáncer; sin embargo, aun no se han estandarizado las condiciones del uso de *anti-CD3* en la proliferación de linfocitos T.

En base a lo anterior, se investigó el efecto que tiene el anticuerpo monoclonal *anti-CD3* soluble y unido a monocitos, sobre la proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con cáncer cérvico-uterino (*CaCu*), en presencia y ausencia de interleucina-2 recombinante humana (*IL-2rh*).

Inicialmente, mediante la evaluación morfológica de los leucocitos adherentes al plástico (*LA*) se demostró la predominancia de monocitos, mientras que los leucocitos no adherentes al plástico (*LNA*) proliferantes presentaron una morfología linfoide.

Los resultados obtenidos con el uso de *anti-CD3* demostraron que el anticuerpo usado en forma soluble no indujo la proliferación de linfocitos T, y que la combinación de *anti-CD3* soluble e *IL-2rh* inhibió la proliferación linfocítica de manera dosis-dependiente. Por otra parte, se encontró que con 2.5 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$  de *anti-CD3* unido a monocitos se favoreció la proliferación de linfocitos T de manera similar a como lo hace la *IL-2rh* por sí sola; mientras que como se esperaba, la adición de *IL-2rh* a este sistema aumentó notablemente la proliferación linfoide. Asimismo, se encontró que el medio condicionado por monocitos tuvo una importante actividad coestimuladora en la proliferación de linfocitos T.

Se discute la posibilidad del uso de linfocitos T activados con *anti-CD3* unido a monocitos, así como el uso de monocitos tratados con el anticuerpo, para el tratamiento inmunoterapéutico del *CaCu*.

## INTRODUCCION

El papel del *CD3* en la activación de linfocitos T se ha estudiado mediante el uso de anticuerpos dirigidos hacia este marcador de membrana, demostrando que el *anti-CD3* provoca en células linfoides, la transmisión de señales al núcleo que conducen a la proliferación (1,2,3), la citotoxicidad, la expresión de receptores para *IL-2* y a la síntesis de *IL-2* (4,5).

Las respuestas obtenidas con el uso de *anti-CD3* han sido muy variadas y han dependido entre otras cosas: de su forma de uso (soluble o en forma adherida), del isotipo del anticuerpo (tipo de IgG), de la cadena particular del complejo *CD3* con la que reacciona el anticuerpo y de la concentración de anticuerpo.

El *anti-CD3* en forma soluble induce la proliferación de linfocitos T cuando se emplea solo, o en combinación con *IL-2*, o con ésteres de forbol (6,7,8). En otros estudios en los cuales el *anti-CD3* se ha utilizado en forma de enlace cruzado (adherido a superficies plásticas o a células presentadoras de antígeno u otros sustratos), se ha encontrado una adecuada activación linfoide a la proliferación y síntesis de linfocinas (7,9,10,11).

Con base en lo mencionado anteriormente, y considerando que existe la posibilidad de utilizar *anti-CD3* para activar linfocitos T de pacientes con cáncer y usar las células así activadas en el tratamiento de la enfermedad, el presente trabajo se realizó con la finalidad de estudiar el efecto del *anti-CD3* soluble y unido a leucocitos adherentes, sobre la proliferación de linfocitos T de pacientes con cáncer cérvico-uterino inducida por *IL-2* recombinante humana (*IL-2rh*).

La realización de este tipo de estudios contribuyen al establecimiento de un método para activar linfocitos T de pacientes con cáncer en el que se pueda omitir el uso de *IL-2rh*, cuya aplicación terapéutica se ha demostrado que provoca efectos tóxicos.

## MARCO TEORICO

### EL SISTEMA INMUNE.

Los seres humanos vivimos en un ambiente en el que existe un sin número de agentes que potencialmente son capaces de causar enfermedades. Ante esta situación, nuestro organismo ha evolucionado de tal forma que ha desarrollado un sistema de vigilancia y protección conocido como *Sistema Inmune*, que permite defendernos de la acción de agentes patógenos, manteniendo una "*Memoria Inmunológica*" que hace más eficiente la defensa del cuerpo en futuros encuentros con el agente agresor (12,13).

El sistema inmune esta conformado por células sanguíneas, conocidas como *Leucocitos* o *células blancas*, y por una variedad de tejidos linfoides que dan lugar a la compleja arquitectura del sistema inmunológico (14). Los leucocitos son células que circulan constantemente entre los vasos sanguíneos y nódulos linfáticos, mientras que el resto de los tejidos inmunes se encuentran estratégicamente localizados en nuestro cuerpo para atrapar partículas o células extrañas conocidas como *Antígenos (Ags)*, y servir de escenario para el establecimiento de la respuesta inmune (15).

De manera general, se puede decir que la respuesta inmune se divide en dos líneas de defensa interconectadas entre sí; una de ellas es conocida como *Inmunidad Natural* o *Innata* y la otra como *Inmunidad Adaptativa* o *Específica*. Las diferencias entre ambas son claras, caracterizándose la primera por la ausencia de reconocimiento específico de *Ags*, mientras que la segunda

reconoce de manera específica a los Ags y es capaz de generar memoria inmunológica (16).

#### **INMUNIDAD NATURAL.**

Consiste en la acción combinada de una serie de factores y eventos innatos del individuo que están dirigidos a cualquier antígeno extraño, lo cual hace de la inmunidad natural un mecanismo muy importante para la supervivencia de las especies (17).

En la defensa innata del organismo, la piel y las superficies mucosas de vías respiratorias y urogenitales, así como factores humorales y células sanguíneas de acción inespecífica conforman la primera línea defensiva del organismo [Tabla 1] (18).

<b>BARRERA ANTIMICROBIANA</b>	<b>FUNCION INMUNOLOGICA</b>
<b>PIEL</b>	Barrera física que impide la penetración microbiana. Presencia de ácido láctico y ácidos grasos en sudor y secreciones sebáceas con propiedades microbicidas.
<b>SECRECIONES MUCOSAS</b>	Las secreciones mucosas de células presentes en vías respiratorias y urogenitales atrapan antígenos que son eliminados por las células ciliadas de estos órganos.
<b>FACTORES HUMORALES</b>	Sustancias antimicrobianas presentes en la sangre, tales como la lisozima, la proteína C reactiva, el complemento y algunas citocinas que destruyen o inhiben el crecimiento de patógenos.
<b>CELULAS SANGUINEAS</b>	En la circulación sanguínea se encuentran leucocitos llamados monocitos, granulocitos y células NK, que atacan inespecíficamente a una gran variedad de cuerpos extraños.

**TABLA 1: Barreras defensivas que conforman a la Inmunidad Natural**

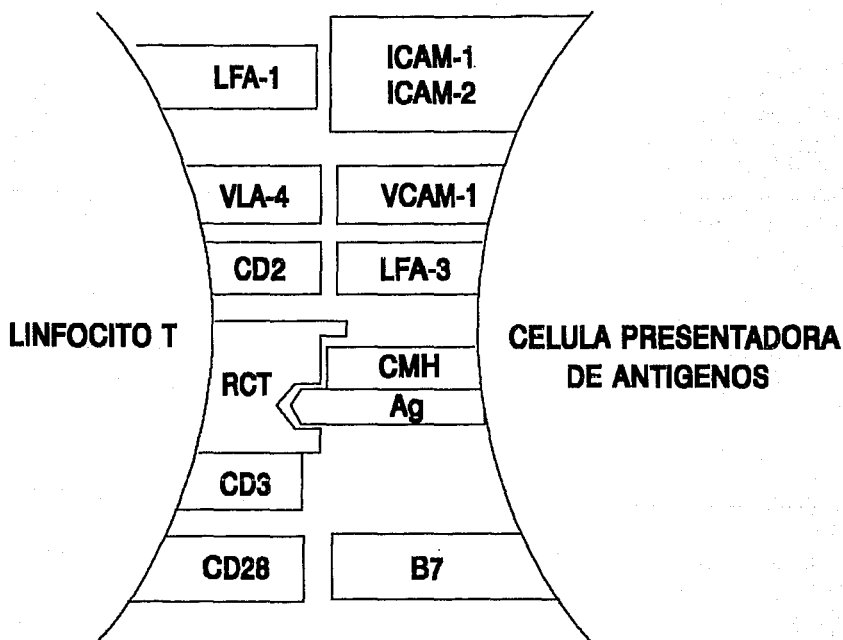
Las células sanguíneas encargadas de la defensa natural son los *Monocito-Macrófagos*, *Granulocitos* (*Neutrófilos*, *Eosinófilos*, *Basófilos*) y células *NK* (del inglés *Natural Killer*). Todas se originan en la médula ósea, y al ser liberadas a la circulación sanguínea desarrollan su papel defensivo lisando cuerpos extraños (*Citólisis*) o inhibiendo su crecimiento (*Citóstasis*) (18).

Refiriendo particularmente el papel inmunológico de los monocito-macrófagos, estas células ejercen su acción citolítica fagocitando antígenos o células extrañas (19,20). El mecanismo de fagocitosis es el primer paso de una serie de eventos en los que el *Ag* sufre un procesamiento metabólico que conduce a su degradación en segmentos regulares que varían de 5 a 20 aminoácidos (21,22). Una gran parte del *Ag* degradado es exocitado y eliminado del organismo, mientras que otra parte, la más antigénica, se asocia con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (*CMH-I* y *CMH-II*) y es conducida hacia la membrana de la célula fagocítica (23). La asociación entre los péptidos antigénicos y las moléculas del *CMH* es de suma importancia, debido a que en estas condiciones los macrófagos funcionan como células presentadoras de antígeno (*CPA*) para otros leucocitos conocidos como linfocitos T, sirviendo así como puente de unión entre los mecanismos de inmunidad natural y adaptativa (24,25,26).

Además de su función como *CPA*, los monocitos-macrófagos co-estimulan la proliferación de linfocitos T a través de receptores de membrana como el *LFA-3* (antígeno asociado a función linfocitaria, del inglés *lymphocyte function-associated antigen-*



3) y las proteínas *ICAM-1* e *ICAM-2* (molécula de adhesión intercelular, del inglés intercellular adhesion molecule-1 y -2) (27,28,29,30) [Figura 1]. Asimismo, también secretan una gran cantidad de citocinas (proteínas que participan en la comunicación intercelular) involucradas en la regulación de la respuesta inmune [Tabla 2] (28,30,31).



**Figura 1:** Coestimulación a la proliferación de linfocitos T a través de la interacción entre moléculas de membrana presentes en CPA y linfocitos T. VLA-4: Antígeno leucocitario de adhesión vascular-4, VCAM-1: Molécula de adhesión vascular-1, CD-: Moléculas de diferenciación (del inglés Cluster of differentiation), RCT: Receptor del linfocito T. (Tomada de referencia 28).

INTERLEUCINAS (IL)
IL-1 IL-6 IL-8 Antagonista del receptor de IL-1 IL-10
FACTORES CON ACTIVIDAD HEMATOPOYETICA
Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) Factor estimulador de colonias macrófago-granulocito (GM-CSF) Eritropoyetina Activina Factor Inhibidor de la Leucemia Proteínas inflamatorias de macrófagos 1 y 2
OTROS
Factor de crecimiento transformante <i>alfa</i> y <i>beta</i> (TGF <sub>alfa</sub> Y TGF <sub>beta</sub> ) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) Factor plaquetario 4 Factor de necrosis tumoral <i>alfa</i> (TNF <sub>alfa</sub> ) Factor de crecimiento de fibroblastos <i>basico</i> (FGF <sub>basico</sub> ) Proteína quimiotáctica de macrófagos Interferón <i>alfa</i> y <i>beta</i> (IFN <i>alfa</i> e IFN <sub>beta</sub> ) Oncostatina M

**Tabla 2: Citocinas con actividad inmunomodulatoria producidas por los Macrófagos (Tomada de referencias 31,32)**

En cuanto a la función defensiva de las células NK, éstas poseen la capacidad de unirse a microorganismos extraños y lizarlos mediante la liberación de gránulos que contienen proteínas capaces de formar orificios en la membrana de la célula agresora, estas proteínas incluyen a las *perforinas*, *serin-esterasas* y *proteoglicanos condroitín-sulfato* (33,34).

Finalmente, la acción citostática de macrófagos, granulocitos y células NK se efectúa mediante la secreción de citocinas que

interfieren con la actividad normal de las células extrañas, tal grupo de moléculas incluye al *Interferón gamma* ( $IFN_{\text{gamma}}$ ) y el *Factor de necrosis tumoral* ( $TNF$ , del inglés Tumor Necrosis Factor) (31,35).

Cuando agentes patógenos han logrado penetrar la barrera defensiva opuesta por los mecanismo de inmunidad natural, se ponen en marcha los componentes inmunes adaptativos.

#### **INMUNIDAD ADAPTATIVA.**

La inmunidad adaptativa se establece a través de la acción combinada de varias poblaciones celulares que cooperan entre sí para reconocer y eliminar específicamente a *Ags* o células extrañas, manteniendo la capacidad defensiva específica mucho tiempo después de que el rechazo antigénico ha terminado (Memoria inmunológica). La inmunidad específica corre a cargo de células conocidas como *Linfocitos T* y *Linfocitos B* (36,37).

En la sangre estos linfocitos son, después de los granulocitos, las células blancas más numerosas, representando del 20 al 45 % del total de los leucocitos. Un microlitro de sangre humana contiene aproximadamente 2 500 linfocitos y en el adulto humano existen aproximadamente  $10^{12}$  linfocitos. La proporción existente entre células T y B en sangre corresponde de 55 a 75 % para los linfocitos T y de 15 a 30 % para los linfocitos B, observándose variadas distribuciones en diferentes órganos linfoides [Tabla 3] (38,39)

ORGANO	% DE LINFOCITOS	
	T	B
TIMO	>99	< 0.5
NODULO LINFOIDE	75	25
BAZO	50	50
SANGRE	55-75	15-30
MEDULA OSEA	7	>75

**Tabla 3. Distribución de los linfocitos T y B en diferentes órganos linfoides (Tomada de referencia 38)**

La capacidad que tiene el organismo para defenderse específicamente, de virtualmente cualquier antígeno, se debe a la presencia de un enorme número de diferentes clones de linfocitos T y B que poseen receptores específicos para diferentes antígenos. En consecuencia, los linfocitos son una población altamente heterogénea que no sólo difiere en el tipo de receptor que presentan, sino también en sus propiedades funcionales (38).

#### **LINFOCITO B.**

Los linfocitos B son las células encargadas de establecer la respuesta inmune humoral específica mediante la secreción de moléculas conocidas como *Inmunoglobulinas (Igs)*, las cuales poseen actividad de anticuerpo al tener la capacidad de unirse específicamente a los Ags que provocaron su síntesis (13).

La maduración de las células B se efectúa en la médula ósea, y cuando salen a la circulación sanguínea lo hacen presentando

receptores antígeno-específicos, los cuales al establecer contacto con el antígeno correspondiente, se ven inducidos a diferenciarse a células plasmáticas capaces de sintetizar una gran cantidad de inmunoglobulinas (12,36).

Las inmunoglobulinas están constituidas por cuatro cadenas de naturaleza proteica, dos cadenas ligeras de 24 kD (*L*, del inglés light) y dos cadenas pesadas de 55 a 70 kD (*H*, del inglés heavy) (16). Cada una de las cadenas *L* se unen, mediante enlaces disulfuro con una cadena *H* por su extremo amino terminal. Las cadenas pesadas también se unen entre sí por medio de enlaces disulfuro, denominándose a esta región de unión como "región de bisagra" (14,40).

La estructura tridimensional de la molécula de inmunoglobulina asemeja una "Y" [Figura 2] en la que se pueden distinguir dos regiones: una de ellas, caracterizada por su gran variabilidad, permite la unión al antígeno (Región *Fab*, del inglés fraction antigen binding); y la segunda, se distingue por tener una secuencia de aminoácidos relativamente constante (Región *Fc*, Fracción cristalizante) que permite la unión del anticuerpo a receptores para la porción *Fc* (*Rfc*) presentes en células inmunes (39).

Las inmunoglobulinas funcionan como opsoninas (al recubrir el material extraño) uniéndose al *Ag* por su porción *Fab* y a la célula fagocítica o NK mediante su región *Fc* con receptores específicos para ésta, favoreciendo así la eliminación del antígeno mediante un mecanismo conocido como *citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo* (*CCDA*) (41).

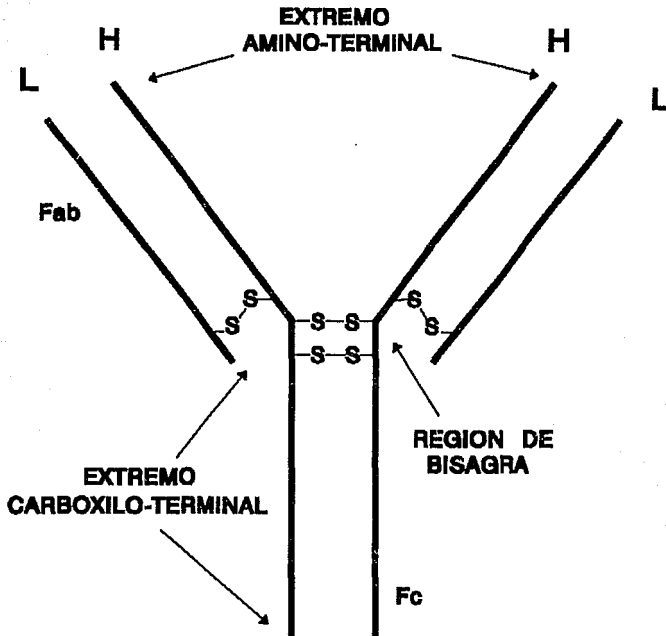


FIGURA 2: Estructura básica de las inmunoglobulinas (Basada en referencia 14)

#### LINFOCITO T.

Los linfocitos T son células que se originan en la médula ósea y que en estadios tempranos del desarrollo embrionario viajan al timo, en donde se diferencian para posteriormente ser liberados al torrente sanguíneo (42,43).

Todos los linfocitos T se caracterizan por tener receptores de membrana antígeno-específicos asociados a un complejo molecular

conocido como *CD3* (del inglés cluster of differentiation). La especificidad del receptor de la célula T (*RCT*) es adquirida gracias a la elevada variabilidad que tienen los genes que codifican para este receptor, y a la existencia de un proceso de selección clonal que se establece en el timo y que permite capacitar al linfocito para que no reconozca como extrañas a moléculas propias del organismo (44,45).

Si bien, morfológicamente los linfocitos T constituyen una población homogénea, fenotípica y funcionalmente se ha demostrado la existencia de varias subpoblaciones de estos linfocitos entre las cuales destacan las células T auxiliares (*Ta*) y células T citotóxicas (*Tc*).

Los linfocitos *Ta* poseen marcadores de membrana *CD4* asociados con moléculas del *CMH-II*. Su función consiste en cooperar con otras células inmunes mediante la secreción de diversas citocinas que pueden amplificar la acción defensiva contra algún *Ag* (46,47). De entre las citocinas secretadas por estas células destaca la *Interleucina-2 (IL-2)*, la cual interactúa con receptores específicos presentes en la membrana de todos los linfocitos T (y en algunos otros tipos celulares), regulando su proliferación celular (48,49).

Por su parte, los linfocitos *Tc* poseen marcadores de membrana *CD8* asociados con moléculas del *CMH-I*. Su función es la de lisar células extrañas que presentan *Ags* de membrana mediante la liberación de perforinas, o bien mediante la inducción de un proceso conocido como Apoptosis o muerte celular programada (50,51,52).

Para que un linfocito T sea activado específicamente, es indispensable la unión de un Ag con su RCT. El producto de esta interacción es la transmisión de señales al núcleo del linfocito, para desencadenar, a su vez, la expresión de receptores para IL-2, la secreción de linfocinas, y la capacidad de generar la actividad lítica de los linfocitos Tc (53,54,55,56,57).

Existe evidencias que muestra que la transmisión de señales producto de la estimulación del RCT es mediada por el complejo CD3, observándose que la participación de este grupo de moléculas es de suma importancia para la función efectora de los linfocitos T (6,58)

#### EL COMPLEJO MOLECULAR RCT-CD3.

Como ya se mencionó con anterioridad, los linfocitos T son capaces de reconocer Ags mediante la interacción de éstos con el receptor RCT.

El RCT está formado por dos cadenas polipeptídicas denominadas *alfa* y *beta* que se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro (59,60,61).

La caracterización bioquímica de estas cadenas ha demostrado que la cadena *alfa* es una glicoproteína ácida de 40 a 50 kD, mientras que la cadena *beta* es una glicoproteína básica y pesa de 40 a 45 kD. Ambas cadenas se anclan a la membrana del linfocito T por su extremo carboxilo terminal, presentando regiones transmembranales cargadas positivamente y encontrándose en el extremo amino terminal los sitios de unión al antígeno (16,38). La mayor parte de las cadenas *alfa* y *beta* se encuentran



extracelularmente y ambas cadenas tienen un dominio intracelular pequeño (cinco aminoácidos) que carece de sitios de fosforilación [Figura 3] (62,63).

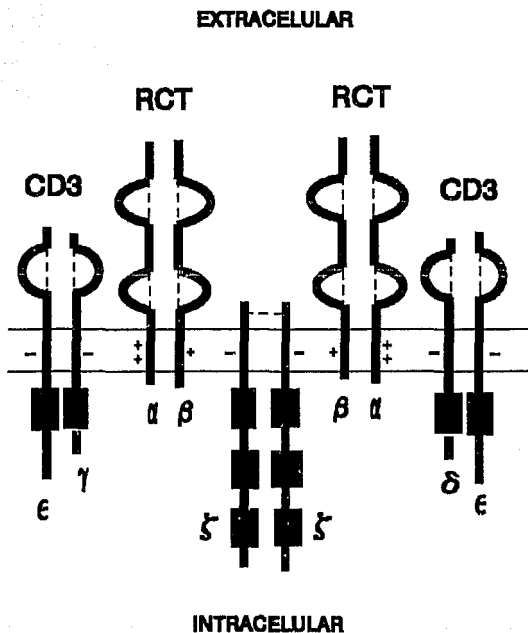


Figura 3: Modelo del receptor de la célula T (Tomado de referencia 65)

El receptor antigénico del linfocito T es capaz de reconocer antígenos únicamente cuando éstos se encuentran asociados a moléculas del CMH, y una vez establecida esta interacción, se promueve la activación del CD3 (64).

El complejo *CD3* se encuentra acoplado físicamente al *RCT* y está formado por cinco tipos de proteínas integrales de membrana asociadas entre sí y con el heterodímero *RCT* de forma no-covalente (61). Las cadenas que forman al *CD3* se denominan *gamma*, *delta*, *epsilon*, *dzeta* y *nu*; las dos primeras tienen una naturaleza glicoprotéica, mientras que las restantes carecen de azúcares; siendo la única característica común a todas las cadenas, la presencia de cargas eléctricas negativas en la región transmembranal de cada proteína (65,66).

Las cadenas *gamma*, *delta* y *epsilon* se encuentran en forma monomérica, y las cadenas *dzeta* y *nu* tienen la capacidad de formar homodímeros (*dzeta-dzeta* y *nu-nu*) y heterodímeros (*dzeta-nu*) con múltiples sitios de fosforilación de tirosina en su extremo citoplasmático (67,68,69).

Las cadenas *dzeta* y *nu* tienen dominios citoplasmáticos muy grandes, a los cuales se le ha asociado un papel funcional en la transmisión de señales al núcleo (70) [Figura 3] .

El *CD3* presenta al menos tres estequiometrías (70):  
*gamma*, *delta*, *epsilon* y *dzeta-dzeta*,  
*gamma*, *delta*, *epsilon* y *nu-nu*, y  
*gamma*, *delta*, *epsilon* y *dzeta-nu*.

Se tienen evidencias de que el complejo *RCT-CD3*, se forma mediante la atracción electrostática que existe entre las cargas positivas de las cadenas del *RCT* con las cargas negativas del *CD3* (65).

Cuando el *RCT* se une a un Ag, rápidamente ocurre la liberación de calcio intracelular y la activación de proteínas

cinastas C (71,72,73,74) y otros segundos mensajeros que promueven la síntesis de *IL-2*, la expresión de receptores para *IL-2* (65,75) y la síntesis y liberación de perforinas (76,77).

#### **INTERLEUCINA DOS (IL-2).**

La *IL-2* fue originalmente descubierta por la actividad que presentaban sobrenadantes de cultivo de leucocitos de sangre periférica (*LSP*) humanos (estimulados con lectinas o antígenos), al estimular el crecimiento de timocitos y linfocitos T (78).

La caracterización molecular de la *IL-2* humana ha mostrado que la proteína mitogénica se origina de un precursor de 153 aminoácidos, el cual pierde 20 aminoácidos durante su maduración para dar lugar a una proteína glicosilada de 133 aminoácidos (79,80).

El peso molecular de *IL-2*, dependiendo de su estado de glicosilación, varía de 14 a 22 kD. No obstante se ha demostrado que la presencia de azúcares en la molécula, no es necesaria para su actividad mitogénica. Mientras que el rompimiento del enlace disulfuro entre el aminoácido 58 y 105 conduce a la inhibición de su actividad biológica (81,82).

La *IL-2* ejerce su efecto mitogénico mediante su unión con receptores específicos de membrana. El receptor para *IL-2* (*RIL-2*) está constituido por dos subunidades, una de 55 kD conocida como alfa y una de 70 a 75 kD denominada beta (58,83,84). La formación de un receptor de alta afinidad se establece mediante la unión no covalente entre ambas subunidades, sin embargo la subunidad alfa

puede unir a la *IL-2* con baja afinidad, mientras que la cadena beta puede unir a la molécula con una afinidad intermedia (78).

La *IL-2* al parecer no tiene actividad especie-específica y su rango de acción abarca a una limitada variedad de tipos celulares, de entre los que se encuentran los linfocitos T y B, Macrófagos, células NK, células oligodendrogliales y algunas células epiteliales (48,78). La actividad biológica de la *IL-2* sobre estos tipos celulares se resumen en la Figura 4.

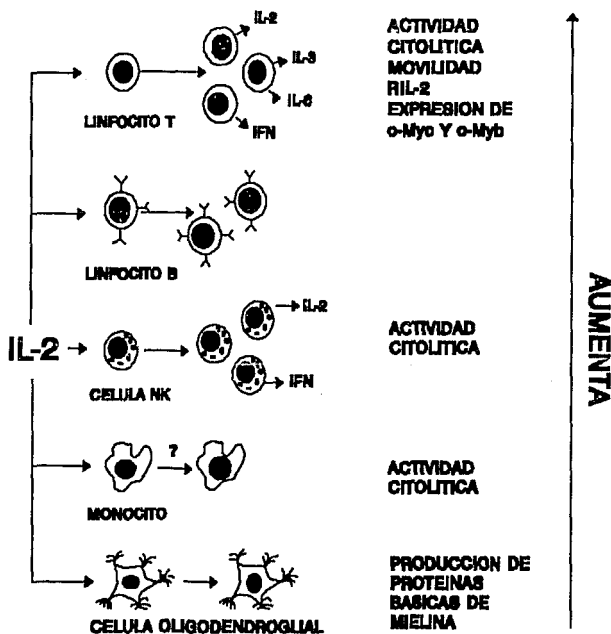


Figura 4: Actividad biológica de la *IL-2* (Basada en referencia 78)

## CANCER CERVICO-UTERINO.

En nuestro país, el cáncer cérvico-uterino (CaCu) ocupa el primer lugar de incidencia de entre las enfermedades neoplásicas femeninas (85).

El CaCu es un padecimiento ginecológico asociado con una etiología multivariada, encontrándose que mujeres con relaciones sexuales a temprana edad, gran número de parejas sexuales, tabaquismo, hábitos higiénicos y alimenticios deficientes, constituyen sujetos de alto riesgo (86).

Recientes investigaciones han demostrado que la acción de los Papillomavirus humanos tipo 16 y 18 (PVH-16 y PVH-18) son una de las principales causas de aparición del CaCu (87,88). Esta conclusión se ha visto apoyada por una serie de estudios que han demostrado la presencia de estos virus en 50 a 90 % de los casos, destacando que el PVH-16 es más frecuente que el PVH-18 en una proporción de 3:1 (89), además de que se ha comprobado que la infección por estos virus dá como resultado la proliferación de células epiteliales (90).

Existen investigaciones que establecen que la integración del ADN viral al genoma de la célula huésped juega un importante papel en la progresión y mantenimiento de las características celulares malignas, y que esta integración puede afectar la expresión de ciertos genes que codifican para proteínas de membrana con o sin propiedades antigénicas (87,91).

La información hasta ahora expuesta nos lleva a pensar que el CaCu puede ser tratado con técnicas Inmunoterapéuticas, debido a

que su asociación con una etiología viral puede desencadenar la aparición de *Ags* de membrana en las células infectadas con *PVH*.

Esto pone de manifiesto la importancia de llevar a cabo estudios en los que se promueva la proliferación de linfocitos T citotóxicos específicos hacia células de *CaCu*, para que en un futuro el empleo de estas células activadas *in vitro*, sea una alternativa real en el tratamiento de las enfermas de *CaCu*.

#### LA INMUNOTERAPIA.

La terapia biológica del cáncer o inmunoterapia se refiere al empleo de las cualidades que posee el sistema inmune de reconocer y eliminar específicamente a células tumorales, ésta surge de la necesidad de eliminar a un tumor del huésped causando un mínimo de efectos secundarios (57,92).

A partir de la década de los 70's se han desarrollado varias estrategias para la activación *in vitro* de células inmunes, con la finalidad de que al ser devueltas al paciente, eliminen específicamente al tumor (41,93).

Los primeros ensayos para inducir la proliferación de leucocitos se basaron en la propiedad de las lectinas (como la Fitohemaglutinina y Concanavalina A) para activar linfocitos. Posteriormente el descubrimiento de citocinas y su producción a gran escala por técnicas de biología molecular, permitieron el uso de estas moléculas para la activación de células linfoides (93).

Otros agentes activadores de la proliferación de linfocitos han sido anticuerpos dirigidos contra receptores específicos de

éstas células, particularmente dirigidos contra el CD3. El *anti-CD3* se ha usado especialmente cuando la cantidad de linfocitos disponibles para la activación es muy pequeña. Esta estrategia ha sido adecuada para activar la proliferación de linfocitos infiltrantes de tumor (*TIL*; del inglés tumor infiltrating lymphocytes) (94,95).

En cuanto al uso de *anti-CD3 in vivo*, se ha observado que la inyección de *anti-CD3* a ratones induce en sus leucocitos actividad citolítica sobre células tumorales, y la producción de citocinas (5,96,97).

Por otra parte, existen una gran cantidad de publicaciones que demuestran que *IL-2* sola y en combinación con *anti-CD3* soluble o unido al plástico, favorece fuertemente la proliferación de linfocitos, aunque cabe mencionar que también se ha encontrado que tal combinación inhibe la proliferación de células linfoides (98).

A pesar de que existen resultados alentadores en la estimulación de linfocitos T con *anti-CD3*, aún no se han optimizado las condiciones para su uso inmunoterapéutico. En consecuencia, el presente trabajo se realizó con la finalidad de estudiar el efecto que ejerce el *anti-CD3* soluble y unido a leucocitos adherentes, sobre la proliferación de linfocitos T de pacientes con cáncer cérvico-uterino inducida con *IL-2* recombinante humana (*IL-2rh*).

## HIPOTESIS

Se sabe que los monocito-macrófagos, pertenecientes a la fracción adherente *in vitro* de las células mononucleadas de sangre periférica, participan en la activación de linfocitos T a través de la presentación de antígenos y de la secreción de monocinas, y que la presencia de *IL-2* en este proceso es importante para inducir la proliferación de linfocitos T. Asimismo, se sabe que anticuerpos monoclonales dirigidos contra el complejo molecular CD3 (*anti-CD3*) pueden activar a los linfocitos T.

En consecuencia se espera que la activación a la proliferación de linfocitos T mediante *IL-2* se vea potenciada por *anti-CD3*, especialmente cuando éste se encuentre presentado por monocitos.



**OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del anticuerpo *anti-CD3* soluble y unido a monocitos sobre la proliferación de linfocitos T de pacientes con cáncer cérvico-uterino, en presencia y ausencia de Interleucina 2 recombinante humana (*IL-2rh*).

**OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer el efecto de diferentes concentraciones de *anti-CD3* soluble sobre la proliferación de linfocitos T.
2. Establecer el efecto de la combinación del mitógeno *IL-2rh* con diferentes concentraciones de *anti-CD3* soluble, sobre la proliferación de linfocitos T.
3. Determinar el efecto de la concentración de *anti-CD3* unido a monocitos sobre la proliferación de linfocitos T.
4. Determinar el efecto de la combinación de *IL-2rh* y diferentes concentraciones de *anti-CD3* unido a monocitos, sobre la proliferación de linfocitos T.
5. Determinar si el medio condicionado (MC) por monocitos estimulados con *anti-CD3* induce la proliferación de linfocitos T.
6. Determinar el efecto atribuible únicamente al *anti-CD3* unido a monocitos sobre la proliferación de linfocitos T.

<b>MATERIAL Y METODO</b>
--------------------------

**1.- OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS SANGUINEAS.****A. OBTENCION DE MUESTRAS SANGUINEAS.**

Un volumen de 20 ml de sangre periférica fue extraído de pacientes con cáncer cérvico-uterino mediante una jeringa tratada con 0.1 ml del anticoagulante Heparina (Rickercab/NC B, U.S.A) a 1000 U.I/ml.

**B. SEPARACION DEL PLASMA DE LA MUESTRA SANGUINEA.**

La muestra de sangre fue centrifugada a 400 gravedades (G) durante 10 min, al término de este tiempo, el plasma fue separado del paquete celular con una pipeta y colocado en un tubo de vidrio al que se le adicionó 0.1 ml de Clorhidrato de Protamina (Rickercab/NC B, U.S.A) a una concentración de 1000 U.I/ml, la cual inactivó a la Heparina y permitió la formación de un coágulo que fue removido, quedando de esta manera el suero libre.

**C. DESACTIVACION DEL COMPLEMENTO SERICO.**

Se llevó a cabo colocando el suero en un baño de agua a 56 °C durante 30 min, con el fin de desnaturalizar las proteínas del complemento y de alto peso molecular que pudieran afectar la proliferación de células en cultivo.

#### D. OBTENCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP).

El paquete celular, una vez separado del plasma, se lavó con 10 ml de medio RPMI-1640 (del inglés Roswell Park Memorial Institute), (Sigma Chemical Co; U.S.A., Apéndice 1) y se centrifugó a 400 G durante 10 min, para posteriormente desechar el sobrenadante. A continuación se adicionó RPMI hasta que se obtuvo un volumen final de 20 ml de suspensión sanguínea.

La mezcla así obtenida fue vertida muy lentamente, haciéndola resbalar por las paredes, en cuatro tubos de vidrio que contenían 2 ml de Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co; U.S.A., densidad = 1.077 g/ml), y se procedió a centrifugarlos a 400 G durante 30 min. La interfase de color blanco y formada por leucocitos de sangre periférica (LSP) fue separada cuidadosamente con una pipeta y trasladada a tubos que contenían 5 ml de RPMI. Posteriormente se centrifugó a 300 G por 5 min y el botón celular se resuspendió en 5 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero autólogo (MCC, medio de cultivo completo).

#### E. OBTENCION DE LEUCOCITOS NO ADHERENTES AL PLASTICO (LNA).

Un número de 500 000 LSP fue resuspendido en 200  $\mu$ l de MCC y colocado en placas de microcultivo de 96 pozos (Nuncclon, Dinamarca) para su incubación durante 1 hr a 37 °C. Transcurrido este tiempo, los LNA fueron recuperados removiendo el sobrenadante. Las células que quedaron adheridas al fondo del pozo, leucocitos adherentes (LA), fueron lavadas dos veces con RPMI para su uso posterior.

#### F. CONDICIONES DE CULTIVO.

Los cultivos celulares contenidos en placas de microcultivo fueron mantenidos en una incubadora (Form Scientific, Division of Mallincrodt, Inc, U.S.A) con una temperatura de 37 °C y una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad saturante.

Las condiciones de trabajo en todos los experimentos requirieron de esterilidad.

#### 2.- IDENTIFICACION MORFOLOGICA DE LNA Y DE LA AL INICIAR Y AL FINALIZAR LOS EXPERIMENTOS.

Una muestra de LNA fue colocada sobre un portaobjetos y centrifugada durante 5 min a 10 000 G. Posteriormente, las células centrifugadas fueron fijadas con metanol y teñidas con una solución de Giemsa (1:10 en agua bidestilada, Apéndice 2) durante 30 min. Al término de este tiempo se lavó el exceso de colorante, se dejó secar la preparación y finalmente se evaluaron las proporciones de las poblaciones leucocitarias presentes en tres campos escogidos al azar. Los resultados se expresaron como el promedio de los porcentajes obtenidos para cada tipo celular.

En cuanto a los leucocitos adheridos al plástico, se tomó una caja de cultivo conteniendo a estas células y se siguió el mismo procedimiento que para los LNA.

### 3.- ACTIVACION DE LINFOCITOS CON anti-CD3 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE INTERLEUCINA DOS RECOMBINANTE HUMANA (IL-2rh).

#### A. ACTIVACION DE LINFOCITOS CON anti-CD3 SOLUBLE.

El anticuerpo monoclonal humano *anti-CD3* (Dako A/S, Dinamarca, clon T3-4B5 dirigido a la cadena *epsilon*) fue preparado a las concentraciones de 0.05, 0.1, 2.5 y 5  $\mu\text{g/ml}$  en MCC. Para llevar a cabo la estimulación de linfocitos con *anti-CD3* soluble, 150 000 células fueron cultivadas en 200  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones de anticuerpo preparadas. En los experimentos donde se empleó Interleucina-2 recombinante humana (*IL-2rh*, Cetus Co; U.S.A) con o sin anticuerpo, se adicionó para ajustarla a una concentración final de 1000 U.I/ml.

Los linfocitos fueron cultivados con *anti-CD3* en presencia y ausencia de *IL-2rh* durante 7 días, después de este tiempo se evaluó la proliferación obtenida mediante conteos bajo un microscopio óptico haciendo uso de azul tripano (para distinguir células vivas de muertas) (Apéndice 3) y hemocitómetro (American Optical, U.S.A).

#### B. ACTIVACION DE LINFOCITOS CON anti-CD3 UNIDO A MONOCITOS.

##### - UNION DE anti-CD3 A MONOCITOS.

Un número aproximado de 100 000 monocitos fueron cultivados durante 30 minutos con 100  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones de anticuerpo previamente preparadas. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante de cultivo fue removido y los linfocitos fueron lavados dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de RPMI.

**- ACTIVACION DE LINFOCITOS CON anti-CD3 UNIDO A MONOCITOS.**

Aproximadamente 150 000 LNA resuspendidos en 200  $\mu$ l de MCC fueron co-cultivados con 100 000 LA previamente tratados con las diferentes soluciones de anti-CD3 durante un período de 7 días. Al término de este tiempo se evaluó la proliferación celular obtenida.

**4.- ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS POR MONOCITOS ESTIMULADOS CON anti-CD3.**

**A. OBTENCION DE MEDIO CONDICIONADO POR MONOCITOS.**

La colecta del medio condicionado (MC) se realizó a partir de cultivos de 100 000 monocitos (previamente estimulados con 2.5  $\mu$ g/ml de anti-CD3) en MCC durante 5 días. En seguida el MC se centrifugó a 400 G durante 5 min para eliminar a las células en suspensión.

**B. ENSAYO DE MEDIOS CONDICIONADOS.**

Para evaluar el efecto de los medios condicionados sobre la proliferación de linfocitos, se cultivaron 200 000 células con MCC suplementado al 40% con MC durante 7 días. Una vez transcurrido este tiempo se evaluó la proliferación celular.

## 5.- ACTIVACION DE LINFOCITOS CON anti-CD3 UNIDO A MONOCITOS (Mφ-anti-CD3)FIJADOS CON GLUTARALDEHIDO.

### A. FIJACION DE MONOCITOS CON GLUTARALDEHIDO.

La fijación de monocitos previamente tratados con *anti-CD3*, se realizó mediante la adición de 100 µl de solución de Glutaraldehído al 0.1 % en solución amortiguadora de fosfatos (*SAF*, Apéndice 4), manteniéndose en estas condiciones durante 30 min a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se removió el sobrenadante y las células así fijadas fueron lavadas dos veces con RPMI para su posterior cultivo con linfocitos.

### B. ACTIVACION DE LINFOCITOS.

Los *Mφ-anti-CD3* fijados con glutaraldehído fueron utilizados como sustratos en los cultivos destinados para la activación de linfocitos. En estos experimentos la participación de las diferentes variables involucradas en el sistema implementado se evaluaron haciendo uso de las siguientes condiciones de cultivo:

#### a) Efecto de la *IL-2rh* en el sistema.

Se cultivaron 200 000 linfocitos con 100 000 monocitos (sin tratamiento con *anti-CD3*) en presencia de *IL-2rh* (*LAK*, leucocitos activados por citocinas para matar, del inglés lymphokine-activated killer), así como con su contraparte constituida por linfocitos co-cultivados con monocitos previamente fijados con glutaraldehído en presencia de *IL-2rh* (*LAK'*).

b) Efecto del anti-CD3 en el sistema.

Doscientos mil linfocitos se co-cultivaron con 100 000 monocitos (tratados previamente con anti-CD3) en ausencia de IL-2rh (CD3), así como su contraparte formado por linfocitos cultivados con M $\phi$ -anti-CD3 y fijados con glutaraldehído (CD3').

c) Efecto combinado de IL-2rh y anti-CD3 en el sistema.

Se cultivaron 200 000 linfocitos con 100 000 monocitos tratados con anti-CD3 y en presencia de IL-2rh (CTRL+); y su contraparte en la que los M $\phi$ -anti-CD3 fueron fijados con glutaraldehído (CTRL+').

d) Control negativo.

Fue constituido por 200 000 linfocitos co-cultivados con 100 000 monocitos en ausencia de anti-CD3 y de IL-2rh.

**6.- ANALISIS ESTADISTICO.**

Todos los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA, Apéndice 5), con el fin de contrastar las diferencias entre las medias de cada una de las poblaciones celulares sometidas a los distintos tratamientos. Cuando los resultados de este análisis demostraron la existencia de diferencias significativas a una  $p < 0.01$ , se procedió a efectuar una prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher para conocer entre que tratamientos hubo diferencia estadística (Apéndice 6).



**7.- VARIOS.**

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y un mínimo de dos veces.

Los resultados fueron expresados como la media de los valores obtenidos y graficados con su respectiva desviación estandar.

<b>RESULTADOS</b>
-------------------

**MORFOLOGIA DE LOS LEUCOCITOS ADHERENTES (LA) Y NO ADHERENTES (LNA) DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CANCER CERVICO-UTERINO (CaCu).**

Con la finalidad de analizar la morfología celular de los LA y de LNA al plástico, se hicieron preparaciones de las células usadas al inicio y al término de cuatro experimentos, y se evaluaron los porcentajes de cada una de las poblaciones presentes.

Los LA al inicio de los experimentos estuvieron enriquecidos en un 72 a 78 % con células monocíticas, asimismo la proporción de células con morfología linfoide varió desde 7 hasta 22 %, y la de granulocitos de 6 a 16 % [Tabla 4].

PACIENTE	% DE LA AL INICIO DEL EXPERIMENTO		
	LINFOCITOS	MONOCITOS	GRANULOCITOS
1	7	77	16
2	8	78	14
3	22	72	6
4	11	73	16

**Tabla 4. Morfología de los Leucocitos Adherentes al inicio del experimento.**

En cuanto al análisis morfológico de los LNA al inicio del experimento, se encontró que la mayoría de las células presentaron una morfología linfoide (del 60 al 85 % del total de LNA), alrededor del 5 % se observó con morfología monocítica, y del 10 al 35 % presentó apariencia granulocítica [Tabla 5].

PACIENTE	% DE LNA AL INICIO DEL EXPERIMENTO		
	LINFOCITOS	MONOCITOS	GRANULOCITOS
1	77	5	18
2	60	5	35
3	83	6	11
4	86	4	10

**Tabla 5. Morfología de los Leucocitos No Adherentes al inicio del experimento.**

En la evaluación morfológica de los LA al finalizar los experimentos, se encontró que en todos los casos la proporción de células con morfología monocítica fue del 100 %.

Finalmente, al evaluar el tipo de LNA obtenido al término de los experimentos, se encontró que la gran mayoría de células presentó una morfología linfoide, siendo en todos los casos los porcentajes superiores al 90 % del total de la población, mientras que los porcentajes de monocitos y granulocitos se encontraron alrededor del 2 y 7 % respectivamente [Tabla 6].

PACIENTE	% DE LNA AL FINALIZAR EL EXPERIMENTO		
	LINFOCITOS	MONOCITOS	GRANULOCITOS
1	95	--	5
2	90	--	10
3	91	2	7
4	92	3	5

Tabla 6. Morfología de los Leucocitos No Adherentes al finalizar el experimento.

Cabe destacar que los porcentajes de LNA antes y después de los experimentos variaron considerablemente, observándose en todos ellos un incremento neto de la proporción de células con morfología linfoide: para la paciente 1 el aumento fue del 77 al 95 %; para la paciente 2 el incremento fue del 60 al 90 %; en la paciente 3 se encontró un aumento de 83 a 91 %; y finalmente para la paciente 4 se encontró un ascenso del 86 al 92 % de células con morfología linfoide.

Mencionaremos por último que las células con morfología monocítica y granulocítica de las poblaciones de LNA, disminuyeron pronunciadamente, encontrándose porcentajes inferiores al 10 % en todos los casos.

Con base a los resultados obtenidos, se asumió nombrar en los subsecuentes experimentos a la población de LA como monocitos, y a la población de LNA como linfocitos.

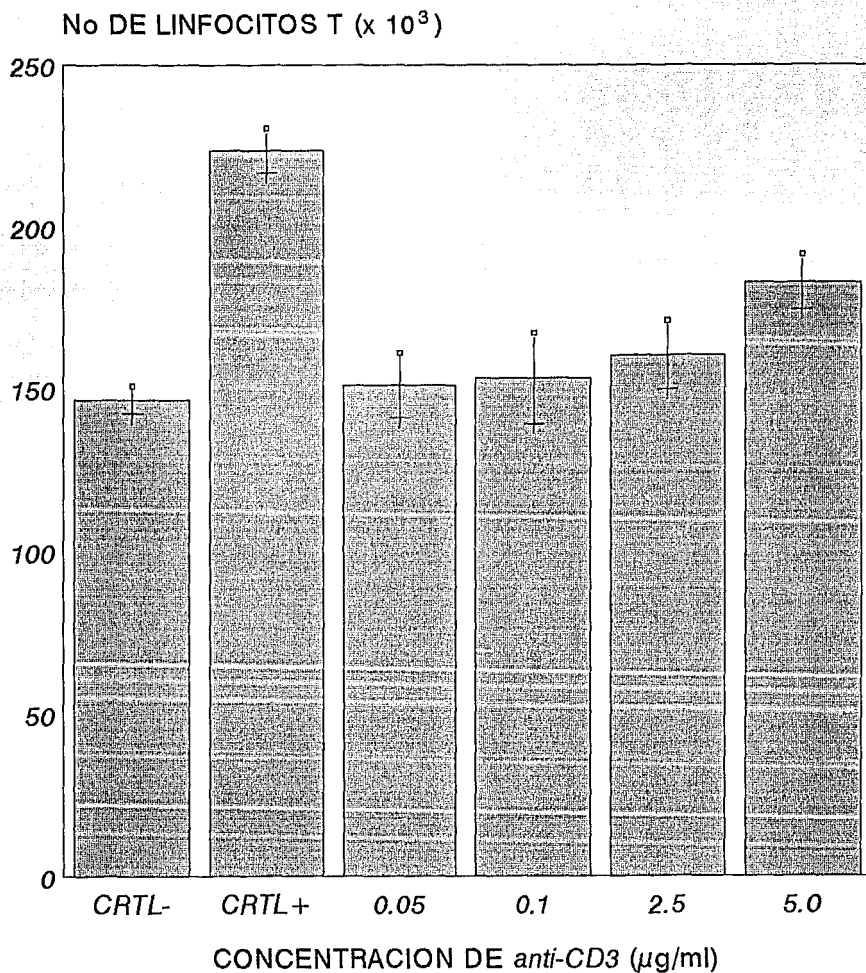
**EFFECTO DEL anti-CD3 USADO EN FORMA SOLUBLE, SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON CaCu.**

Para establecer si el *anti-CD3* usado en forma soluble era capaz de estimular la proliferación de linfocitos de pacientes con CaCu, se hicieron cultivos en presencia de *anti-CD3* a las concentraciones de 0.05, 0.1, 2.5, y 5.0  $\mu\text{g/ml}$ . Se usaron como control negativo (*CTRL-*) linfocitos cultivados en ausencia de anticuerpo y de *IL-2rh*, y como control positivo (*CTRL+*) linfocitos cultivados en presencia de *IL-2rh* a una concentración de 1000 U.I/ml.

En dos experimentos, se encontró que el número de linfocitos en el *CTRL-* fue similar al número de células cultivadas inicialmente (150 000), mientras que en el *CTRL+* se obtuvo una proliferación de 50 % más que en el *CTRL-* [Gráficas 1-A y 1-B]. En general, el *anti-CD3* usado de forma soluble, no favoreció la proliferación de linfocitos en las concentraciones utilizadas, encontrándose valores estadísticamente similares al control negativo ( $p < 0.01$ ; 12 g.l; ANDEVA).

# GRAFICA 1-A

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE *anti-CD3* SOLUBLE



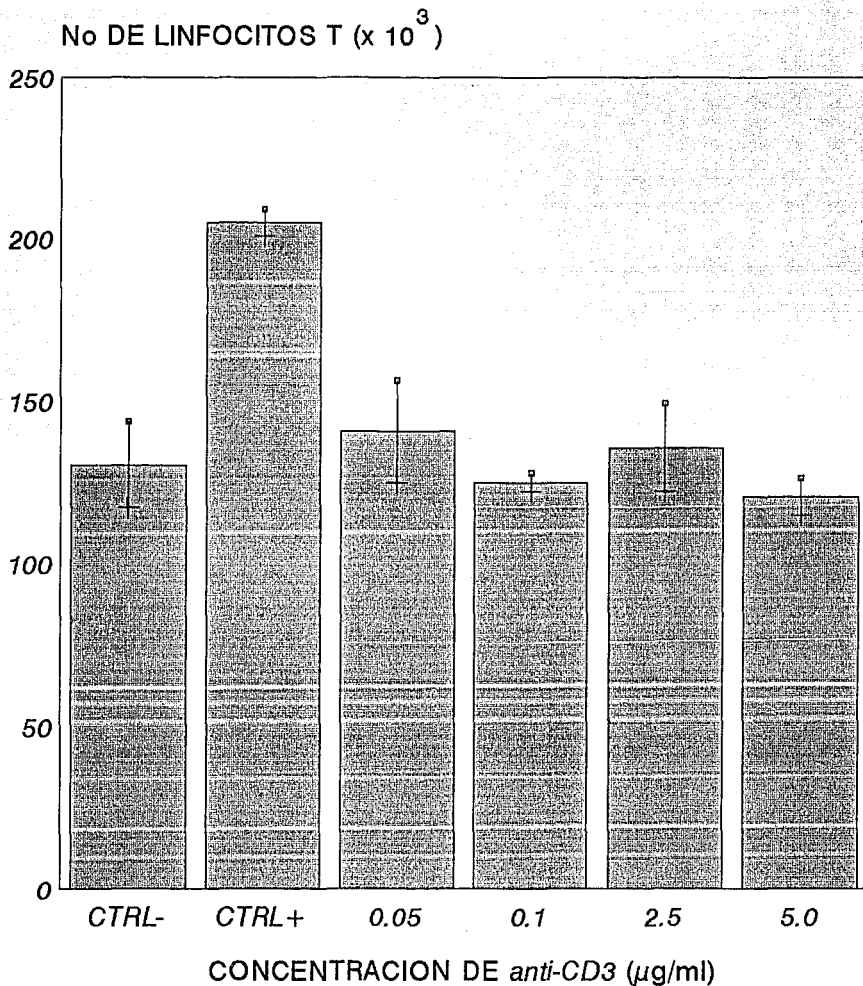
No INICIAL DE LINFOCITOS T: 150 000

CTRL-: LINFOCITOS CULTIVADOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES

CTRL+: LINFOCITOS CULTIVADOS EN PRESENCIA DE *IL-2rh*

# GRAFICA 1-B

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE *anti-CD3* SOLUBLE



No INICIAL DE LINFOCITOS T: 150 000

CTRL-: LINFOCITOS CULTIVADOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES

CTRL+: LINFOCITOS CULTIVADOS EN PRESENCIA DE *IL-2rh*

**EFFECTO DE LA COMBINACION DE anti-CD3 SOLUBLE E IL-2rh EN LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON CaCu.**

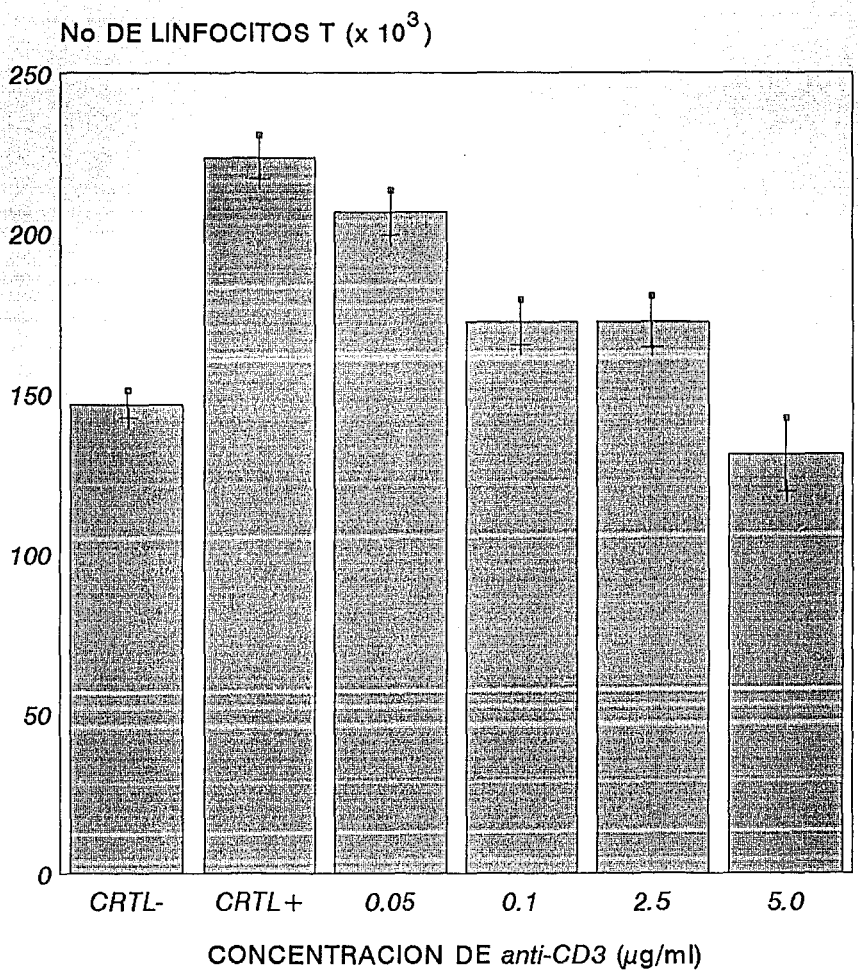
Con la finalidad de evaluar el efecto combinado de *anti-CD3* soluble y de *IL-2rh* sobre la proliferación de linfocitos, estas células se cultivaron en presencia de 1000 U.I/ml de *IL-2rh* y del anticuerpo a las concentraciones ya mencionadas. El *CTRL-* consistió de linfocitos en ausencia de inductores, y el *CTRL+* de linfocitos cultivados en presencia de *IL-2rh*.

En la realización de dos experimentos, se observó que los *CTRL+* presentaron una proliferación de 50 % más que los *CTRL-*. Cuando se evaluó el efecto combinado de *IL-2rh* y del *anti-CD3* soluble se observó, en contra de lo esperado, que la presencia del anticuerpo inhibió de manera dosis-dependiente la proliferación de linfocitos inducida por *IL-2rh*, encontrándose a las dosis mayores valores similares al *CTRL-* ( $p < 0.01$ , 13 g.l, ANDEVA) [Gráficas 2-A y 2-B].



# GRAFICA 2-A

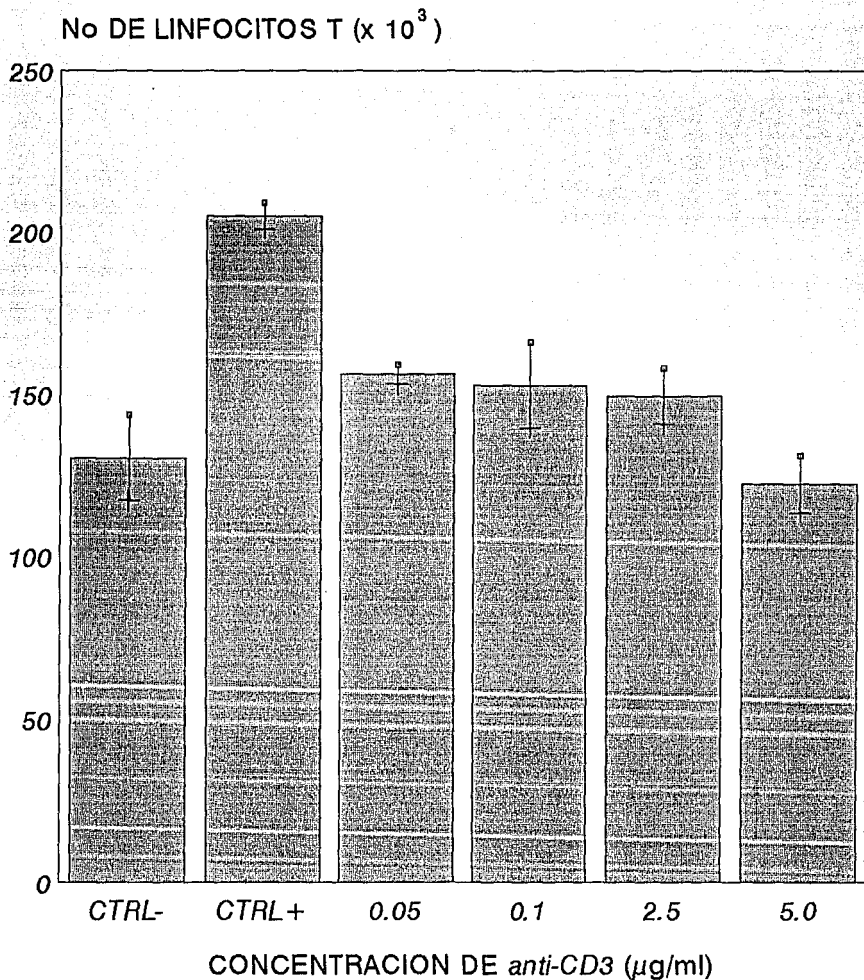
## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE IL-2rh Y anti-CD3 SOLUBLE



CONCENTRACION DE *IL-2rh*: 1000 U.I/ml  
No INICIAL DE LINFOCITOS T: 150 000  
CTRL-: LINFOCITOS CULTIVADOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES  
CTRL+: LINFOCITOS CULTIVADOS EN PRESENCIA DE *IL-2rh*

# GRAFICA 2-B

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE *IL-2rh* Y *anti-CD3* SOLUBLE



CONCENTRACION DE *IL-2rh*: 1000 U.I/ml

No INICIAL DE LINFOCITOS T: 150 000

CTRL-: LINFOCITOS CULTIVADOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES

CTRL+: LINFOCITOS CULTIVADOS EN PRESENCIA DE *IL-2rh*

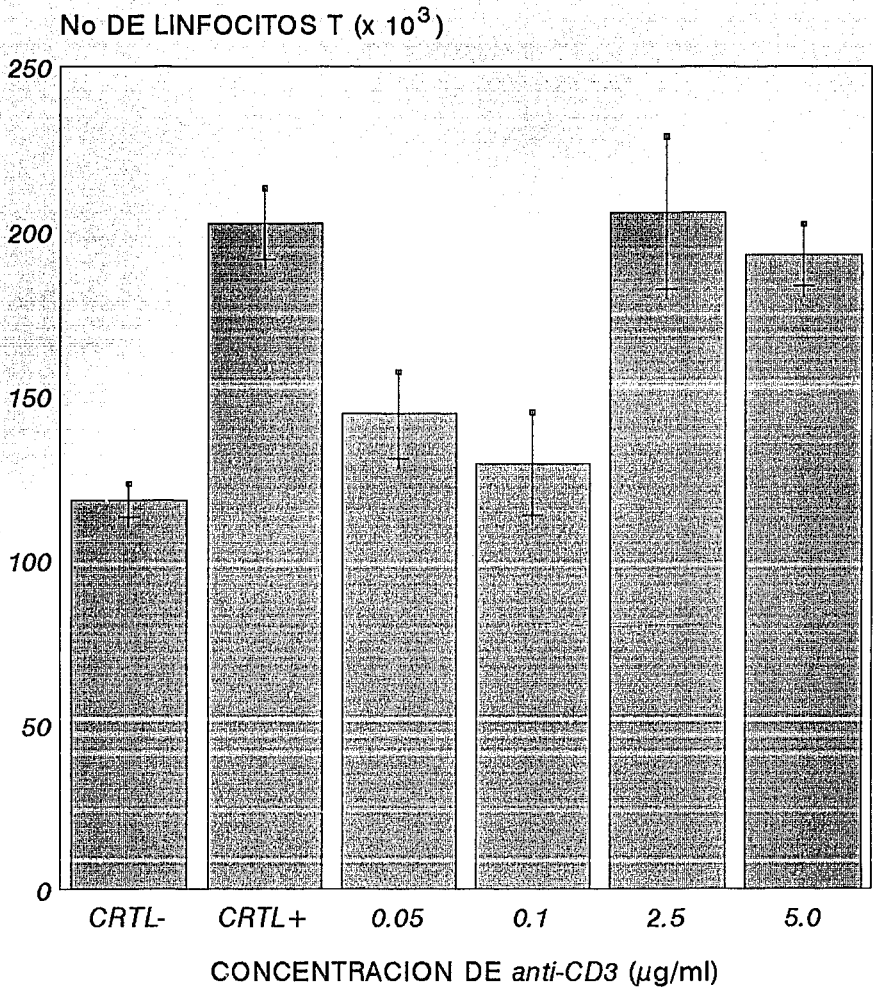
**PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON CaCu EN PRESENCIA DE anti-CD3 UNIDO A MONOCITOS.**

Con la finalidad de establecer la función de *anti-CD3* (unido a monocitos) en la proliferación de linfocitos, se co-cultivaron linfocitos en presencia de monocitos previamente tratados con *anti-CD3*. El *CTRL-* consistió de linfocitos cultivados en presencia de monocitos sin tratamiento previo con *anti-CD3*; y el *CTRL+* de linfocitos co-cultivados en estas mismas condiciones pero en presencia de *IL-2rh*.

En dos experimentos se obtuvo que los *CTRL+* proliferaron del 70 al 90 % más que los *CTRL-* [Gráficas 3-A y 3-B]. Por otra parte, en ambos casos al utilizar monocitos tratados a bajas concentraciones de *anti-CD3* (0.05 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), la proliferación fue significativamente similar al *CTRL-* ( $p < 0.01$ ; 18 g.l; ANDEVA). Mientras que, al emplear altas concentraciones de anticuerpo (2.5 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$ ) se observó una proliferación linfoide similar a la del *CTRL+*, ( $p < 0.01$ ; 18 g.l; ANDEVA) [Gráficas 3-A y 3-B].

# GRAFICA 3-A

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE *anti-CD3* UNIDO A MONOCITOS



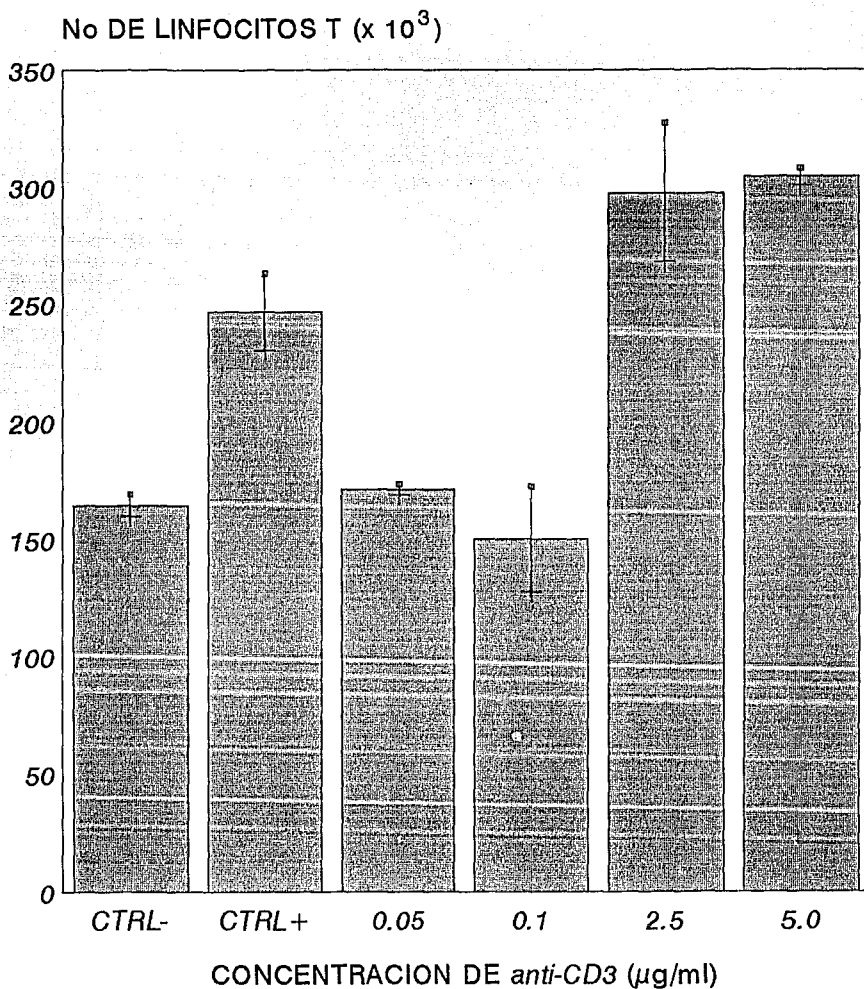
No INICIAL DE LINFOCITOS T: 150 000

CTRL-: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES

CTRL+: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN PRESENCIA DE *IL-2rh*

# GRAFICA 3-B

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE *anti-CD3* UNIDO A MONOCITOS



No INICIAL DE LINFOCITOS T: 150 000

CTRL-: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES

CTRL+: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN PRESENCIA DE *IL-2rh*

**PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON CaCu MEDIANTE LA COMBINACION DE IL-2rh Y anti-CD3 UNIDO A MONOCITOS.**

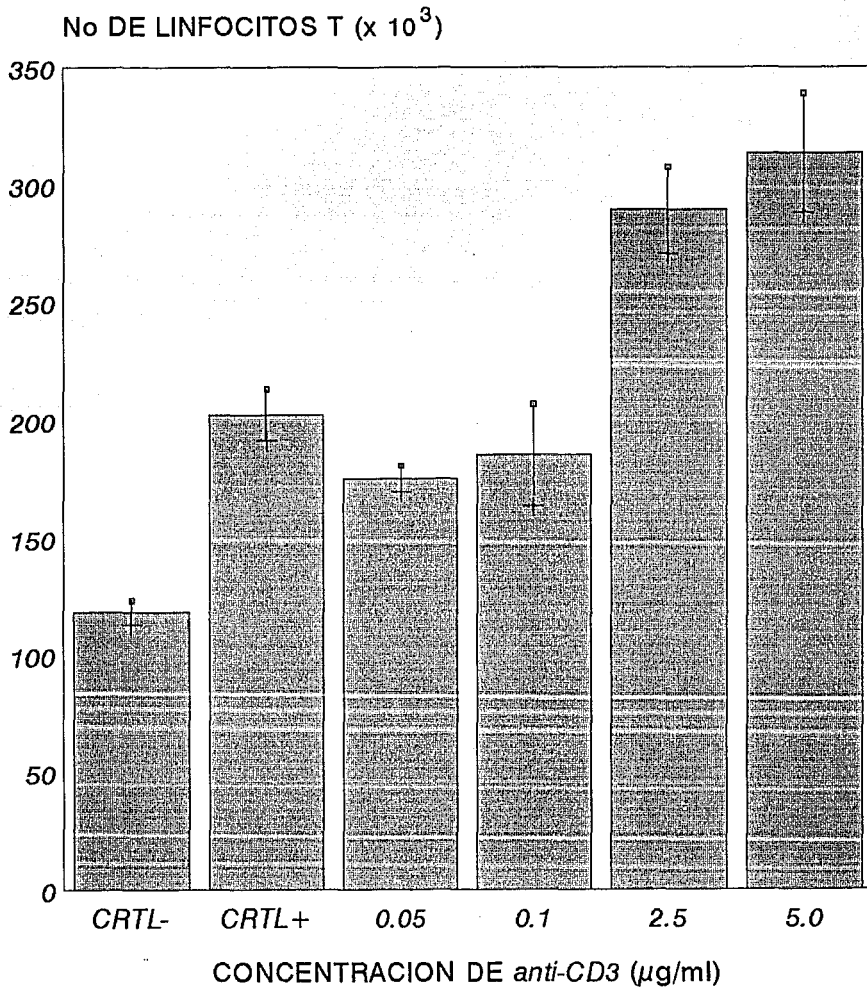
La proliferación de linfocitos se evaluó mediante el co-cultivo con monocitos tratados con *anti-CD3* en presencia de *IL-2rh*. Los controles empleados fueron linfocitos cultivados con monocitos en ausencia de anticuerpo y de *IL-2rh* (*CTRL-*), y linfocitos cultivados con monocitos sin anticuerpo en presencia de *IL-2rh* (*CTRL+*).

Los resultados obtenidos muestran que los linfocitos del *CTRL+* proliferaron de un 90 a un 60 % más que los del *CTRL-* [Gráficas 4-A y 4-B]. En ambos casos, cuando se usaron monocitos tratados con 0.05 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de *anti-CD3* se obtuvo una proliferación significativamente similar a los del *CTRL+* ( $p < 0.01$ , g.l. 18, ANDEVA), mientras que en los casos en los cuales los monocitos fueron tratados con 2.5 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$  de *anti-CD3*, se generó un crecimiento poblacional linfoide 2.5 veces superior a los *CTRL-* y aproximadamente 50 % superior a los *CTRL+* [Gráficas 4-A y 4-B].

Es importante destacar que la eficiencia para generar la proliferación de linfocitos fue marcadamente superior cuando se uso *anti-CD3* adherido a monocitos a las concentraciones de 2.5 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$ , y dado que ambas concentraciones favorecieron una proliferación similar, se decidió usar la concentración de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de *anti-CD3* adherido a monocitos para continuar con los siguientes experimentos.

# GRAFICA 4-A

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE *IL-2rh* Y *anti-CD3* UNIDO A MONOCITOS



CONCENTRACION DE *IL-2rh*: 1000 U.I./ml

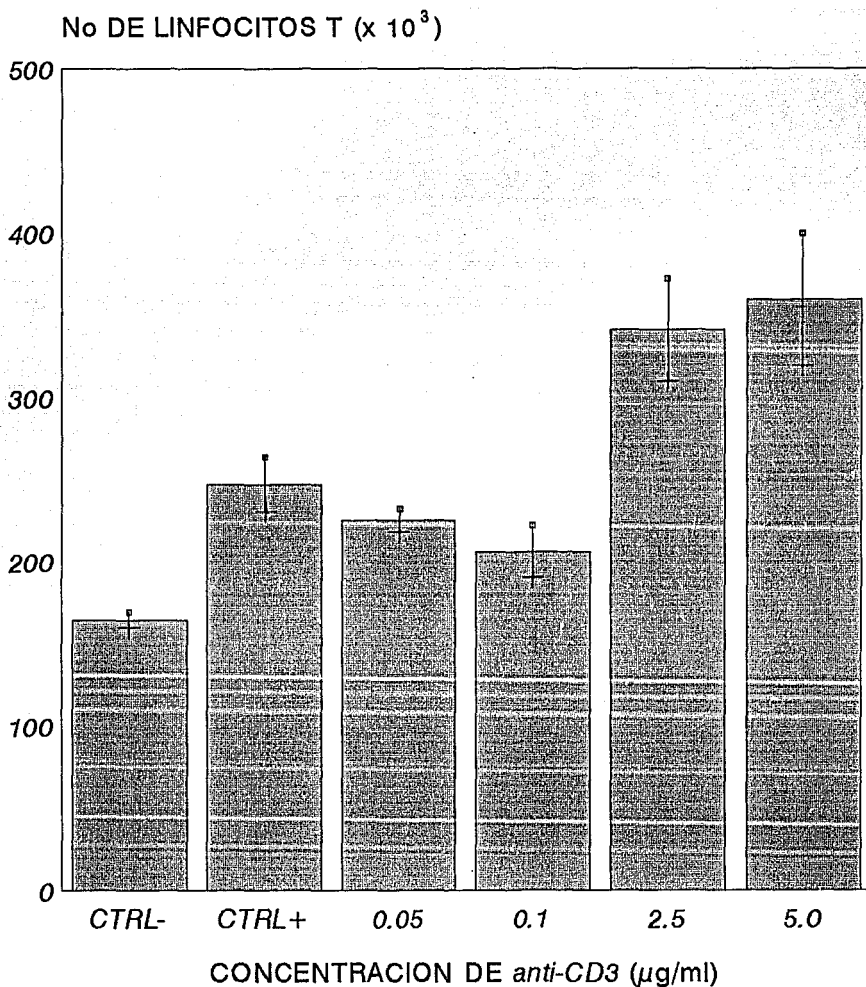
No INICIAL DE LINFOCITOS T: 150 000

CTRL-: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES

CTRL+: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN PRESENCIA DE *IL-2rh*

# GRAFICA 4-B

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE *IL-2rh* Y *anti-CD3* UNIDO A MONOCITOS





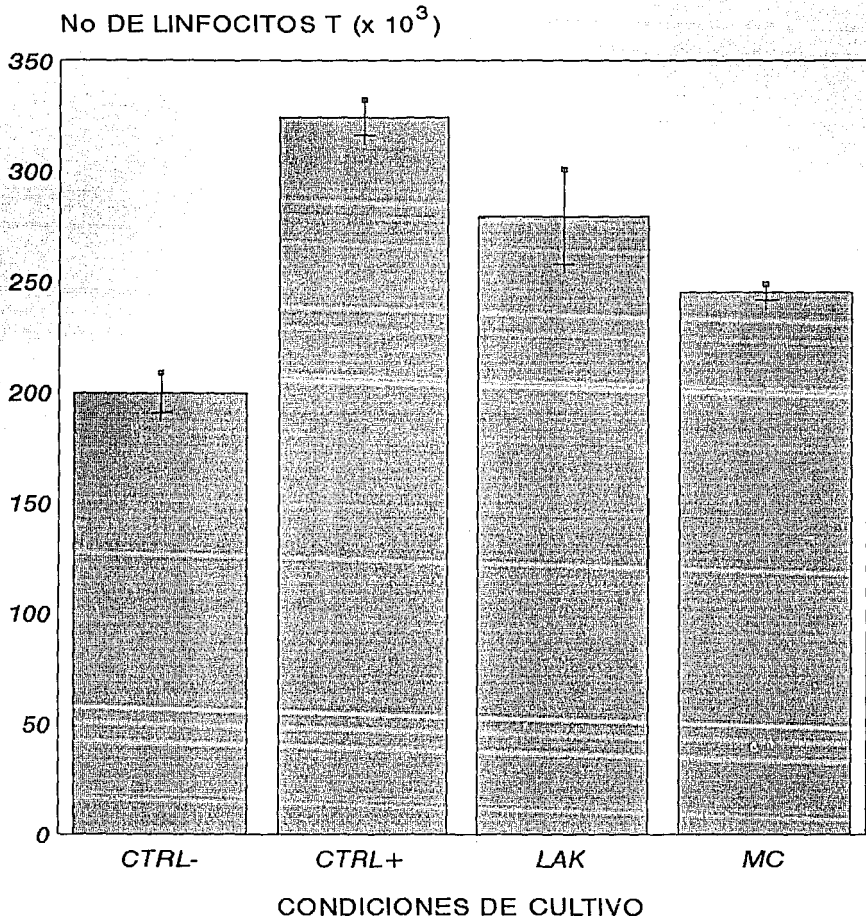
**EFEECTO DEL MEDIO CONDICIONADO (MC) DE MONOCITOS TRATADOS CON anti-CD3 SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON CaCu.**

Como se mostró anteriormente, el anticuerpo *anti-CD3* unido a monocitos favoreció importantemente la proliferación de los linfocitos tanto en presencia como en ausencia de *IL-2rh*. Dados estos resultados, se decidió investigar si las células adherentes, después del tratamiento con *anti-CD3*, eran capaces de activarse y secretar al medio factores con actividad proliferativa para los linfocitos. Para ello, se colectó el medio condicionado (MC) de cultivos de 5 días de monocitos con 2.5 µg/ml de *anti-CD3*, y se procedió a evaluar su efecto en la proliferación de linfocitos. En esta ocasión, los controles empleados fueron: linfocitos cultivados con monocitos en ausencia de factores exógenos (CTRL-); linfocitos cultivados con monocitos previamente tratados con 2.5 µg/ml de *anti-CD3* y en presencia de *IL-2rh* (CTRL+); y de linfocitos cultivados con monocitos sin tratamiento con anticuerpo y en presencia de *IL-2rh* (LAK).

En dos experimentos se encontró que el número celular obtenido en el CTRL- fue significativamente inferior al mostrado por el CTRL+, LAK y MC. Finalmente, la proliferación inducida por el MC proveniente de los monocitos previamente activados con *anti-CD3* resultó ser significativamente similar a la del LAK ( $p < 0.01$ ; 14 g.1; ANDEVA), [Gráfica 5-A y 5-B].

# GRAFICA 5-A

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T INDUCIDA POR "MEDIO CONDICIONADO" DE MONOCITOS

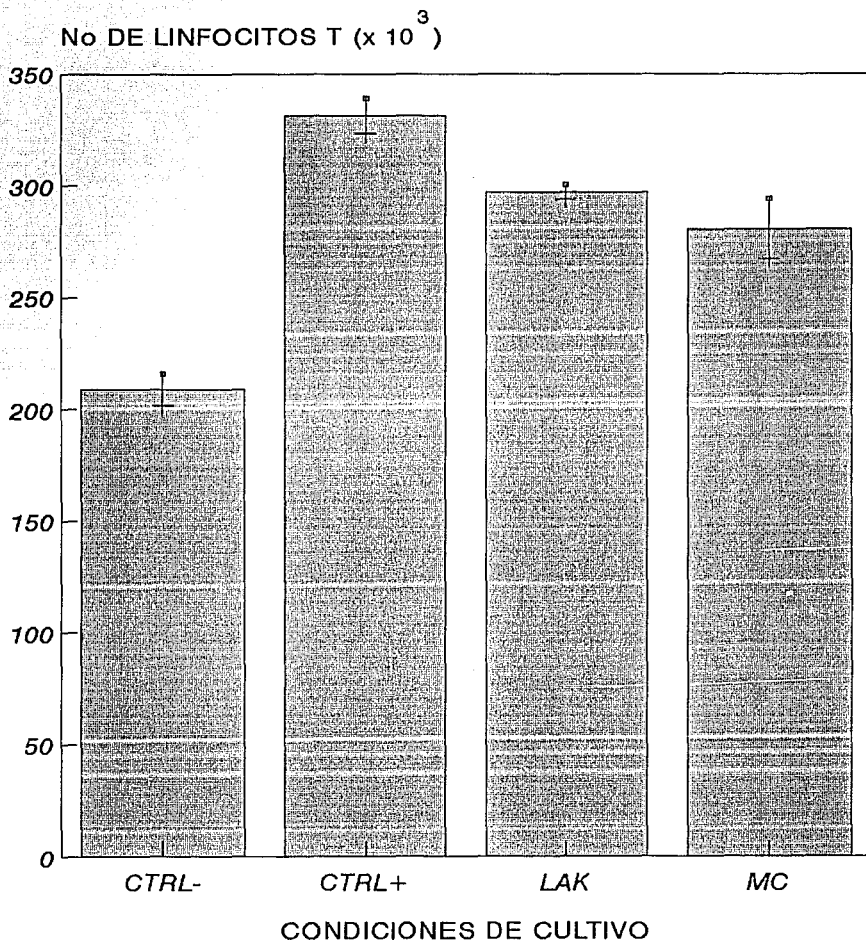


CTRL-: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES  
 CTRL+: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS PREVIAMENTE TRATADOS CON anti-CD3 (2.5  $\mu$ g/ml) Y EN PRESENCIA DE IL-2rh (1000 U.I./ml)

LAK: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN PRESENCIA DE IL-2rh (1000 U.I./ml)  
 MC: MEDIO CONDICIONADO POR MONOCITOS TRATADOS CON anti-CD3 (2.5  $\mu$ g/ml)

# GRAFICA 5-B

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T INDUCIDA POR "MEDIO CONDICIONADO" DE MONOCITOS



No INICIAL DE LINFOCITOS T: 200 000

CTRL-: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES

CTRL+: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS PREVIAMENTE TRATADOS CON anti-CD3 (2.5 µg/ml) Y EN PRESENCIA DE IL-2rh (1000 U.I/ml)

LAK: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN PRESENCIA DE IL-2rh (1000 U.I/ml)

MC: MEDIO CONDICIONADO POR MONOCITOS TRATADOS CON anti-CD3 (2.5 µg/ml)

**EFEECTO ABSOLUTO DE anti-CD3 SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON CaCu.**

En los experimentos anteriores se mostró que el medio condicionado proveniente de monocitos, previamente tratados con anti-CD3, posee actividad proliferativa sobre linfocitos. Sin embargo, con la finalidad de conocer el efecto atribuible exclusivamente a *IL-2* y al anticuerpo anti-CD3 unido a monocitos en dicha proliferación, se diseñó un ensayo múltiple en el que se empleó glutaraldehído para fijar a los monocitos y evitar con ello la secreción de factores al medio.

En estos experimentos el CTRL- fue constituido por linfocitos co-cultivados con monocitos en ausencia de anti-CD3 y de *IL-2rh*; el CTRL+ consistió de linfocitos co-cultivados con monocitos tratados con anti-CD3 y en presencia de *IL-2rh*, y su contraparte en la que los monocitos con anti-CD3 unido fueron fijados con glutaraldehído (CTRL+'). Para analizar el efecto de *IL-2rh* en el sistema, se cultivaron linfocitos con monocitos (sin tratamiento con anti-CD3) y en presencia de *IL-2rh* (LAK), así como con su contraparte constituida por linfocitos co-cultivados con monocitos previamente fijados con glutaraldehído en presencia de *IL-2rh* (LAK'). Finalmente, para analizar el efecto de anti-CD3 en el sistema, se cultivaron linfocitos con monocitos (tratados previamente con anti-CD3) en ausencia de *IL-2rh* (CD3), así como su contraparte formado por linfocitos cultivados con monocitos tratados con anti-CD3 y fijados con glutaraldehído (CD3').

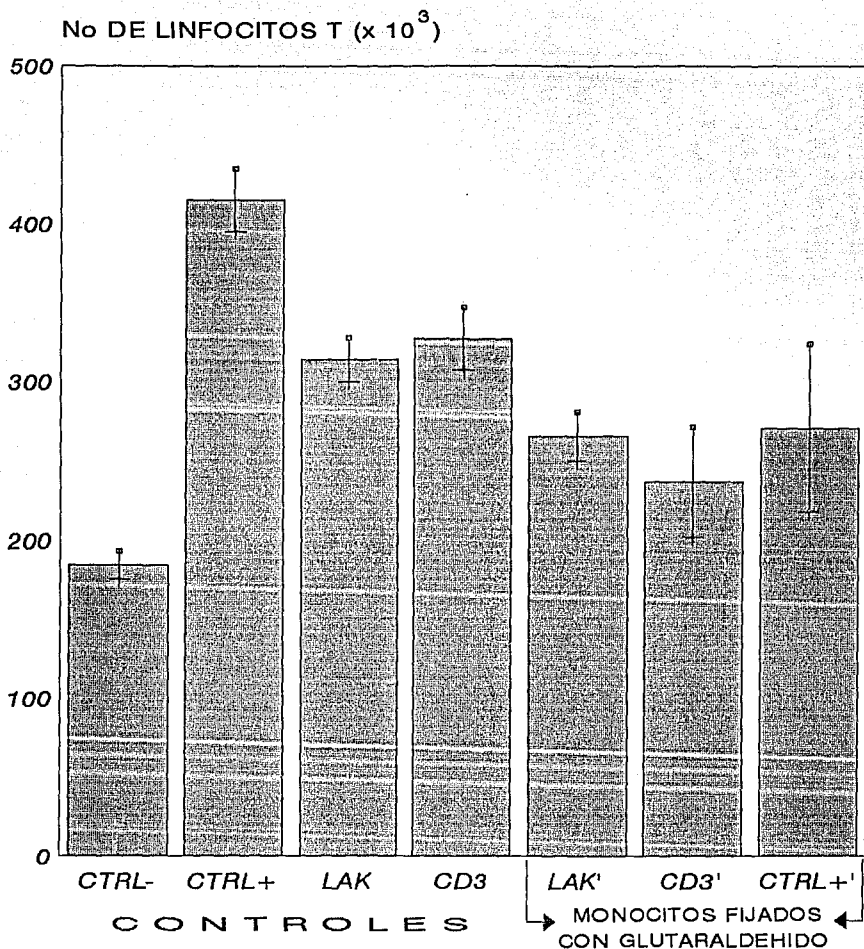
Los resultados obtenidos se presentan en las Gráficas 6-A y 6-B, en donde se puede observar que el CTRL- fue estadísticamente inferior al resto de los controles usados. En las mismas gráficas se puede destacar que en donde se emplearon monocitos fijados con glutaraldehído la proliferación obtenida en todos los casos fue siempre menor a la de su contraparte. En consecuencia, el efecto neto de *IL-2rh* y de *anti-CD3* permite la proliferación de linfocitos, siendo además muy similar entre ellas (*LAK'* y *CD3'*) y con el CTRL+'.

Cabe destacar que la presencia de monocitos sin fijar (células vivas), incrementa la proliferación de los linfocitos inducida por el efecto neto del *anti-CD3* y de la *IL-2rh* (*LAK* y *CD3*), favoreciendo significativamente la proliferación linfoide ( $p < 0.01$ , g.l. 27, ANDEVA).

Es importante hacer notar que en ninguno de los casos se obtuvo un efecto proliferativo similar al del CTRL+, lo que pone de manifiesto que en la proliferación de los linfocitos inducida por *anti-CD3* unido a monocitos y en presencia de *IL-2*, las secreciones de los monocitos juegan un papel muy importante en la proliferación de linfocitos en nuestro sistema.

## GRAFICA 6-A

# PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE MONOCITOS FIJADOS CON GLUTARALDEHIDO



No INICIAL DE LINFOCITOS T: 200 000

CTRL-: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES

CTRL+: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS PREVIAMENTE TRATADOS

CON *anti-CD3* (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Y EN PRESENCIA DE *IL-2 rh* (1000 U.I./ml)

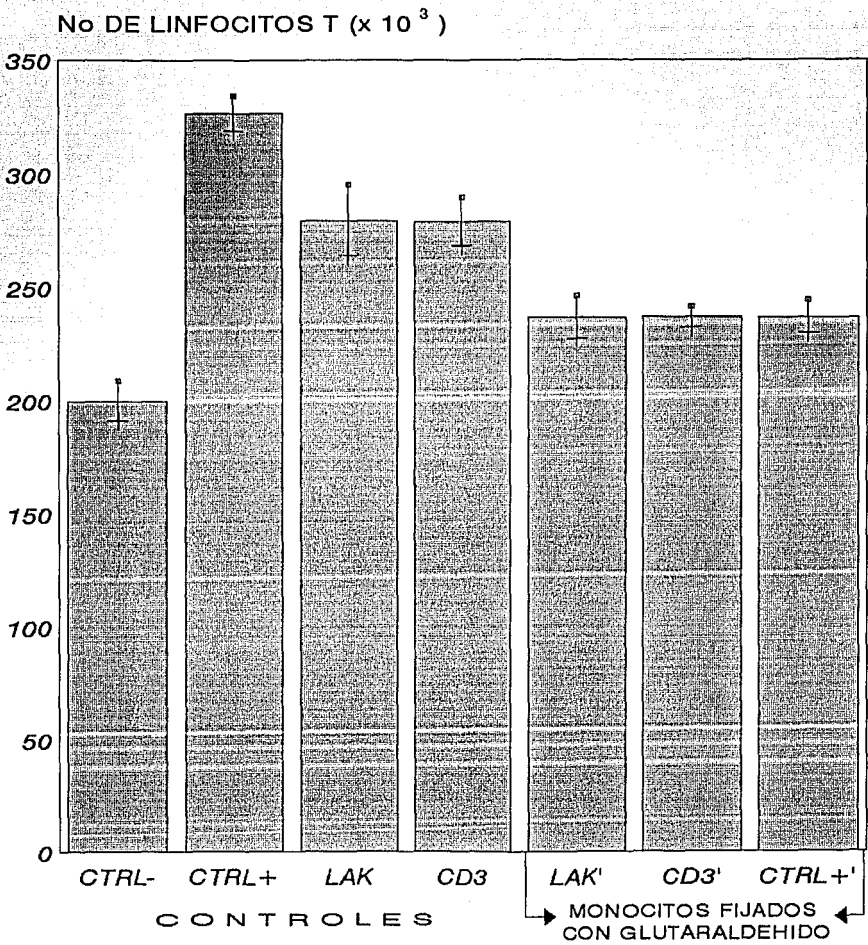
LAK: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN PRESENCIA DE *IL-2rh* (1000 U.I./ml)

CD3: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS PREVIAMENTE TRATADOS

CON *anti-CD3* (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

### GRAFICA 6-B

## PROLIFERACION DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE MONOCITOS FIJADOS CON GLUTARALDEHIDO



No INICIAL DE LINFOCITOS T: 200 000

- CTRL-: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN AUSENCIA DE INDUCTORES
- CTRL+: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS PREVIAMENTE TRATADOS CON anti-CD3 (2.5 µg/ml) Y EN PRESENCIA DE IL-2rh(1000 U.l/ml)
- LAK: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS EN PRESENCIA DE IL-2rh(1000 U.l/ml)
- CD3: LINFOCITOS CO-CULTIVADOS CON MONOCITOS PREVIAMENTE TRATADOS CON anti-CD3 (2.5 µg/ml)

## DISCUSION DE RESULTADOS

La participación de los linfocitos T en la defensa del organismo contra células tumorales y células infectadas por virus, se basa en el reconocimiento de antígenos tumorales de membrana presentes en células malignas (98). Además del reconocimiento antigénico se requiere de la participación de otros elementos moleculares y celulares que conducen a la activación y proliferación de las células T (30).

En el estudio de la activación a la proliferación de linfocitos T se han usado productos de origen vegetal como fitohemoglutinina, citocinas como la *IL-2* o la *IL-4*, y anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el complejo molecular *CD3* presente en la membrana citoplásmica de todas las células T (93).

La *IL-2* ha sido ampliamente usada en la activación de linfocitos T, quedando de manifiesto su importante efecto mitogénico sobre estas células (99).

El uso del *anti-CD3* para la proliferación de linfocitos T, ha ofrecido resultados interesantes, desde los primeros ensayos realizados en la década de los 70's hasta la fecha. Sin embargo, a través de este tiempo una gran heterogeneidad de resultados han sido obtenidos. Dicha variabilidad ha dependido, entre otras cosas: del isotipo de anticuerpo empleado (tipo de IgG) (100); de la cadena del complejo *CD3* a la que van dirigidos los anticuerpos monoclonales (*gamma*, *delta*, *epsilon*, *dzeta* y/o *nu*) (101); de la forma en que estos anticuerpos son utilizados para



estimular a los linfocitos T (soluble, unido a CPA o unido a superficies plásticas) (101,102); y de la concentración de anticuerpo usada.

Dado que la proliferación de linfocitos T no es un evento unifactorial sino que requiere de señales secundarias generadas por otras células como son los macrófagos, en el presente estudio se investigó el efecto que juega el anticuerpo monoclonal anti-CD3 en conjunción con monocitos sobre la proliferación de linfocitos T de pacientes con CaCu y el efecto adicional de IL-2 en este proceso.

Para comenzar el estudio se realizó el análisis morfológico de las poblaciones adherentes y no adherentes con las que se trabajó, tanto al inicio como al final los experimentos, encontrándose que anti-CD3 unido a monocitos, en presencia y ausencia de IL-2, favoreció la proliferación de células con morfología linfoide. Estas observaciones se corroboran con datos publicados por otros investigadores, mismos que establecen que el uso de anti-CD3 es específico para favorecer la proliferación de varias subpoblaciones de células T (103). En base a los resultados obtenidos y considerando que el complejo CD3 solo está presenta en linfocitos T, se asumió que el anti-CD3 usado en nuestro sistema favoreció exclusivamente la proliferación de linfocitos T de pacientes con CaCu.

Por otra parte, al iniciar propiamente los experimentos con el anticuerpo, se evaluó el efecto de anti-CD3 usado de forma soluble en la proliferación de linfocitos, esperando encontrar el crecimiento poblacional de las células linfoides. Los resultados

obtenidos demostrarán que bajo dichas condiciones no se favoreció la proliferación de linfocitos aún en presencia de *IL-2rh*. Una explicación a estas observaciones consiste en que la adecuada estimulación del complejo *RCT-CD3* requiere que su ligando se encuentre inmovilizado, de tal forma que se impida la internalización del complejo molecular y permita con ello la adecuada generación de las señales de transducción, necesarias para la síntesis de *IL-2* y de la expresión de sus receptores (9), nuestros datos confirman esta idea.

Por otra parte, existen resultados que establecen que el uso de *anti-CD3* genera un efecto mitogénico sobre linfocitos T sólo si se añade *IL-2* exógena al medio (8). Sin embargo, cuando se establecieron cultivos de linfocitos con *anti-CD3* soluble e *IL-2rh* no se promovió el crecimiento poblacional de los linfocitos, y contrario a ello, se demostró que el *anti-CD3* usado en forma soluble inhibe la proliferación de linfocitos inducida por *IL-2rh*.

Este fenómeno nos permite sugerir las siguientes hipótesis:

- 1.- Que la señalización inducida por el *anti-CD3* soluble conduce a una ruta de transducción en la que se inhibe la expresión de receptores para *IL-2*, con la consecuente inhabilidad de las células para proliferar aún en presencia de esta interleucina.
- 2.- Que el empleo de *anti-CD3* soluble en combinación con *IL-2rh* induce la proliferación temporal de linfocitos, seguida por la activación de los mecanismos involucrados en la muerte celular programada (Apoptosis) teniendo como consecuencia una elevada mortandad de las células bajo estas condiciones.

Este hecho también se basa en que existen experimentos que muestran que el uso de *anti-CD3* (dirigido a la cadena *epsilon*) sobre hibridomas, células T transformadas y timocitos normales, puede desencadenar la muerte celular programada en ellos (104,105,106).

3.- Que la adecuada proliferación de linfocitos inducida por *anti-CD3* soluble e *IL-2rh* requiere de señales adicionales. Esta hipótesis se respalda por los datos publicados por Wakasugi quien propone que la presencia de monocitos favorece la expresión de *RIL-2* de alta afinidad en linfocitos (107).

4.- Que la estimulación del complejo *RCT-CD3* a través de *anti-CD3* soluble induce un estado de anergia en los linfocitos usados, aun cuando se encuentre presente la *IL-2rh*. Esta hipótesis encuentra apoyo en algunas publicaciones en las que se establece que la estimulación de linfocitos T vía el complejo *RCT-CD3*, requiere de la interacción entre el receptor *CD28* (presente en linfocitos T) y la molécula de membrana llamada *B7* (presente en *CPA*) para habilitar la proliferación de los linfocitos T en respuesta a la *IL-2* (108,109).

5.- La incapacidad mostrada por los linfocitos para proliferar bajo estas condiciones no se le atribuyó a la presencia de factores inhibidores de la proliferación, ya que previos trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los sueros de las pacientes con *CaCu* carecen de esta actividad inhibidora sobre células linfoides (110). Por otra parte, experimentos en los que se ensayó *anti-CD3* soluble e *IL-2rh* sobre linfocitos de donadores

sanos, mostraron el mismo comportamiento inhibitorio obtenido con los linfocitos de pacientes (datos no mostrados).

De acuerdo a nuestros resultados, se demostró que el empleo de *anti-CD3* soluble, bajo nuestras condiciones, no induce la proliferación de linfocitos de pacientes con *CaCu* aun en presencia de *IL-2rh*. En consecuencia, se decidió adicionar a este sistema monocitos, ya que se esperaba que estas células coestimularan la proliferación de linfocitos.

Los resultados mostraron que con 2.5 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo unido a monocitos es posible generar la proliferación de linfocitos de manera similar a como lo hace por sí misma la *IL-2rh* exógena. El efecto proliferativo observado bajo nuestras condiciones se ajusta al modelo de doble señal para linfocitos T propuesto por Bretscher y Cohn (111), en donde se establece que la proliferación de una célula T requiere la activación vía el complejo *RCT-CD3* más una segunda señal proveniente de una *CPA* (111,112). De esta manera, es posible pensar que los monocitos colaboran en la inducción a la proliferación de linfocitos T formando un enlace *monocito-anticuerpo-complejo CD3* (enlace cruzado), mismo que impide la internalización del *RCT-CD3* y favorece con ello la transmisión de señales al núcleo del linfocito para promover la expresión de *RIL-2* y la síntesis de *IL-2*, misma que actúa de forma autócrina o parácrina sobre la población linfoide, y como era de esperarse, la adición de *IL-2rh* exógena a nuestro sistema de cultivo, aumentó significativamente la respuesta proliferativa de los linfocitos.

Por otra parte, podemos considerar que el *anti-CD3* unido a monocitos funciona como un "puente de unión" que propicia un estrecho contacto intercelular entre monocitos y linfocitos, generándose la transmisión de señales (a través de varias moléculas de adhesión) que favorecen la proliferación linfoide.

Estas observaciones ponen de manifiesto el importante papel que juegan los monocitos en la inducción a la proliferación de linfocitos. Sin embargo, consideramos que este mecanismo de activación también involucra la participación de moléculas secretadas por los monocitos. Para esclarecer esta situación, se diseñaron dos experimentos. En el primero se ensayó el medio condicionado por monocitos a los que se les unió *anti-CD3* por su porción *Fc*, teniendo como hipótesis que la unión del anticuerpo a monocitos conduce a su activación y a la subsecuente secreción de citocinas al medio, las cuales en turno promovieran la proliferación de los linfocitos.

Los resultados obtenidos demostraron que el medio condicionado por monocitos posee actividad proliferativa sobre linfocitos, y que esta actividad es similar a la obtenida cuando los linfocitos son estimulados mediante *IL-2rh*.

Se ha demostrado que las CPA secretan al medio una gran variedad de factores que estimulan la proliferación de linfocitos T (31,32), entre estos se encuentra la *IL-1* (que se sabe sinergiza con *IL-2* en la proliferación de células T) (78), *IL-4* e *IL-6* que por sí mismas son capaces de inducir la proliferación de linfocitos T (112,113,114).

De estos experimentos se puede concluir que los monocitos activados mediante el uso de *anti-CD3*, secretan al medio citocinas con actividad proliferativa hacia linfocitos.

El segundo experimento se diseñó con la finalidad de estudiar por separado la participación de *IL-2rh*; *anti-CD3* unido a monocitos; y del medio condicionado en la proliferación de linfocitos.

En estos experimentos se demostró que cada una de estas variables por sí mismas conducen a la proliferación de linfocitos y que la presencia de monocitos viables aumentó significativamente el efecto observado. Estos resultados nos hacen sugerir que la participación de los monocitos a través de la secreción de moléculas al medio es de extrema importancia para la activación de linfocitos bajo las condiciones de nuestro sistema.

Por otra parte, hay que considerar que el efecto proliferativo de los linfocitos también es el resultado del flujo de señales que los linfocitos proporcionan a los monocitos, mismos que responden ante tales estímulos modulando su secreción de citocinas y en consecuencia la proliferación de los linfocitos.

De los anteriores experimentos se puede concluir que la activación a la proliferación de linfocitos, bajo las condiciones empleadas, es el producto de una intrincada comunicación bioquímica en donde citocinas y moléculas de membrana participan importantemente.

Teniendo en mente la posibilidad de usar los resultados obtenidos como una estrategia que permita generar células

efectoras *in vitro* con fines inmunoterapéuticos, podemos resaltar que mediante el empleo de *anti-CD3* unido a monocitos, en ausencia de *IL-2rh*, se promueve la proliferación linfoide de una manera similar a como lo hacen las técnicas convencionales para la obtención de células *LAK* (leucocitos activados por citocinas para matar), pero teniendo como ventaja que unicamente se promueve la proliferación de células *T*, dado que *anti-CD3* reacciona exclusivamente sobre linfocitos *T*, evitando de esta manera la proliferación de células *NK* (mismas que despues de su activación *in vitro*, pueden generar la capacidad de lisar a células normales) (115).

En adición a la propuesta anterior, cabe sugerir que la combinación de *anti-CD3* unido a monocitos con *IL-2rh*, puede emplearse como un método muy efectivo para inducir la proliferación de linfocitos *T* en grandes cantidades, siendo éste hecho la principal ventaja que ofrecería en comparación con los cultivos *LAK*, *MLTC* (mezcla de linfocitos y células tumorales) y *MLC* (mezcla de leucocitos en cultivo), además de que resultaría más sencillo que los métodos *MLTC* y *MLC* debido a que no hay que recurrir a técnicas que nos permitan separar a las células efectoras del resto de las poblaciones presentes en estos cultivos.

Una opción más a las antes expuestas se basa en el uso de *anti-CD3* unido a monocitos y fijados con glutaraldehído como una estrategia que nos permitiría mantener por largos períodos de tiempo el estímulo proliferativo para linfocitos *T*, teniendo como ventajas sobre todas los métodos antes mencionados, que se

favorecería la proliferación linfoide durante largos periodos de tiempo, omitiendo la constante adición de *IL-2* requerida en los cultivos *LAK*, *MLTC* y *MLC*.

Finalmente, la trascendencia de los resultados obtenidos radica en la posibilidad de la aplicación clínica de los linfocitos T activados mediante las estrategias propuestas, y de *anti-CD3* unido a monocitos en el tratamiento inmunoterapéutico de pacientes con *CaCu*. Teniendo en mente lo anterior, se pueden seguir varios caminos para su aplicación, y de los cuales podemos destacar:

1.- La inyección local de linfocitos y monocitos tratados con *anti-CD3*, con la cual se podría favorecer la proliferación de los linfocitos recién incorporados al organismo, y de los linfocitos T que estén infiltrados en el tumor (células que se ha demostrado que son específicas hacia el mismo). La aplicación local de monocitos tratados con *anti-CD3* aseguraría la acción de estas células en el sitio del tumor, además de que presentaría la ventaja de que la activación a la proliferación no requeriría de la administración exógena de *IL-2rh*, evitando con ello los efectos tóxicos inherentes al uso de esta citocina. Además, los monocitos podrían participar directamente en la eliminación del tumor mediante la remoción de desechos celulares y en la fagocitosis de las células cancerosas.

2.- La segunda posibilidad consistiría en inyectar localmente monocitos tratados con anticuerpo y bajas dosis de *IL-2rh*. Esta propuesta tendría la ventaja de favorecer fuertemente la proliferación de los linfocitos localizados en el sitio tumoral.



3.- Inyectar localmente monocitos tratados con *anti-CD3* y fijados con glutaraldehído, favoreciéndose así un constante estímulo proliferativo para los linfocitos T infiltrados en el tumor.

4.- Inyectar localmente *anti-CD3*, esperando con ello que el anticuerpo sea fijado por las CPA para conducir a su activación y secreción local de citocinas importantes en la activación de los linfocitos.

CONCLUSIONES
--------------

1.- El anti-*CD3* usado en forma soluble, por sí solo no favoreció la proliferación de linfocitos T de pacientes con *CaCu*.

2.- La proliferación de linfocitos T inducida por *IL-2rh* fue inhibida por anti-*CD3* usado en forma soluble, y esta inhibición fue dependiente de la dosis de anticuerpo empleada.

3.- Las concentraciones de 2.5 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$  de anti-*CD3* unido a monocitos, favorecieron la proliferación de linfocitos T de pacientes con *CaCu* en ausencia de *IL-2rh*.

4.- El anti-*CD3* unido a monocitos sinergizó con *IL-2rh* en la proliferación de linfocitos T de pacientes con *CaCu*.

5.- El medio condicionado por monocitos estimulados con anti-*CD3* presentó actividad mitogénica sobre linfocitos T de pacientes con *CaCu*.

6.- El anti-*CD3* unido a monocitos fijados con glutaraldehído indujo la proliferación de linfocitos T de pacientes con *CaCu*.

SUGERENCIAS
-------------

- 1.- Obtener poblaciones de monocitos y linfocitos T altamente purificadas.
- 2.- Dilucidar el mecanismo a través del cual *anti-CD3* en forma soluble inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por *IL-2rh*.
- 3.- Determinar el o los tipos de monocinas que son secretadas por los monocitos tratados con *anti-CD3*, y que favorecen la proliferación de linfocitos T.
- 4.- Probar la citotoxicidad de los linfocitos activados con los métodos empleados.
- 5.- Establecer las proporciones fenotípicas (células  $CD4^+/CD8^+$ ) de los linfocitos activados.
- 6.- Determinar la mínima dosis de *IL-2rh* que se puede usar en combinación con *anti-CD3* unido a monocitos, y con la que se pueda generar una óptima proliferación de linfocitos T.
- 7.- Establecer co-cultivos de linfocitos T con monocitos tratados con *anti-CD3*, en presencia de *IL-2rh*, durante períodos de tiempo más largos (más de 7 días).

8.- Co-cultivar linfocitos T con células tumorales autólogas y posteriormente inducir su proliferación mediante las estrategias propuestas.

9.- Activar a la proliferación linfocitos infiltrantes del tumor de pacientes con CaCu mediante los métodos propuestos.

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
-----------------------------------

- 1.- Imboden, J. B., Weiss, A. y Strobo, J. D. (1985). The antigen receptor on a human T-cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *J. Immunology*, 134: 663-665.
- 2.- Samelson, L.E., Harford, J. B. y Klausner, R. D. (1985). Identification of the components of the murine T-cell-antigen-receptor complex. *Cell*, 43: 223-231.
- 3.- Sauerwein, R. W., Van der Meer, W. G. J., Van Oostveen, J. W., Miedema, F. y Aarden, L. A. (1988). Anti-CD3 antibodies induce T-helper function for human B-cell differentiation *in vitro* by an interleukin-2-independent pathway. *Europ. J. Immunol.*, 18: 133-137.
- 4.- Stanková, J., Hoskin, D. W. y Roder, J. C. (1989). Murine anti-CD3 monoclonal antibody induces potent cytolytic activity in both T and NK cell populations. *Cell Immunology*, 121: 13-29.
- 5.- Stanková, J. (1992). Anti-CD3 antibody-treated mice: *in vivo* induction of cytolytic activity and TNF production by lung leukocytes. *Int. J. Cancer*, 51: 259-265.
- 6.- Tamura, T. y Nariuchi H. (1992). T cell activation through TCR/-CD3 complex. *J. Immunology.*, 148: 2370-2377.
- 7.- Palacios, R. (1985). Mechanisms by which accessory cells contribute in growth of resting T lymphocytes initiated by OKT3 antibody. *Eur. J. Immunology.*, 15: 645-651.
- 8.- Tsoukas, C. D., Landgraf, B., Bentin, J., Valentine, M., Lotz, M., Vaughan, J. H. y Carson, D. A. (1985). Activation of resting T lymphocytes by anti-CD3 (T3) antibodies in the absence of monocytes. *J. Immunology*, 135: 1719-1723.
- 9.- Gur, H., Wacholtz, M. C., Davis, L. S., Geppert, T. D. y Lipsky, P. E. (1992). Modulatory effect of agregating the CD3 molecular complex on T cell activation. *Cellular Immunology*, 140: 81-96.
- 10.- Qian, J-H., Titus, J. A., Andrew, S. M., Mezzanzanica, D., Garrido, M. A., Wunderlich, J. R. y Segal, D. M. (1991). Human PBL targeted with bispecific antibodies release cytokines that are essential for inhibiting tumor growth. *J. Immunology*, 146: 3250-3256.
- 11.- Meuer, S. C., Hodgdon, J. C., Hussey, R. E., Protentis, J. R., Schlossman, S. F. y Reinherz, E. L. (1983). Antigen-like effects of monoclonal antibodies directed at receptors on human T cell clones. *J. Exp. Med.*, 158: 988-993.

- 12.- Benacerraf, B. y Unanue, E. R. (1990). *Inmunología*, edit. Médica Panamericana, 2a edic., Buenos Aires, Argentina, pp. 11-49.
- 13.- Ortíz, L. O. (1987). *Inmunología*, edit. Interamericana, México D.F., México, pp. 7-53.
- 14.- Stites, D. P., Stobo, J. D. y Wells, J. V. (1988). *Inmunología Básica y Clínica*, edit. El Manual Moderno, 6a edic., México D. F., México, pp. 13-44.
- 15.- Clark, W. R. (1991). *The experimental foundations of modern immunology*, edit. John Wiley and Sons, Inc; 4a edic., Singapur, Malasia, pp. 17-40.
- 16.- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S. (1991). *Cellular and Molecular Immunology*, edit. W. B. Saunders Co; Philadelphia, U.S.A., pp. 3-167.
- 17.- Beck, G. y Habicht, G. S. (1991). Primitive cytokines: harbingers of vertebrate defense. *Immunology Today*, 12: 180-183.
- 18.- Roith, I. (1991). *Essential Immunology*, edit. Blackwell Scientific Publications, 7a edic., cap 6, London, England, pp. 105-127
- 19.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*, edit. Garland Publishing, Inc; 2a edic., New York, U.S.A., pp. 1001-1057.
- 20.- Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*, edit. Scientific American Books, 2a edic., New York, U.S.A., pp. 556-560
- 21.- Rothbard, J. B., Lechler, R. I., Howland, K., Bal, V., Eckels, D. D., Sekaly, R., Long, E. O., Taylor, W. R. y Lamb, J. R. (1988). Structural model of HLA-DR1 restricted T cell antigen recognition. *Cell*, 52: 515-523.
- 22.- Neefjes, J. J., Stollorz, V., Peters, P. P., Geuze, H. J. y Ploegh, H. L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell*, 61: 171-183.
- 23.- Hackett, C. J. (1989). Cell-mediated processing and presentation of T cell antigenic determinants. *Current Opinion in Immunology*, 2: 117-122.
- 24.- Braciale, T. J. y Braciale, V. L. (1991). Antigen presentation: structural themes and functional variations. *Immunology Today*, 12: 124-129.

- 25.- Monaco, J. J. (1992). A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing, *Immunology Today*, 13: 173-178.
- 26.- Van Rooijen, N. (1990). Antigen processing and presentation *in vivo*: The microenvironment as a crucial factor. *Immunology Today*, 11: 436-439.
- 27.- Azuma, M., Phillips, J. H. y Lanier, L. L. (1992). CD28 co-stimulation of T-cell-mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer: suplement* 7: 33-35.
- 28.- Liu, Y. y Linsley, P. (1992). Costimulation of T-cell growth. *Current Opinion in Immunology*, 4: 265-270.
- 29.- Van Severter, Shimizu, Y. y Shaw, S. (1991). Roles of multiple accessory molecules in T cell activation. *Current Opinion in Immunology*, 3: 294-303.
- 30.- Janeway, Ch. A. y Golstein, P. (1992). Lymphocyte activation and effector functions. *Current Opinion in Immunology*, 4: 241-245.
- 31.- Nathan, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *J. Clin. Inv.*, 79: 319-326.
- 32.- Gordon, S., Fraser, I., Nath, D., Hughes, D. y Clarke, S. (1992). Macrophages in tissues and *in vitro*. *Current Opinion in Immunology*, 4: 25-32.
- 33.- 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: 181-187.
- 34.- Robertson, M. J. y Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 76: 2421-2438.
- 35.- Wright, S. C. y Bonavida, B. (1987). Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity: VII. Functional comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. *J. Immunology*, 138: 1791-1799.
- 36.- Paul, W. E. (1989). *Fundamental Immunology*, edit. Reven Press Ltd, 2a edic; New York, U.S.A., pp. 359-384.
- 37.- Langman, R. E. (1989). *The immune system*, edit. Academic Press, Inc; California, U.S.A., pp. 61-126.
- 38.- Klein, J. (1990). *Immunology*, edit. Blackwell Scientific Publications, Boston, U.S.A., pp. 29-49.

- 39.- Wintrobe, M. M., Lee, G. R., Boggs, D. R., Bithell, T. C., Atnens, J. W. y Foerster, J. (1974). *Clinical Hematology*, edit. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., pp. 221-370.
- 40.- Hood, L. E., Weissman, J. L., Wood, W. B. y Wilson, J. H. (1984). *Immunology*, edit. The Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc., U.S.A, p. 558.
- 41.- Stevenson, H. C. (1989). Adoptive cellular immunotherapy of cancer, edit. Marcel Dekker Inc., immunology series, vol. 48, USA., pp. 1-18.
- 42.- Ham, A. W. (1975). *Tratado de Histología*, edit. Interamericana, 7a edic., México, D.F., México, pp. 235-342.
- 43.- Von Boehmer, H. y Rajewsky, K. (1992). Lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology*, 4: 131-132.
- 44.- Pardoll, D. y Cerrera, A. (1992). Thymic selection. *Current Opinion in Immunology*, 4: 162-165.
- 45.- Von Boehmer, H. (1992). T cell development and selection in the thymus. *Bone Marrow Transplantation*, 6: supplement 1: 46-48.
- 46.- Balkwill, F. (1988). Cytokines-soluble factors in immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 1: 241-249.
- 47.- Paul, W. E. (1989). Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell*, 57: 521-524.
- 48.- Weidmann, E., Sacchi, M., Plaisance, S., Seog, D. H., Yasumura, S., Lin, W., Johnson, J. T., Herberman, R. B., Azzarone, B. y Whiteside, T. L. (1992). Receptors for Interleukin 2 on human squamous cell carcinoma cell lines and tumor *in situ*. *Cancer Research*, 52: 5963-5970.
- 49.- Meager, A. (1991). *Cytokines*, edit. Prentice Hall, Englewood Cliffs, England, pp. 105-124.
- 50.- DeVries, 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.
- 51.- Ojcius, D. M. y Ding-E, Y. J. (1990). Cell-mediated killing: Effector mechanisms and mediators. *Cancer Cells*, 2: 138-145.
- 52.- Lancki, D. W., Hsieh, Ch-S. y Fitch, F. W. (1991). Mechanisms of lysis by cytotoxic T lymphocytes clones. *J. Immunology*, 146: 3242-3249.



- 53.- Arnaiz-Villena, A., Timón, M., Rodríguez-Gallego, C., Pérez-Blaz, M., Corell, A., Martín-Villa J. M. y Regueiro, J. R. (1992). Human T-cell activation deficiencies. *Immunology Today*, 13: 259-264.
- 54.- Ferran, C., Sheehan, K., Dy, M., Schreiber, R., Merite, S., Landais, P., Noel, L. H., Grau, G., Bluestone, J., Bach, J. F. y Chatenoud, L. (1990). Cytokine-related syndrome following injection of anti-CD3 monoclonal antibody: further evidence for transient *in vivo* T-cell activation. *Europ. J. Immunol.*, 20: 509-515.
- 55.- Flamand, V., Abramowicz, D., Goldman, M., Biernaux, C., Huez, G., Urbain, J., Moser, M. y Leo, O. (1990). Anti-CD3 antibodies induce T cells from unprimed animals to secrete IL-4 both *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunology*, 144: 2875-2882.
- 56.- Hirsch, R., Gress, R. E., Pluznik, D. H., Eckhaus, M. y Bluestone, J. A. (1989). Effects of *in vivo* administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T-cell function in mice: II. *In vivo* activation of T cells. *J. Immunology*, 142: 737-743.
- 57.- DeVita, V. T., Hellman, S. y Rosenberg, S. A. (1991). *Biologic Therapy of Cancer*, edit. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, USA., p. 409.
- 58.- Mills, G. B., Zhang, N., Schmandt, R., Fung, M., Greene, W., Mellors, A. y Hogg, D. (1991). Transmembrane signalling by Interleukin 2. *Biochemical Society Transactions*, 19: 277-287.
- 59.- Dembic, Z., Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Kiefer, H., Von Boehmer, H. y Steinmetz, M. (1986). Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature*, 320: 232.
- 60.- Saito, T., Weiss, A., Miller, J., Norcross, M. A. y Germain, R. N. (1987). Specific antigen-Ia activation of transfected human T cells expressing murine T<sub>H</sub>1 alpha/beta-human T<sub>H</sub>3 receptor complexes. *Nature*, 325: 125.
- 61.- Tan, L., Turner, J. y Weiss, A. (1991). Regions of the T cell receptor alpha and beta chains that are responsible for interactions with CD3. *J. Exp. Med.*, 173: 1247-1256.
- 62.- Clevers, H., Alarcon, B., Willeman, T. y Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.*, 6: 629-636.
- 63.- Weissman, A. M., Hou, D., Orloff, D. G., Modi, W. S., Seuanez, H., O'Brien, S. J. y Klausner, R. D. (1988). Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor dzeta chain: Distinction from the molecular CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 9709.

- 64.- Brenner, M. B., Strominger, J. L. y Krangel, M. S. (1988). The gamma/delta T-cell receptor. *Advanc. Immunol.*, 43: 133-192.
- 65.- Chan, A. C., Irving, B. A. y Weiss, A. (1992). New insights into T-cell antigen receptor structure and signal transduction. *Current Opinion in Immunology*, 4: 426-251.
- 66.- Cambier, J. H. (1992). Signal transduction by T- and B-cell antigen receptors: Converging structures and concepts. *Current Opinion in Immunology*, 4: 257-264.
- 67.- Bauer, A., McConkey, D. J., Howard, F. D., Clayton, L. K., Novick, D., Koyasu, S. y Reinherz, E. L. (1991). Differential signal transduction via T-cell receptor CD3 dzeta2, CD3 dzeta-nu, y CD3 nu2 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 3842-3846.
- 68.- Baniyash, M., Garcia-Morales, P., Bonifacino, J. S., Samelson, L. E. y Klausner, R. D. (1988). Disulfide linkage of the dzeta and nu chains of the T cell receptor. *J. Biol. Chem.*, 263: 9874-9878.
- 69.- Orloff, D. G., Frank, S. J., Robey, F. A., Weissman, A. M. y Klusner, R. D. (1989). Biochemical characterization of the nu chain of the T-cell receptor. A unique subunit related to dzeta. *J. Biol. Chem.*, 264: 14812-14817.
- 70.- Clayton, L. K., Lerner, A., Diener, A. C., Hussey, R. E., Koyasu, S. y Reinherz, E. L. (1992). T-Cell-Receptor isoforms. *Int. J. Cancer: Supplement* 7: 1-5.
- 71.- Park, D. J., Rho, H. W. y Rhee, S. G. (1991). CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C- $\delta$ 1 on serine and tyrosine residues in a human T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 5453-5356.
- 72.- Augustine, J. A., Secrist, J. P., Daniels, J. K., Leibson, P. J. y Abraham, R. T. (1991). Signal transduction through the T cell antigen receptor. *J. Immunology*, 146: 2889-2897.
- 73.- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308: 693-695.
- 74.- Berridge, M. e Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341: 197-199.
- 75.- June, C. H., Fletcher, M. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Siegel, J. N., Philips, A. F. y Samelson, L. E. (1990). Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T cell receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 7722-7726.

- 76.- Weiss, A. y Imboden, J. B. (1987). Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.*, 41: 1-9.
- 77.- Samelson, L. E., Patel, M. D., Weissman, A. M., Harford, J. B. y Klausner, R. D. (1986). Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell*, 46: 1083-1092.
- 78.- Aggarwal, B. B. y Gutterman, J.U. (1992). *Human Cytokines: Handbook for basic and clinical research*, edit. Blackwell Scientific Publications, Boston, U.S.A., pp. 81-96
- 79.- Robb, R. J., Kutny, R. M., Panico, M., Morris, H. R. y Chowdhry, V. (1984). Amino acid sequence and post-translational modification of human interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 6486-6490.
- 80.- Wang, A., Lu, S.-D. y Mark, D. F. (1984). Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2 gene: Structure-function analysis of the cysteine residues. *Science*, 224: 1431-1433.
- 81.- Robb, R. J. y Smith, K. A. (1981). Heterogeneity of human T-cell growth factor(s) due to variable glycosylation. *Mol. Immunol.*, 18: 1087-1094.
- 82.- Robb, R. J. (1985). Interleukin 2 and its cell-surface receptor. *Behring Inst. Mitt.*, 77: 56-67.
- 83.- Leonard, W. J., Deppert, J. M., Uchiyama, T., Smith, K. A., Waldmann, T. A. y Green, W. C. (1982). A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. *Nature*, 300: 267-269.
- 84.- Ortega, G., Robb, R. J., Shevach, E. M. y Malek, T. R., (1984). The murine IL-2 receptor I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cell. *J. Immunology*, 133: 1970-1975.
- 85.- Mainero, R. F. E., Torres, L. A. y Figueroa, V. J. I. (1992). Frecuencia relativa del cáncer en el servicio de oncología del Hospital General de México, SS, 1984-1988. *Rev. INC.*, 38: 1512-1517.
- 86.- Pielch, H. Y. (1984). *Surgical Oncology*, edit. Mc Graw-Hill Book Co., U.S.A, pp. 751-774.
- 87.- 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 human papillomavirus-encoded nuclear antigen expressed in virus-carrying cervical neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 3838-3841.

- 88.- Wright, T. H. y Richart, R. M. (1990). Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecol. Oncology*, 37: 151-164.
- 89.- Gariglio, P. y Carrancá, G. A. (1990). Papillomavirus humanos y cáncer cérvico-uterino. *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.*, 8: 45-58.
- 90.- Zur Hausen, H. (1985). Genital papillomavirus infections. *Prog. Med. Virol.*, 32: 15-21.
- 91.- Jones, H., Roberts, G., Hole, N., McDicken, I. W. y Stern, P. (1990). Investigation of expression of 5T4 antigen in cervical cancer. *Brit. Med. Bull.*, 61: 96-100.
- 92.- LaFond, R. E. (1988). Cancer, The outlaw cell, edit. The American Chemical Society, 2a edic., cap. 14, USA, pp. 237-250.
- 93.- Yannelli, J. R. (1991). The preparation of effector cells for use in the adoptive cellular immunotherapy of human cancer. *J. Immunol. Methods.*, 139: 1-16.
- 94.- Massaro, A. F., Schoof, D. D., Rubinstein, A., Zuber, M., Leonard-Vidal, F. J. y Eberlein, T. J. (1990). Solid-phase anti-CD3 antibody activation of murine tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Res.*, 50: 2587-2592.
- 95.- Yanelli, J. R., Crumpacker, D. B., Good, R. W., Friddell, C. D., Poston, R., Horton, S., Maleckar, J. R. y Oldham, R. K. (1990). Use of anti-CD3 monoclonal antibody in the generation of effector cells from human solid tumors for use in cancer biotherapy. *J. Immunol. Methods.*, 130: 91-99.
- 96.- Gallinger, S., Hoskin, D. W., Mullen, J. B. M. Wong, A. H. C. y Roder, J. C. (1990). Comparison of cellular immunotherapies and anti-CD3 in the treatment of MCA-28-LD experimental hepatic metastases in C57BL/6 mice. *Cancer Res.*, 50: 2476-2480.
- 97.- Ellenhorn, J. D. I., Schreiber, H. y Bluestone, J. A. (1990). Mechanism of tumor rejection in anti-CD3 monoclonal antibody-treated mice. *J. Immunology*, 144: 2840-2846.
- 98.- Yu, A. T., Broker, B. M. y Emmrich, F. (1992). Inhibition of the anti-CD3-induced T cell proliferation by crosslinking of stimulatory antibodies in the presence of PMA and Interleukin-2. *Cellular Immunology*, 140: 97-111.
- 99.- Van der Bruggen, P. y Van den Eynde, B. (1992). Molecular definition of tumor antigens recognized by T lymphocytes, *Current Opinion in Immunology*. 4: 608-612.
- 100.- Smith, K. A. (1992). Interleukin-2. *Current Opinion in Immunology*, 4: 271-276.

- 101.- Schwinzer, R., Franklin, R. A., Domenico, J., Renz, H. y Gelfand, E. W. (1992). Monoclonal antibodies directed to different epitopes in the CD3-TCR complex induce different states of competence in resting human T cells. *J. Immunology*, 148: 1332-1328.
- 102.- Jung, G. y Muller, E. H. J. (1988). An *in vitro* model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates. *Immunology Today*, 9: 257-259.
- 103.- Geppert, T. D. y Lipsky, P. E. (1991). Immobilized anti-CD3-induced T cell growth: Comparison of the Frequency of responding cells within various T cell subsets. *Cellular Immunology*, 133: 206-218.
- 104.- Mercép, M., Bluestone, J. A., Noguchi, P. D. y Ashwell, J. D. (1988). Inhibition of transformed T cell growth *in vitro* by monoclonal antibodies directed against distinct activating molecules. *J. Immunology*, 140: 324-335.
- 105.- Mercép, M., Weissman, A. M., Frank, S. J., Klausner, R. D. y Ashwell, J. D. (1989). Activation-drive programmed cell death and T cell receptor dzeta-nu expression. *Science*, 246: 1162-1165.
- 106.- Golstein, P., Ojcius, D. M. y Young, D.-E. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.*, 121: 29-65.
- 107.- Wakasugi, H., Bertoglio, J., Tursz, T. y Fradelizi, D. (1985). IL-2 receptor induction on human T lymphocytes: Role for IL-2 and monocytes. *J. Immunology*, 135: 321-327.
- 108.- Norton, S. D., Hovinen, D. E. y Jenkins, M. K. (1991). IL-2 secretion and T cell clonal anergy are induced by distinct biochemical pathways. *J. Immunology*, 146: 1125-1129.
- 109.- Fraser, J. D., Newton, M. E. y Weiss, A. (1992). CD28 and T cell antigen receptor signal transduccion coordinately regulate Interleukin 2 gene expression in response to superantigen stimulation. *J. Exp. Med.*, 175: 1131-1134.
- 110.- Rangel, C. R., Monroy, G. A., Rocha, Z. L., Trejo, B. C., Mohar, B. A., Ramirez, G. J. L., Méndez, M. L. y Weiss, S. B. (1992). Proliferación de leucocitos de sangre periférica en presencia de sueros de pacientes con cáncer cérvico-uterino e interleucina-2 recombinante. *Rev. INC.*, 38: 1547-1554.
- 111.- Bretscher, P. (1992). The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunology Today*, 13: 74-76.
- 112.- Jenkis, M. C. (1992). The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunology Today*, 13: 69-73.

- 113.- Paliard, X., DeVries, J. E. y Spits, H. (1991). Comparison of lymphokine secretion and responsiveness of human T cell clones isolated in IL-4 and in IL-2. *Cellular Immunology*, 135: 383-393.
- 114.- Galandrini, R., Cerneti, C., Albi, N., Dembech, Ch., Terenzi, A., Grignani, F. y Velardi, A. (1991). Interleukin-6 is constitutively produced by human CTL clones and is required to maintain their cytolytic function. *Cellular Immunology*, 138: 11-23.
- 115.- Malkovska, V., Sondel, P. M. y Malkovsky, M. (1989), Tumour immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 1: 883-890.
- 116.- Marques, C. M. J. (1988). Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas, UNAM, México D. F., México, pp. 361-386.

**APENDICES****APENDICE 1****PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO RPMI-1640**

El medio de cultivo RPMI-1640 fue desarrollado por Moore y colaboradores en el Roswell Park Memorial Institute usando como base la fórmula del medio RPMI-1630 y alterando las concentraciones de vitaminas y aminoácidos, así como también adicionando un sistema amortiguador de bicarbonatos.

Para preparar un litro de este medio se adiciona a un volumen de 950 ml de agua bidestilada, 16.4 g de RPMI-1640 (Sigma Chemical, Cell Culture Reagents, USA), se agita suavemente hasta disolver, y posteriormente se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de estreptomocina, 100 U/ml de penicilina y 2 mM de L-glutamina. En seguida se ajusta el pH a 7.2 (con ácido clorhídrico), se afora a un litro y se esteriliza por filtración con membranas de poro de 0.22  $\mu$ .

**APENDICE 2****PREPARACION DEL COLORANTE DE GIEMSA**

A un volumen de 9 ml de agua se adiciona 1 ml de colorante Giemsa modificado por Wolbach (Sigma de México, S. A.), se agita perfectamente y se coloca una gota de esta solución sobre la preparación celular.

**APENDICE 3****PREPARACION DEL COLORANTE AZUL DE TRIPANO**

Para la evaluación de la proliferación celular a través de exclusión con azul tripano, se emplea una dilución del colorante azul tripano (Sigma de México, S. A.) al 0.3 % en SAF, misma que se filtró con papel filtro Whatman del número 2 (Whatman, England).

**APENDICE 4**

**PREPARACION DE LA SOLUCION DE GLUTARALDEHIDO EN SAF**

La solución amortiguadora de fosfatos (SAF) se prepara añadiendo a un volumen de 950 ml de agua destilada a 4 °C los siguientes reactivos.

Cloruro de sodio.....	8.0 g
Fosfato de potasio diácido.....	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico (dodecahidratado).....	2.9 g
Cloruro de potasio.....	0.2 g

Posteriormente se agita vigorosamente, se ajusta el pH a 7.2, se afora a 1 litro y se esteriliza a 20 lb de presión durante 20 min.

La solución de glutaraldehído en SAF se prepara adicionando 0.090 ml de glutaraldehído al 50 % de pureza en 90 ml de SAF, se afora a 100 ml y se filtra con membrana de poro de 0.22  $\mu$ .

**APENDICE 5**

**ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR EN EL DISEÑO  
COMPLETAMENTE ALEATORIO**

El análisis de varianza (ANDEVA) es una técnica estadística que considera a la suma de la magnitud de cada fuente de variación, que es igual a la varianza total.

El análisis de varianza de un factor en el diseño completamente aleatorio supone que existen N poblaciones distintas distribuidas normalmente, con M medias que poseen cada una su desviación (dependiente del efecto del tratamiento). Además, se considera que las N poblaciones constituyen una gran población con una media poblacional llamada " Gran Media".

El modelo propone que la desviación de una observación con relación a la gran media se puede descomponer en la desviación entre tratamientos (efecto del tratamiento) y desviación dentro del tratamiento (error residual), correspondiéndole a cada una de estas desviaciones un estimador insesgado obtenido a partir de las sumas de sus cuadrados. Las ecuaciones para estos estadígrafos se resumen en la siguiente tabla de ANDEVA.



FUENTE DE VARIACION	g. DE L.	SUMAS DE CUADRADOS (SC)	VARIANZA O CUADRADOS MEDIOS (CM)
Entre tratamientos	K-1	$SC = \sum_{j=1}^K \frac{x^2 \cdot j}{n_j} - \frac{X^2 \cdot \cdot}{N}$	$CM = \frac{SC_{trat}}{K-1}$
Dentro tratamientos o error residual	N-K	$SC = \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x^2_{ij} - \sum_{j=1}^K \frac{x^2 \cdot j}{n_j}$	$CM = \frac{SC_{error}}{N-K}$
Total	N-1	$SC = \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} x^2_{ij} - \frac{X^2 \cdot \cdot}{N}$	

Si las medias de las diferentes poblaciones son iguales, entonces estos dos estimadores ( $CM_{trat}$  y  $CM_{error}$ ) serían aproximadamente iguales, y el cociente:

$$\frac{CM_{trat}}{CM_{error}} = F_{calc.} = \frac{S^2_{trat}}{S^2_{error}}$$

que es una variable F de Fisher, será igual a la unidad o cercano a la unidad.

Por el contrario, si las medias de las diferentes poblaciones son diferentes, el cociente:

$$\frac{CM_{trat}}{CM_{error}} = F_{calc.}$$

será mayor que los valores de referencia (F de tablas o F teórica)  $F_{1-\alpha}$ , gl. trat. gl. error, donde :

$$gl_{trat.} = K - 1, y$$

$$gl_{error} = N - K$$

Si F calculada > F teórica, se procede a efectuar un análisis de diferencia significativa mínima de Fisher (116).

<b>APENDICE 6</b>
-------------------

**PRUEBA DE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA MINIMA (DSM) DE FISHER**

Esta prueba se realiza cuando el análisis de varianza indica que existe diferencia entre las medias de dos o más poblaciones, indicándonos entre que pares de medias existe esta diferencia.

La *DSM* se define como la diferencia mínima que puede existir entre dos medias de muestras significativamente diferentes.

La *DSM* se calcula empleando la siguiente ecuación.

$$DSM = t_{1-\alpha/2, g} \cdot \sqrt{\frac{2S^2_{error}}{n}}$$

Si *DSM* calculado es < la diferencia de medias entre dos poblaciones, entonces hay diferencia significativa entre esas poblaciones (116).