

22
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

EFFECTO DE INTERLEUCINA-2 (IL-2), INTERFERON- γ (IFN- γ) Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α (TNF- α) EN LA INDUCCION DE CITOTOXICIDAD ESPECIFICA DE LINFOCITOS T CONTRA CELULAS TUMORALES AUTOLOGAS DE CANCER CERVICO UTERINO.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :

MARIA DE JESUS IBARRA SANCHEZ

**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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Profesionales Zaragoza, U.N.A.M., bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y el Dr. Benny Weiss-Steider.

Durante la realización de la presente Tesis se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (D. G. A. P. A.), mediante el programa de Becas para Tesis de Licenciatura.

A MIS PADRES: JUAN y CONCEPCION

Con profundo amor y admiración por su dedicación y entereza, con gratitud por el apoyo que me han brindado durante toda mi carrera, además de sus consejos y enseñanzas las cuales me han servido de guía durante toda mi vida.

A LETICIA ROCHA:

Con profundo cariño por su gran apoyo y enseñanzas, las cuales culminan en el presente trabajo.

A EDGAR:

Por su amor, comprensión y gran paciencia.

A ADRIANA ESPINOSA:

Por su incalculable apoyo moral.

A MAGDALENA:

Por compartir todas mis locuras, así como mis alegrías y momentos de tristeza.

Desco agradecer a la M. en C. Rosalva Rangel Corona y al Dr. Benny Weiss Steider por su asesoría y enseñanzas con la cuales me fue posible realizar este trabajo.

Agradezco al personal médico y del departamento de investigación del Instituto Nacional de Cancerología, en especial al Dr. Angel Herrera Gómez y la Enfermera Beatriz Zamora por las facilidades prestadas en la obtención del material biológico empleado en este trabajo.

De la misma manera agradezco a los Sres. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su asistencia técnica.

**A LOS QUE PADECEN CANCER CON LA FE DE ENCONTRAR PRONTO
UNA SOLUCION DEFINITIVA A SU ENFERMEDAD**

INDICE

RESUMEN	1
MARCO TEORICO	2
I. DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER	2
II. CANCER CERVICO UTERINO	3
IIa. FACTORES DE RIESGO Y ETIOLOGIA	3
III. SISTEMA INMUNE	4
IIIa. LINFOCITOS T	7
IIIb. MODULADORES BIOLOGICOS	8
-INTERLEUCINA-2	10
-INTERFERON- γ	11
-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α	12
IV. RESPUESTA INMUNE	12
V. INMUNOLOGIA TUMORAL	16
VI. INMUNOTERAPIA ADOPTIVA	17
HIPOTESIS	20
OBJETIVOS	21
METODO	22
RESULTADOS	29
DISCUSION	49
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58
APENDICES	68

RESUMEN

En nuestro laboratorio se había demostrado que la combinación de interleucina-2 (IL-2) + interferón- γ (IFN- γ) + factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) era capaz de generar una gran respuesta proliferativa sobre leucocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu) y que las células generadas en co-cultivo de 4 semanas presentaban una gran actividad citotóxica específica hacia células tumorales autólogas, lo cual fue confirmado en el presente trabajo. Una aportación más es el haber determinado que desde la segunda semana de cultivo es posible generar una respuesta citotóxica-específica hacia las células tumorales aunque suele ser menor que la obtenida a 21 días. Al tratar de determinar de los moduladores biológicos (MB) empleados era el causante del efecto citotóxico antes mencionado, encontramos que las tres citocinas se encuentran involucradas en los fenómenos de proliferación y citotoxicidad, aunque el TNF- α parece ser el factor que promueve una gran actividad lítica por su actividad antitumoral y su capacidad de sintetizar moléculas involucradas en el proceso de lisis celular por parte de los linfocitos T citotóxicos (LTC). Por otra parte, las citocinas utilizadas en estos ensayos desplazan la proporción de células CD4:CD8 (2:1) hacia la población CD8, obteniendo un equilibrio en la secreción de citocinas, por parte de las poblaciones generadas, que pudieran interferir en los procesos de proliferación y citotoxicidad.

Finalmente, debemos mencionar que cuando se co-cultivan LSP de pacientes con CaCu en presencia de los tres MB se genera un mayor porcentaje de células de memoria. Además, los resultados de este trabajo proporcionan evidencias de que es posible generar una gran actividad citotóxica-específica contra las células tumorales autólogas a partir de los 14 días de co-cultivo y que ésta se puede mantener hasta por 4 días en ausencia de MB, lo cual es un paso muy importante pensando en la posible aplicación de estos LTC utilizando la combinación de IL-2 + IFN- γ + TNF- α .

MARCO TEORICO

I. DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER.

La diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula primitiva, aún sin características funcionales específicas, llega a convertirse en una célula con características fisiológicas y metabólicas específicas (1).

Por otra parte, el proceso por el cual una célula especializada pierde sus características fisiológicas y metabólicas, se le conoce como *desdiferenciación*. A causa de éste, se produce una reorientación de los patrones del metabolismo, originando una síntesis continua de ácidos nucleicos, proteínas mitogénicas y enzimáticas y otras sustancias relacionadas con la proliferación celular (2). Cuando se da la expresión de nuevas formas tisulares originadas a expensas de un grupo celular localizado en un área determinada del tejido, con un aumento en el número de células y con una multiplicación progresiva y aparentemente autónoma de control tisular, se desarrolla una neoplasia (3).

De acuerdo a su comportamiento las neoplasias pueden clasificarse en benignas o malignas. Estas últimas comúnmente llamadas *cáncer*, a diferencia de las benignas, son grupos de células que crecen invadiendo las estructuras y tejidos circundantes incluyendo vasos sanguíneos y conductos nerviosos. Dado su crecimiento autónomo algunas neoplasias malignas pueden establecer de nuevas colonias en distintas partes del organismo, dándose un crecimiento secundario conocido como *metástasis* (4, 5).

El *cáncer* es una enfermedad multifactorial, ya que se encuentra asociado con factores físicos como la radiación, sustancias químicas algunos de las cuales son arrojadas al ambiente por las industrias y otras son empleadas en la producción de alimentos teniendo todos ellos gran potencial cancerígeno, además

algunas neoplasias se han relacionado con el uso prolongado de anticonceptivos orales, infecciones con determinados virus y con algunos factores genéticos (6-9).

II. CANCER CERVICO-UTERINO.

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es el cáncer es el de mayor incidencia en nuestro país, ocupando en la actualidad el primer lugar como causa de muerte entre las enfermedades neoplásicas (10, 11).

El cáncer cérvico-uterino tiene un desarrollo gradual, a partir de sus precursores pre-invasores, en las capas intraepiteliales del cérvix, que *in situ* puede permanecer asintomático por varios años. A estas anomalías tempranas del cérvix se les conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC), las cuales generalmente son diagnosticadas en mujeres de 30-40 años de edad. Para que un NIC evolucione a un CaCu se pueden requerir de 8-20 años (12), y en la mayoría de los casos transcurren de 5-10 años para que las células transformadas penetren la membrana basal e invadan otros tejidos. Una vez ocurrido esto las pacientes que no han recibido tratamiento, o que no han respondido a éste, mueren en un periodo de 3 a 5 años (13).

II a. FACTORES DE RIESGO Y ETIOLOGIA

Las causas que originan el CaCu aún son desconocidas, sin embargo, existen algunos estudios donde se establece una posible relación entre el desarrollo del CaCu y el tabaquismo (directo o pasivo), el uso de anticonceptivos, las deficiencias nutricionales, factores higiénicos y el comportamiento sexual (14,15). Por otra parte, el CaCu ha sido estrechamente asociado con infecciones virales causadas por la ciertos tipos de virus como el papiloma humano (VPH).

A su vez se ha mencionado que el inicio de una vida sexual activa a edad temprana, la multiparidad y un número elevado de compañeros sexuales son factores de alto riesgo para el desarrollo del CaCu dado que aumenta la posibilidad de adquirir infecciones genitales, entre las que se encuentra la causada por el VPH (16).

Los VPH son una familia de DNA virus que inducen el desarrollo de tumores en epitelios y fibroblastos de piel o mucosa en vertebrados. Estos tumores, llamados papilomas generalmente son benignos, y presentan un crecimiento limitado que frecuentemente sufre una regresión espontánea (17, 18).

El reconocimiento del potencial oncogénico de los VPH ha provocado un creciente interés a cerca del papel que juega este tipo de virus en la etiología del CaCu, además, el hecho de que el DNA del VPH se encuentra insertado en el genoma de algunos carcinomas hace pensar que éstos juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del estado maligno de las células infectadas.

Recientemente los VPH 16, 18 y 33 han sido catalogados como agentes causales de algunos tumores genitales, y sus ácidos nucleicos se han detectado en un 90% de los casos (19, 20). Por otra parte, un gran número de estudios clínicos, patológicos y moleculares indican que el CaCu puede ser una enfermedad transmitida sexualmente y que el VPH podría ser el agente transmisor (21-23).

La etiología viral del CaCu podría considerarse como un elemento favorable para aplicar terapias inmunológicas para su control, ya que éstas ofrecen mayores expectativas cuando existen antígenos fuertes, como los virales, en cuyo caso el sistema inmune juega un papel esencial para su control y en algunos casos regresión.

III. SISTEMA INMUNE.

Existen principalmente dos mecanismos inmunológicos para defender al organismo del ataque de microbios, células transformadas y otros agentes extraños, uno es el innato y el otro es el adaptativo. El sistema innato se encuentra formado por células fagocitarias: monocitos, macrófagos, neutrófilos polifomonucleares, junto con las células asesinas naturales (NK del Inglés: Natural Killer), todos estos tipos celulares destruyen antígenos y células tumorales de manera inespecífica, atacando mediante la lisis (citólisis), o inhibición del crecimiento (citotaxis) (24) (Figura 1).

El otro mecanismo de defensa es el adaptativo, caracterizado por la especificidad celular y la generación de memoria para contrarrestar el efecto de algún antígeno en un segundo ataque en un tiempo menor comparado con el primer ataque. Este mecanismo también es conocido como sistema inmune adquirido o específico (Figura 2) (25).

La respuesta inmune específica se puede clasificar en dos tipos de respuesta, de acuerdo al tipo celular que la median. La inmunidad humoral defiende en primera instancia contra organismos extracelulares como infecciones bacteriales. Actuando por medio de proteínas secretadas por las células plasmáticas conocida como inmunoglobulinas (Ig), las cuales que se encuentran en el plasma sanguíneo y son capaces de identificar y unirse a los marcadores moleculares específicos de las células blanco para que éstas sean reconocidas y eliminadas (25, 26)

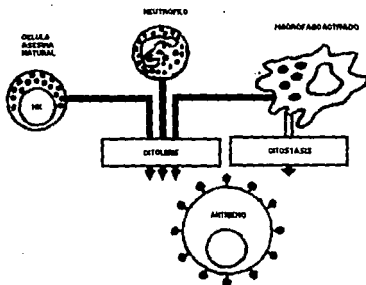


FIGURA 1. Células participantes de la inmunidad natural o innata y sus mecanismos de acción. La inmunidad natural es mediada por los macrófagos activados, neutrófilos y células NK. Su acción puede ser citolítica, causando la lisis del antígeno o cistostática, inhibiendo su crecimiento. Esta inmunidad no requiere anticuerpos y no actúa sobre antígenos específicos. Tomado de ref. (37).

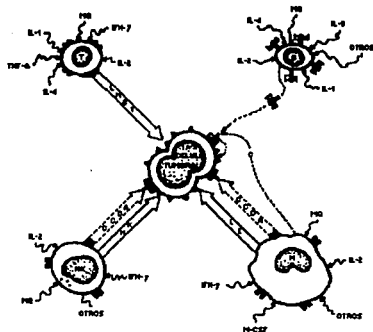


FIGURA 2. Representación de los mecanismos de acción que los linfocitos T y B, las células NK y los fagocitos mononucleares desarrollan para eliminar a una célula tumoral.

IL-1	Interleucina-1	Receptor para Fc
IL-2	Interleucina-2	Receptor antígeno específico
IL-4	Interleucina-4	Immunoglobulina
IL-5	Interleucina-5	Antígenos asociados al tumor
IFN-γ	Interferón- γ	LE
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α	T
M-CSF	Factor estimulador de colonias de Macrófagos	B
MQ	Moduladores químicos de la función inmune	C
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	NK
LMCT	Lisis mediada por células T	M
LN	Lisis natural	

El segundo tipo respuesta inmune específica es la inmunidad celular, que defiende al organismo del ataque de hongos, parásitos, infecciones virales y células transformadas. En esta fase los linfocitos T, son los encargados de llevar a cabo el reconocimiento y eliminación de las células blanco, mediante la secreción de citocinas como IFN- γ , TNF- α y otras moléculas de gran potencial lítico (25).

III a. LINFOCITOS T.

Los linfocitos T se originan en la médula ósea a partir de una célula madre pluripotente que se diferencia y adquiere el compromiso con el linaje linfoide tipo T. Las células precursoras de los linfocitos T migran hacia el timo en estadios tempranos del desarrollo embrionario donde terminan su diferenciación para posteriormente ser liberados al torrente sanguíneo (27, 28).

Las células T difieren de los linfocitos B en su mecanismo de reconocimiento del antígeno. El receptor de la célula B, se encuentra en la membrana en forma de Ig, que se une a epítopos antigénicos individuales de moléculas solubles o superficies particuladas. En contraste, la célula T reconoce por medio de receptores específicos antígenos sobre la superficie de otras células

Existen dos formas del receptor de la célula T (RCT), el heterodímero $\alpha\beta$ y el heterodímero $\gamma\delta$. Los linfocitos con reconocimiento antígeno-específico restringido al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) expresan el RTC $\alpha\beta$ (29-32). El RCT está asociado a un complejo molecular conocido como CD3, que impide que el linfocito T reconozca como extrañas moléculas propias. El reconocimiento de péptidos extraños en el contexto del CMH es conocido como restricción al CMH (33, 34).

Los linfocitos T están formados principalmente por dos subpoblaciones, los CD4, conocidos como linfocitos cooperadores (Th del Inglés, helper), y los CD8, conocidos como citotóxicos (Tc). Los linfocitos CD4 reconocen antígenos asociados al CMH clase II, mientras que los linfocitos CD8 los reconocen en el contexto del CMH clase I. Ambas poblaciones tienen funciones efectoras y contribuyen a regular la respuesta inmune celular (35).

Los linfocitos T citotóxicos (LTC) son linfocitos T que se caracterizan por lisar células que presentan antígenos específicos. Estos linfocitos son las células efectoras más importantes en el ataque a células infectadas por virus, rechazo a trasplantes y la regresión tumoral. La mayoría de los LTC expresan la molécula CD8, y algunos presentan la molécula CD4.

Una vez activados los linfocitos T liberan factores solubles, llamados citocinas o moduladores biológicos (MB), que influyen en el crecimiento y diferenciación de otros tipos celulares. Cada subclase de linfocitos T, tanto en ratón como humano, a su vez puede ser dividida en dos subclases más de acuerdo a su secreción de MB. Así, los linfocitos CD4 designados como Th1 se caracterizan por producir altas cantidades de IL-2, IFN- γ y TNF- α , por su parte las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (36-38). Debemos mencionar que recientemente, esta clasificación ha sido extendida a los linfocitos CD8 con un patrón de secreción de citocinas semejante a las células CD4 (39). Estas diferencias en la secreción de citocinas se propone como una regulación de la respuesta inmune (Figura 3).

Ambas subpoblaciones de linfocitos T pueden adquirir memoria, la cual funciona como un sistema de vigilancia contra antígenos a los que el organismo ha sido previamente expuesto. Los linfocitos T de memoria presentan cambios fenotípicos que permiten diferenciarlos de los linfocitos T normales entre los que destacan la presencia de la molécula CD45RO que en células que no han sido estimuladas con antígenos se presenta como CD45RA. Otra característica de las células de memoria es que son capaces de mantenerse viables por tiempo indefinido en presencia del antígeno (40-42).

III b. MODULADORES BIOLÓGICOS.

Los moduladores biológicos o citocinas son glicoproteínas, que se caracterizan por tener la habilidad de modificar el metabolismo de otras células (acción parácrina) o el propio (acción autócrina). Entre ellas se encuentran la IL-2, IFN- γ y el TNF- α que son importantes mediadores y reguladores de la respuesta inmune.

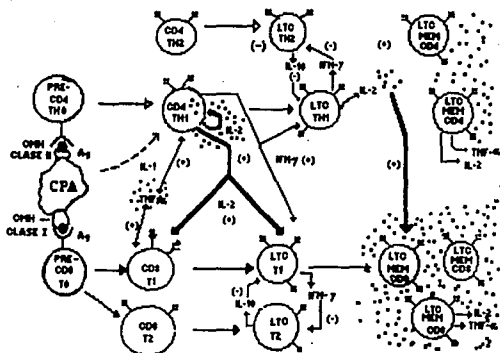


FIGURA 3. Principales moduladores biológicos secretados durante la respuesta inmune específica. La respuesta inmune específica se encuentra regulada por la secreción de citocinas por parte de las diferentes subclases de linfocitos T.

INTERLEUCINA-2

La interleucina-2 (IL-2) originalmente definida como factor de crecimiento de células T es producida después de la estimulación por antígenos o mitógenos de células linfoides. Esta molécula ha permitido la proliferación *in vitro* de células T a largo plazo (43). La IL-2 humana es una glicoproteína de 133 aminoácidos, con un peso molecular de 15.4 kD (44).

La síntesis de RNAm para IL-2, y su subsecuente secreción, es inducida por mitógenos como la concanavalina A y la fitohemaglutinina. La estimulación con antígeno requiere de la presencia de moléculas clase II del CMH. La activación así inducida puede ser medida de 4-6 h después de la estimulación; alcanzando su máxima liberación cerca de 20 horas después del estímulo antigénico o mitogénico (45).

La IL-2 ejerce efectos importantes en linfocitos T periféricos o medulares los cuales pueden ser inducidos a expresar el receptor para IL-2, que induce la proliferación de células CD4 y CD8 en respuesta al estímulo de IL-2 (46-48).

La importancia biológica de la IL-2 radica en su actividad como mitógeno y activador de linfocitos T. Las células CD4 son estimuladas a producir IL-2 por la presencia de un antígeno, asimismo responden a IL-1 que en presencia de las moléculas clase II del CMH inducen la producción de IL-2, la expresión de receptores para IL-2 y por tanto la proliferación de los linfocitos T (49).

Además de su actividad mitogénica, la IL-2 es capaz de inducir, en cultivos *in vitro* de linfocitos, la secreción de otras citocinas, como IFN- γ , factor de crecimiento de células B, la propia IL-2 y posiblemente otras citocinas (50-52). La IL-2 aumenta directamente la citotoxicidad de monocitos humanos y estimula la activación de células citotóxicas no específicas denominadas NK, las cuales ejercen su acción lítica por medio de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, que se lleva a cabo cuando algunos receptores membranales denominados Fc, enlazan la porción terminal de las moléculas de inmunoglobulinas, las cuales se encuentran unidas a los antígenos (53).

Dada su propiedad de activar linfocitos T *in vitro*, ha dado pauta para su aplicación *in vivo* en protocolos de inmunoterapia adoptiva para pacientes con cáncer, también aumenta los niveles de IL-2 en inmunodeficiencias humanas, igualmente participa en la creación de proteínas quiméricas para la destrucción de células blanco que presentan receptores para IL-2.

INTERFERON- γ

El interferón (IFN) fue descubierto como un agente antiviral, posteriormente se le atribuyeron propiedades antitumorales (54). Los interferones son una familia de proteínas con una amplia gama de actividades sobre diversos tipos celulares y se clasifican en dos tipos, los IFNs tipo I (IFN- α y el IFN- β) y el IFN tipo II (IFN- γ) (55).

El IFN- γ humano o también llamado interferón inmune es una glicoproteína homodimérica que pesa de 21 a 24 kD. La variación en el peso depende del grado de glicosilación de la molécula, pero cada subunidad contiene un polipéptido de 18 kD. El IFN- γ es producido por linfocitos T y su transcripción es iniciada como consecuencia de la activación por algún antígeno o mitógeno (25, 56).

El IFN- γ tiene diversas propiedades de inmunoregulación que lo separan funcionalmente de los otros interferones, ya que es capaz de amplificar la fase cognoscitiva de la respuesta inmune promoviendo la activación de células T restringidas al CMH clase II. Además es uno de los factores que promueve la diferenciación de los LTC y también estimula a los linfocitos B a secretar anticuerpos. El IFN- γ no es un factor de crecimiento para linfocitos y a menudo inhibe la proliferación de las poblaciones B. Actúa sobre las células presentadoras de antígenos para incrementar la expresión de moléculas del CMH clase II, aumentando la eficacia de la presentación del antígeno a las células CD4 (57, 58).

El IFN- γ es especie-específico y dadas sus capacidades antivirales e inductoras del sistema inmune, ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Ha mostrado ser efectivo en el tratamiento de leucemia de células "peludas", cáncer colorectal y de riñón, en los que han dado regresiones parciales o totales de las masas tumorales, también se ha utilizado

en combinación con agentes quimioterapéuticos, radiaciones y otras citocinas (59, 60).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) es un polipéptido no glicosilado de 154 aminoácidos con un peso de 17 kD (61). El TNF- α es una citocina pleiotrópica que puede producir necrosis en una amplia variedad de tumores cultivados *in vitro*, inhibe la hematopoyesis y actúa como un factor diferenciador de cierto tipo de leucemias. Además el TNF- α puede mediar reacciones inflamatorias agudas y regular la respuesta inmune celular (62-64).

El TNF- α es producido por los linfocitos T y macrófagos activados. La producción de TNF- α depende de la subclase de linfocitos T de que se trate, los linfocitos CD4 Th2 producen menor cantidad de TNF- α que los linfocitos CD4 Th1, lo mismo ocurre con las poblaciones CD8 (65, 66). Las células de memoria CD4 y CD8 producen TNF- α siendo mayor ésta en la población CD8 (67).

El TNF- α incrementa la expresión de antígenos del CMH clase I sobre las células T y aumentando también la proliferación de células activadas por la expresión de bajas cantidades del receptor para IL-2, asimismo, induce la producción de IFN- γ en células T cuando la IL-2 está presente. Además puede incrementar la expresión de la cadena de 55 kD del receptor de IL-2 en linfocitos T y en presencia de la IL-2 se da un aumento en la proliferación de células CD8 y su citotoxicidad por un incremento en la síntesis de esterasas de serina (68-71).

El conjunto de conocimientos de las actividades que llevan a cabo los MB han sido de gran importancia para el entendimiento de los mecanismos que se activan durante la respuesta inmune.

IV. RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune se inicia con el reconocimiento de algún agente extraño en el organismo (antígeno), lo que permite la activación de la respuesta innata o adaptativa, en esta última los linfocitos T que se activan ante antígenos

específicos para culminar con la eliminación de éste. La respuesta inmune específica puede dividirse en fase cognoscitiva o de reconocimiento, fase de activación y fase efectora.

La fase cognoscitiva o de reconocimiento de la respuesta inmune consiste en la unión de antígenos extraños al receptor del linfocito T maduro responsable de la inmunidad mediada por células, estos linfocitos expresan receptores que reconocen solo pequeñas secuencias de péptidos. Además, tienen la propiedad de reconocer y responder solo a un péptido antigénico que se encuentre presente en la superficie de otra célula (72).

El reconocimiento del antígeno se da a través de la formación del conjugado con el RCT, CD8 o CD4, CD2, LFA-1 y sus contrapartes en la célula blanco LFA-3, ICAM-1 o ICAM-2 respectivamente, involucrando moléculas del CMH clase I y clase II (Figura 4) (73).

La fase de activación, es la secuencia de eventos inducidos en los linfocitos T como consecuencia del reconocimiento de un antígeno específico. En general, las células T no pueden responder a una célula extraña en ausencia de células accesorias o células presentadoras de antígenos (CPA), requiriéndose dos señales para que se lleve a cabo la activación de los linfocitos T (72).

La primera señal, se da cuando una CPA entra en contacto con un antígeno, lo procesa y lo lleva a la membrana celular para presentarlo a los linfocitos T asociados con el CMH clase I o II (72-74). Los antígenos exógenos, son endocitados por una CPA formando vesículas dentro de las cuales ocurre una proteólisis parcial del antígeno por medio de cambios de pH, con lo cual se generan péptidos que son posteriormente asociados a las moléculas del CMH clase II para después ser llevados a la superficie de la CPA (75-77).

Los antígenos endógenos, como los productos de células infectadas por virus, son sintetizados intracelularmente y asociados con las moléculas del CMH clase I en el retículo endoplásmico, para después ser transportados a través del aparato de Golgi dentro de vesículas de exocitosis a la superficie de la célula (77-79).

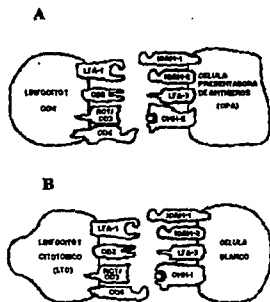


FIGURA 4. Representación esquemática de las uniones que se establecen entre ligandos y receptores durante la interacción de un linfocito T con una célula presentadora de antígeno (CPA) o una célula blanco. *A.* Interacción de un linfocito CD4 con una CPA. *B.* Interacción de un linfocito CD8 con una célula blanco.

Como resultado de la primera señal, los pre-LTC expresan en su superficie receptores para IL-2, que pueden ayudar en la unión del antígeno al RCT, sin embargo, estas células no se pueden dividir a menos que se produzca una segunda señal, la cual es proporcionada por la presencia de algún factor mitogénico como la IL-2 que es necesaria pero no suficiente para desarrollar funcionalmente a los LTC (25, 80). Cuando se presentan las dos señales a un pre-LTC prolifera y madura a célula citotóxica bajo la influencia de las citocinas secretadas por las células CD4 como IFN- γ y TNF- α (80).

La fase efectora de la respuesta inmune es el estado en el cual los linfocitos T han reconocido antígenos particulares, para posteriormente llevar a cabo la eliminación del antígeno que requiere del contacto celular con el RCT. Durante el proceso de diferenciación de un pre-LTC a un LTC, éste último adquiere la maquinaria necesaria para llevar a cabo la lisis celular. Primero producen gránulos unidos a la membrana citoplásmica con perforina y otras enzimas encargadas de lisar a la célula tumoral. Segundo desarrollan la capacidad de secretar citocinas como IFN- γ , linfotóxina, TNF- α e IL-2, en cantidades pequeñas que suelen no ser suficientes para provocar la diferenciación de otros pre-LTC (25,80,81).

Existen diversos mecanismos por los cuales los LTC median la lisis celular. En años pasados la exocitosis de gránulos líticos fue el mecanismo de lisis más aceptado, en este modelo los LTC se unen a la célula blanco y secretan el contenido de los gránulos líticos, que contienen proteínas formadoras de poros denominadas perforinas, citolisinas, granzimas y enzimas que incluyen esterasas de serina; como consecuencia la célula muere por el daño causado en su membrana celular provocando un choque osmótico.

Otro de los mecanismos de lisis mediada por los LTC es la apoptosis de la célula blanco, existen datos bioquímicos y morfológicos de observaciones *in vivo* e *in vitro* donde los blancos sufren la muerte celular programada después de haber estado en contacto con LTC, esta similitud encontrada entre la apoptosis y la muerte mediada por los LTC sugiere que éstos activan un programa endógeno de suicidio en la célula blanco, sin embargo, también es claro que la muerte mediada por LTC es diferente a la apoptosis clásica. Primero, la fragmentación del DNA mediada por LTC ocurre en presencia de inhibidores de proteínas, las cuales son

eliminadas en la muerte celular programada en las mismas células. Segundo, la lisis ocurre en cinéticas más rápidas seguido de la fragmentación del DNA comparada con algún otro sistema.

Finalmente, la muerte mediada por LTC a menudo presenta una morfología mixta de necrosis y apoptosis, éstas observaciones sugieren que los LTC utilizan múltiples mecanismos para asegurar una muerte rápida de sus blancos (82-86).

En general, el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar agentes extraños como son virus, bacterias y hongos que puedan dañar al organismo. Existen evidencias que indican que las células tumorales no solo se comportan como agentes extraños, sino que además presentan marcadores químicos de su transformación y antígenos tumorales, los cuales permiten que estas células sean reconocidas por el sistema inmune, con su consecuente destrucción.

V. INMUNOLOGIA TUMORAL.

En la actualidad, aún se debate acerca de los mecanismos celulares que conducen a una transformación maligna, En la cual se producen algunos cambios en la membrana celular, lo que confiere a las células transformadas características de inmunogenicidad que las células normales no poseen, ésto permite que el sistema inmune las detecte y destruya. Sin embargo, no todos los tumores presentan el mismo grado de inmunogenicidad, que depende del tipo de neoantígenos que exprese (87-92).

Por ejemplo, los tumores que surgen de manera espontánea en ratones tienden a ser menos inmunogénicos que aquellos que son inducidos por virus o por agentes carcinógenos (93-96). Esto ha conducido a la consideración de que algunos cánceres humanos, que se encuentran asociados con una etiología viral, como el caso del CaCu, pueden ser fuertemente inmunogénicos, razón por la cual requieren de muchos años para desarrollarse e invadir otros órganos (97).

Estas características de inmunogenicidad que algunos tumores presentan hace posible su reconocimiento en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), por parte de los linfocitos T citotóxicos, en particular si existe la expresión de antígenos virales en la superficie de la célula blanco (82,98). Por esta razón, resulta necesario conocer los mecanismos que poseen este

tipo de células inmunocompetentes para controlar el crecimiento de las células transformadas, basados en esto poder utilizarlas en el tratamiento de cánceres inmunogénicos, por medio de técnicas inmunoterapéuticas diseñadas para regular las funciones del sistema inmune, dirigiéndolo hacia la destrucción de las células transformadas como es el caso de la Inmunoterapia Adoptiva.

VI. INMUNOTERAPIA ADOPTIVA.

Desde una perspectiva funcional, existen tres tipos de bioterapias que han sido desarrolladas para remediar a enfermedades de origen neoplásico (Figura 5). La primera involucra la manipulación *ex vivo* del plasma de pacientes con cáncer en un esfuerzo por remover factores que pudieran bloquear el sistema inmune, asimismo se adicionan sustancias quimioterapéuticas que ayuden a disminuir las masas tumorales antes de la reinfusión del plasma al paciente (99,100).

La segunda bioterapia, frecuentemente utilizada se caracteriza por la administración de MB, en pacientes oncológicos, los cuales activan directa o indirectamente el sistema inmune. Algunos de los MB empleados son los interferones, interleucinas, factores estimuladores de colonias (FEC), anticuerpos monoclonales y algunos factores inmunopotenciadores como los muralmilpéptidos y *Corynebacterium parvum* (101,102).

El tercer tipo de bioterapia es la Inmunoterapia Adoptiva Celular (IAC) que se encuentra enfocada a la activación *ex vivo* de leucocitos de pacientes con cáncer por medio de MB, en un intento por aumentar su número así como su capacidad antitumoral.

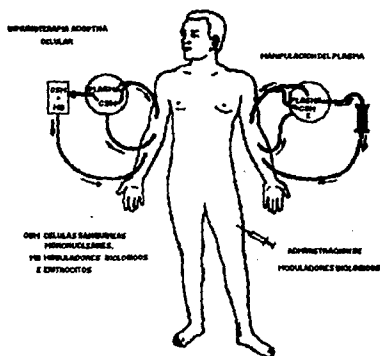


FIGURA 5. Tipos de bioterapias contra el cáncer. La Inmunoterapia Adoptiva Celular involucra la manipulación *ex vivo* de las células sanguíneas mononucleares (CSM) con el fin de incrementar su capacidad tumoricida. La manipulación *ex vivo* del plasma de los pacientes se realiza, ya sea para remover factores inhibidores de la respuesta inmune o para adicionar factores tumoricidas. La administración *in vivo* de moduladores biológicos puede llevarse a cabo por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea.

La aplicación tradicional de la IAC, incluye la administración de células efectoras con actividad antitumoral como son las células NK (Natural Killer) y LAK estas últimas son generadas mediante la activación con altas dosis de IL-2. Las células NK y LAK tienen un gran poder lítico, sin embargo, no son específicas a algún antígeno en especial, ya que no se encuentran restringidas al CMH y son capaces de actuar sobre células transformadas así como normales. Estas células son obtenidas en cultivos de leucocitos de sangre periférica (LSP) a cuatro días en presencia de altas concentraciones de IL-2 (103,104).

De manera global la aplicación de la IAC en pacientes oncológicos terminales ha mostrado cierta eficacia, pero no la que se hubiera deseado, además de presentar el inconveniente de requerir altas dosis de MB para mantener el efecto citotóxico de las células inmunocompetentes. De esta forma, se han desarrollado diferentes metodologías para eliminar la administración exógena de MB, en particular, en trabajos preliminares realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que usando la combinación de IL-2, IFN- γ y TNF- α se tiene a 21 días un efecto sinérgico sobre la proliferación de LSP de CaCu, así como en la actividad citotóxica de éstos hacia células tumorales autólogas, empleando para obtener este efecto dosis de MB menores a las utilizadas por otros autores. Sin embargo, no se había determinado si el efecto proliferativo y citotóxico observado era el resultado de un solo factor o si realmente se presenta un sinergismo entre estos MB, en estos trabajos tampoco se determino si la actividad lítica requiere necesariamente de 21 días para generarse.

Por esta razón se decidió aclarar estos dos puntos relevantes en el conocimiento de los mecanismos de rechazo tumoral lo cual permitiría contar con una estrategia terapéutica en la cual se utilizara la IAC en pacientes oncológicos, en particular, en estadios avanzados sobre todo en cánceres inmunogénicos entre los que se podría incluir al CaCu por su fuerte asociación con una etiología viral. Por lo antes expuesto el presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar el efecto individual de IL-2, IFN- γ , TNF- α y sus combinaciones sobre la proliferación y citotoxicidad de LSP de pacientes con CaCu y si es posible reducir el tiempo de 21 días para la generación de LTC.

HIPOTESIS

El sistema inmune es capaz de eliminar células con neoantígenos o antígenos virales, tales como las proteínas E6 y E7 del VPH 16 y 18, cuyo genoma se encuentra integrado en el 90% de las células con CaCu, de gran incidencia en México. Por otro lado, se sabe que la IL-2 es un potente mitógeno que actúa principalmente sobre linfocitos T, que permite una expansión clonal de ellos. Asimismo, es conocido que el TNF- α incrementa la expresión de la cadena de 55 kD del receptor para IL-2 y que la presencia de estas dos citocinas juntas en los cultivos de LTC puede incrementar su potencial proliferativo y citotóxico. Por otra parte, es conocido que IFN- γ promueve la diferenciación de pre-LTC a LTC. Recientemente, se ha demostrado que existe un efecto sinérgico de IFN- γ y TNF- α sobre la IL-2 en la inducción a la proliferación *in vitro* de LSP de pacientes con CaCu, obteniendo hasta 50 veces la población inicial. Los LSP generados de esta forma presentan una gran actividad lítica específica contra las células tumorales autólogas. Sin embargo, no se sabe que modulador biológico es el causante del efecto citotóxico observado *in vitro*.

En consecuencia, si se realiza el co-cultivo autólogo de LSP con células tumorales en presencia de IL-2, IFN- γ , TNF- α y sus combinaciones, se esperaría que el TNF- α sea el factor inductor del efecto citotóxico, dada la potencialidad de TNF- α para generar LTC.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar por medio de co-cultivo de leucocitos de sangre periférica (LSP) con células tumorales autólogas (CTA) en presencia de interleucina-2 (IL-2), interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y sus combinaciones cual modulador biológico que induce el efecto citotóxico *in vitro* de LSP de pacientes con cáncer cérvico-uterino (CaCu) y a partir de que tiempo de co-cultivo se genera este efecto.

Objetivos Particulares.

Generar linfocitos T citotóxicos en presencia de IL-2, IFN- γ , TNF- α y sus combinaciones por medio de co-cultivos autólogos.

Determinar la capacidad proliferativa de los LSP generados a los 7,14 y 21 días de co-cultivo por medio de MTT.

Medir la eficiencia citotóxica de LSP de pacientes con CaCu a los 14 y 21 días de co-cultivo autólogo con células tumorales.

Determinar el fenotipo de las poblaciones efectoras por medio de anticuerpos monoclonales.

Obtener LSP de 21 días de co-cultivo de todas combinaciones utilizadas y mantenerlos en ausencia de moduladores biológicos para medir su viabilidad y capacidad lítica.

METODO

El material biológico que se utilizó en el presente trabajo consistió de biopsias de tumores de CaCu en estadios clínicos I B, II B y IV A, además de muestras de sangre periférica de las mismas pacientes, las cuales fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaría de Salud.

Los reactivos empleados fueron de grado reactivo, a menos que se indique lo contrario. El material de cristalería fue esterilizado en autoclave a 21 libras de presión durante 20 minutos, y posteriormente fue secado en estufa por 30 minutos a 100°C.

Todas las soluciones utilizadas en el cultivo de tejidos fueron previamente esterilizadas por medio de filtros de poro de 0.22 micras (Millipore, Type GS, U.S.A.).

Los medios nutritivos y soluciones fueron calentadas a 37°C en Baño de María antes de ser empleados en las técnicas de cultivo de tejidos

OBTENCION DE MUESTRAS SANGUINEAS

Las muestras sanguíneas fueron tomadas en condiciones de esterilidad con jeringas de 20 ml (Becton Dickinson Co. U.S.A.) conteniendo 0.1 ml de heparina 1000 U.I./ml (Rickercab/NCB, U.S.A.) como anticoagulante.

SEPARACION DEL PLASMA

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 500 g durante 15 minutos. El plasma fue separado del paquete celular por medio de pipeteo suave y colocado en un tubo de vidrio, se le adicionaron 0.1 ml de clorhidrato de protamina 1000 U/ml (F. Hoffman-La Roche & Cie., S.A. Basilea/Suiza), antagonista de la heparina, que permite la coagulación y la separación del suero libre, el cual se obtuvo rompiendo el coágulo formado y transfiriendo el líquido restante a un tubo de vidrio.

INACTIVACION DEL COMPLEMENTO SERICO

Los sueros obtenidos fueron inactivados en un Baño de María a 57°C durante 30 minutos, con el fin de eliminar las proteínas del complemento, que podrían interferir en los experimentos.

SEPARACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP)

Al paquete celular, una vez separado del plasma, se le practicó dos lavados adicionando 10 ml de Medio de Eagle (ME) (Apéndice 1), centrifugando a 500 g por 15 minutos, el sobrenadante fue desechado. Se adicionó un volumen de ME equivalente a la cantidad de sangre contenida en el tubo y se resuspendió suavemente.

Esta mezcla se vertió en tubos de vidrio que contenían 2 ml de Linfo-Grad (Microlab, México). En cada uno de ellos se adicionaron 5 ml de la mezcla de sangre, haciéndola resbalar lentamente por las paredes del tubo. Se centrifugó a 500 g por 30 minutos. La interfase de color blanco, formada por células mononucleadas, fue separada cuidadosamente con una pipeta y trasladada a tubos para centrifuga a los cuales se había adicionado 2 ml de EM procurando mojar las paredes con dicho medio para evitar que las células se adhirieran a ellas. Se centrifugaron a 500 g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Apéndice 2).

Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer (American Optical, U.S.A.), algunas de ellas fueron utilizadas inmediatamente y el resto se conservaron en congelación, por medio de la técnica de criopreservación, para ser empleadas posteriormente.

TECNICA DE CRIOPRESERVACION

Para preservar las células que no fueron usadas en un ensayo inmediato se aplicó la técnica de criopreservación que consiste en lo siguiente:

Las células fueron a 500 g por 5 minutos y resuspendidas en una solución para congelación compuesta, para el caso de LSP, por 90% de suero fetal de bovino (SFB) (Microlab, México) y 10% de dimetil sulfoxido (Sigma Chemical Co. U.S.A.) y para células tumorales de 80% de ME, 10% de SFB y 10% de dimetil sulfoxido. Inmediatamente después las células se transfirieron a pequeñas ampollitas (Cooke Laboratory Products, U.S.A.) de 1 ml y se congelaron a -70°C durante 24-72 horas para ser posteriormente introducidas en Nitrógeno líquido a una temperatura aproximada de -190°C.

Para descongelar las células se sacó la ampollita del nitrógeno líquido y se colocó en un Baño de María a 37°C hasta que la muestra quedó completamente líquida. A continuación se centrifugó a 500 g por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en RPMI para su utilización en los ensayos pertinentes.

OBTENCION DE CELULAS TUMORALES

Las biopsias de tejido tumoral fueron primeramente lavadas con ME para eliminar coágulos sanguíneos y tejido necrótico. Posteriormente se cortó en trozos de aproximadamente 0.5 mm. de diámetro y se colocó dentro de un matraz, se adicionaron 5 ml de ME y se sometió a agitación constante a una temperatura de 37°C por 15 minutos con la finalidad de eliminar eritrocitos, tejido necrótico superficial y de preparar la muestra para su disgregación enzimática. El sobrenadante obtenido con esta primera agitación fue desechado y se adicionaron 2 ml de colagenasa tipo IV (Sigma Chemical Co. U.S.A.) al 0.05%,

Tripsina tipo II (Sigma Chemical Co. U.S.A.) al 0.05% (Apéndice 3), durante 20 minutos a 37°C.

El sobrenadante, que contiene las células resultantes de la disgregación, se colectó y centrifugó a 500 g por 5 minutos, el botón celular se lavó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Apéndice 4) dos ocasiones y las células se contaron, midiendo su viabilidad por exclusión de azul tripano (Sigma Chemical Co. U.S.A.) al 4% en PBS.

Una parte de las células tumorales fue criopreservada para ser empleadas en los ensayos de citotoxicidad y otra fue sometida a la técnica de adherencia en microplacas de cultivo para las pruebas de proliferación de LSP.

ADHERENCIA DE CELULAS MALIGNAS A PLACAS DE CULTIVO

Para la evaluación de la capacidad proliferativa de los LSP en presencia de las células tumorales y de los factores inductores IL-2 (Cetus Co. U.S.A.), IFN- γ (Genzyme, U.S.A.) y TNF- α (Sigma Chemical Co. U.S.A.), se procedió a la adherencia de células tumorales sobre la superficie de micropozos de cultivo para posteriormente realizar el co-cultivo con LSP. En una placa de microtitulación se depositó glutaraldehído al 0.1% en una solución salina de boratos (Apéndice 5) 0.1 ml/pozo y se incubaron a 4°C durante toda una noche.

Una vez transcurrido este tiempo se lavaron dos veces con PBS. Las células fueron resuspendidas en PBS para ser adicionadas a los pozos en un volumen de 50-100 μ l/pozo y se centrifugaron a 500 g por 15 minutos. Posteriormente se añadieron 100 μ l/pozo de glutaraldehído al 0.1% en PBS, teniendo el cuidado necesario para no desprender la capa adherida, se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos y finalmente se lavó con PBS-Tween (Apéndice 6) dos veces.

CO-CULTIVOS CELULARES

Se realizaron co-cultivos celulares, para medir la proliferación de los LSP, evaluar su citotoxicidad, sobre diversos tipos celulares y determinar su fenotipo.

Sobre las capas de células tumorales adheridas en los micropozos se colocaron LSP en una proporción de 10:1 (LSP:célula tumoral), el medio de cultivo consistió de RPMI suplementado con 10% de suero autólogo, 100 U/ml de IL-2, 10 U/ml de IFN- γ y 500 U/ml de TNF- α , solas y sus respectivas combinaciones. Se realizaron cambios del medio cada 7 días. La proporción de LSP y las concentraciones óptimas de los MB se determinaron previamente (105).

CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora (Forma Scientific, Division of Mallinckrodt, Inc. U.S.A.) a 37°C, en una atmósfera con 10% de bióxido de carbono y un ambiente saturado de humedad.

EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR

La evaluación de la proliferación celular se realizó utilizando la técnica colorimétrica de MTT. Los LSP fueron removidos mecánicamente de los micropozos de co-cultivo y transferidos por duplicado en placas de 96 micropozos fondo plano (Costar, U.S.A.), se adicionaron a cada pozo 20 μ l de MTT al 0.5% (Sigma Chem. U.S.A.) y se incubaron las placas a 37° C por 4 h. El MTT es un subtancia de color amarillo pálido que produce un producto de color azul oscuro (formazan) cuando es incubado con células vivas. Después de la incubación, el sobrenadante es retirado y se adicionan 100 μ l de alcohol isopropílico (Baker Analyzed, Mex) para disolver los cristales de formazan. Las placas fueron agitadas ligeramente para obtener una solución homogénea y después los pozos fueron leídos en un lector de ELISA (Dynatech) a una absorbancia de 570 nm.

El número celular fue obtenido extrapolando a partir de una curva patrón realizada con LSP de un donador normal.

CO-CULTIVOS PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD

LSP provenientes del co-cultivo con células tumorales de 14 y 21 días fueron lavados con RPMI-1640 y colocados en micropozos de cultivo en presencia de las células blanco, en una relación 10:1 establecida previamente (105), en RPMI con 10% de suero autólogo, e incubados durante 4 horas. Después de la incubación el porcentaje de citotoxicidad fue evaluado mediante la técnica colorimétrica de MTT, adicionando 20 μ l de una solución de MTT al 0.5% e incubando a 37 °C por 4 h. Cuando se completó la incubación con el MTT, se adicionaron 100 μ l de alcohol isopropílico para solubilizar el formazan.

La densidad óptica de cada pozo fue medida con un lector de ELISA, equipado con un filtro de 570 nm. El lector fue calibrado a cero usando un pozo donde solo se adicionó medio y MTT.

El porcentaje de citotoxicidad fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 1 - \frac{(\text{DO CB+LSP}) - (\text{DO LSP})}{(\text{DO CB})}$$

Donde:

- DO CB** = Densidad óptica de las células blanco.
DO LSP = Densidad óptica de los LSP sensibilizados.
DO CB+LSP = Densidad óptica del co-cultivo de células blanco con LSP sensibilizados.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Los LSP provenientes de los co-cultivos celulares frescos y de 7, 14 y 21 días fueron adheridos en portaobjetos cubiertos con poly-lisina (Sigma Chem. U.S.A.), mediante una citocentrífuga a 500 g. Después fueron fijadas con acetona (Baker Analyzed, Mex.) 10 min y se incubaron a 4 °C por 30 min con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano (anti-CD4, CD8, CD45RO) (Coulter clone, U.S.A.), enseguida se los portaobjetos fueron lavados con PBS y después de incubaron con el anticuerpo fluoresceinado de carnero dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón (GAM-FITC) (Coulter clone, U.S.A.). La proporción de células marcadas se analizó mediante el conteo de 5 campos (20 células/campo).

RESULTADOS

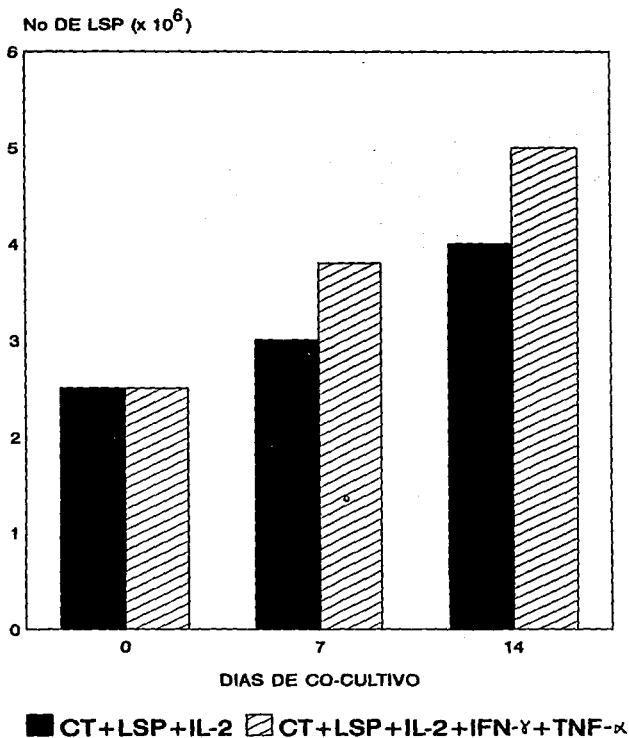
PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO-UTERINO (CaCu) EN PRESENCIA DE CELULAS TUMORALES AUTOLOGAS, INTERLEUCINA-2 (IL-2), INTERFERON- γ (IFN- γ) Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α (TNF- α).

En trabajos preliminares se demostró que la IL-2 ejerce un efecto proliferador *in vitro* sobre LSP de pacientes con CaCu, el cual se ve incrementado al emplear una combinación de IL-2, IFN- γ y TNF- α , llegando a obtener poblaciones 50 veces mayores al número inicial en cultivos de más de 4 semanas (51, 105). Sin embargo, no se ha determinado la capacidad proliferativa de los LSP con cada una de las citocinas y sus combinaciones.

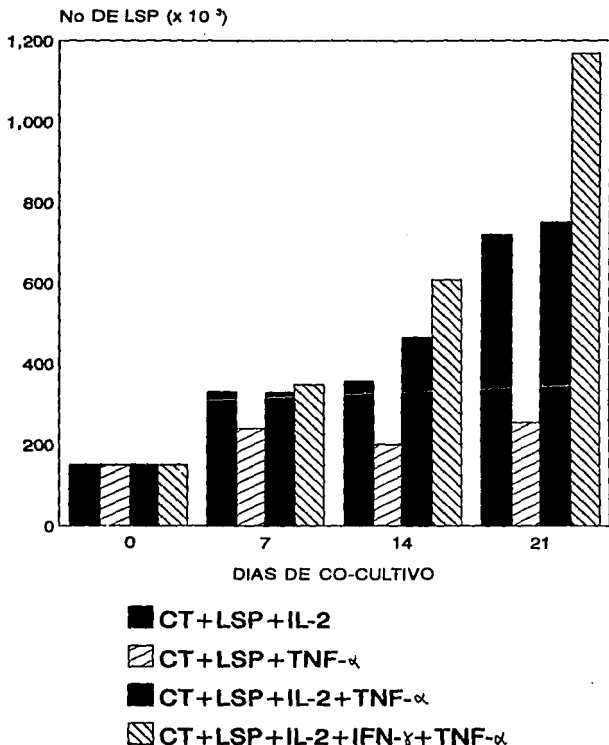
Por esta razón se co-cultivaron 2.5×10^6 LSP de la paciente I con células tumorales autólogas (CTA) en presencia de IL-2 e IL-2 + IFN- γ + TNF- α , evaluando el número celular a los 7 y 14 días de co-cultivo. Los resultados mostraron en ambos casos una proliferación gradual con respecto al tiempo, siendo mayor cuando se emplearon los tres MB (Gráfica I).

Por otro lado, se pensaba que el TNF- α pudiera estar incrementando la capacidad proliferativa de los LSP de pacientes con CaCu, dada su potencialidad de inducir la expresión del receptor de 55 kD para IL-2 (Tac), por lo cual, se cultivaron LSP de la paciente II en presencia CTA utilizando IL-2, TNF- α , IL-2 + TNF- α y la combinación de los tres MB, evaluando el número celular cada 7 días, hasta los 21 días de co-cultivo. Los LSP cultivados en presencia de IL-2, IL-2 + TNF- α y los tres MB juntos, mostraron un aumento constante del número celular, obteniéndose el mayor grado de proliferación, como ya se ha reportado, en presencia de la combinación de los tres MB, con un 1.08×10^3 . La presencia de TNF- α solo, no mostró inducción a la proliferación obteniéndose un número 254×10^3 LSP (Gráfica II).

GRAFICA I
PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE
PERIFERICA (LSP) DE LA PACIENTE CON CaCu (I),
EN CO-CULTIVO CON CELULAS DEL TUMOR
AUTOLOGO EN PRESENCIA DE IL-2, IFN- γ Y TNF- α



GRAFICA II
PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE
PERIFERICA (LSP) DE LA PACIENTE CON CaCu (II),
EN CO-CULTIVO CON CELULAS DEL TUMOR
AUTOLOGO EN PRESENCIA DE IL-2, IFN- γ Y TNF- α



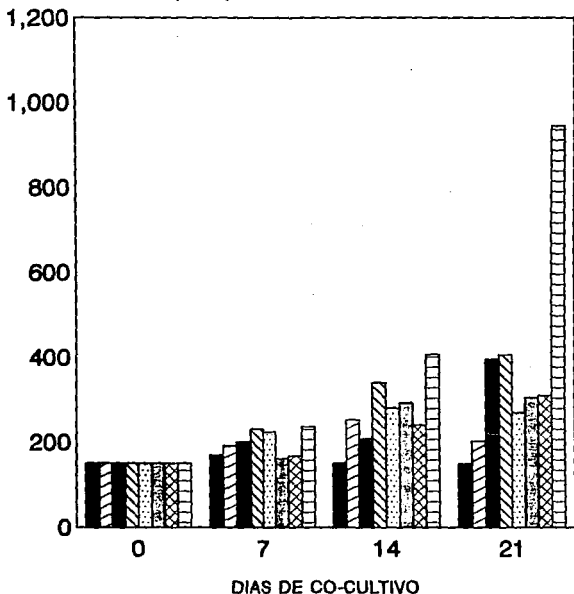
En el caso de la paciente III se amplió el número de combinaciones de MB, para confirmar el efecto de cada uno de ellos sobre la proliferación de LSP de pacientes con CaCu, de esta manera los LSP de la paciente III fueron co-cultivadas en presencia de las citocinas solas así como de sus combinaciones, incluyendo como control negativo LSP activados con células tumorales. En este ensayo el control negativo y el cultivo estimulado con la combinación de IFN- γ + TNF- α mostraron un aumento no significativo en la proliferación, observándose un mantenimiento de la población. Los cultivos que fueron inducidos a proliferar con IL-2 e IL-2 + TNF- α presentaron proliferación similar, obteniéndose 406×10^3 y 395×10^3 LSP a los 21 días respectivamente. Los LSP co-cultivados con IFN- γ , TNF- α , IL-2 + IFN- γ presentaron una baja proliferación. Nuevamente la mayor inducción a la proliferación fue obtenida cuando se emplearon de manera conjunta CTA + IL-2 + IFN- γ + TNF- α con 945×10^3 células efectoras (Gráfica III).

Las células linfoides de la paciente IV presentaron un comportamiento semejante al reportado para la paciente III, en donde la población inicial solo se mantiene en ausencia de MB, en presencia de IFN- γ e IFN- γ + TNF- α , también en este caso los LSP que fueron estimulados con IL-2 e IL-2 + TNF- α presentando un aumento constante del número celular durante el tiempo de cultivo, destacando el hecho de que la combinación de IL-2 + IFN- γ presentó una proliferación similar al cultivo con la IL-2 sola. Por otra parte, las células co-cultivadas en presencia de TNF- α siguen presentando una baja proliferación como la ya reportada, obteniéndose la mayor proliferación, como era de esperarse, al utilizar la combinación de los tres MB (Gráfica IV).

Estos resultados nos indican que la mejor combinación para generar un gran número de LSP es la combinación de los MB. Los LSP obtenidos con esta combinación de MB presentan un tiempo de doblaje de aproximadamente nueve días, mientras que los MB por si solos no pueden generar una respuesta proliferativa semejante a la observada en presencia de los tres MB juntos, lo cual confirma la existencia de un efecto sinérgico de IFN- γ y TNF- α sobre la proliferación inducida por IL-2.

GRAFICA III
PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE
PERIFERICA (LSP) DE LA PACIENTE CON CaCu (III), EN
CO-CULTIVO CON CELULAS DEL TUMOR AUTOLOGO
EN PRESENCIA DE IL-2, IFN- γ Y TNF- α

No DE LSP ($\times 10^3$)



■ CT+LSP

■ CT+LSP+IL-2+TNF- α

▨ CT+LSP+IFN- γ

▩ CT+LSP+IL-2+IFN- γ

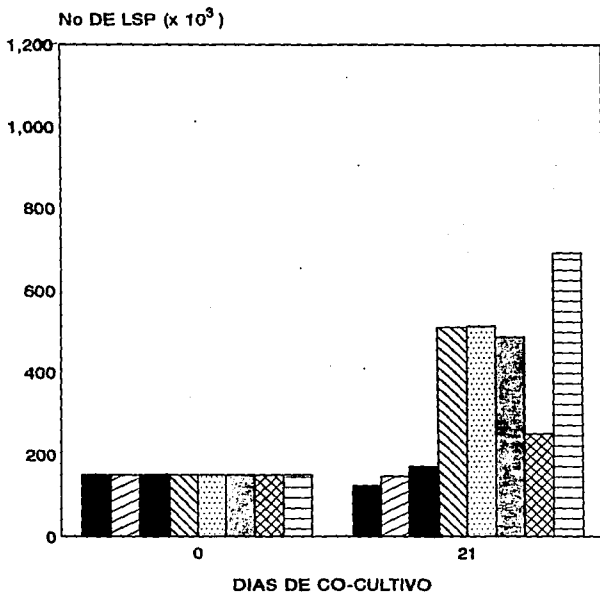
▨ CT+LSP+TNF- α +IFN- γ

▩ CT+LSP+IL-2

▩ CT+LSP+TNF- α

▩ CT+LSP+IL-2+IFN- γ +TNF- α

GRAFICA IV
PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE
PERIFERICA (LSP) DE LA PACIENTE CON CaCu (IV), EN
CO-CULTIVO CON CELULAS DEL TUMOR AUTOLOGO EN
PRESENCIA DE IL-2, IFN- γ Y TNF- α



- | | |
|--|--|
| ■ CT+LSP | ▨ CT+LSP+IFN- γ |
| ■ CT+LSP+IFN- γ + TNF- α | ▨ CT+LSP+IL-2 |
| ▨ CT+LSP+IL-2+TNF- α | ▨ CT+LSP+IL-2+IFN- γ |
| ▨ CT+LSP+TNF- α | ▨ CT+LSP+IL-2+IFN- γ +TNF- α |

**CITOTOXICIDAD ESPECIFICA DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA
PROVENIENTES DE PACIENTES CON CaCu, EN PRESENCIA DE IL-2 E
IL-2+IFN- γ +TNF- α**

En trabajos preliminares se había demostrado que los LSP previamente sensibilizados con IL-2+IFN- γ +TNF- α en cultivos de más de 4 semanas (a largo plazo), eran capaces de generar una respuesta citotóxica-específica hacia las células tumorales autólogas con una baja actividad lítica contra células normales autólogas o heterólogas tumorales (105, 106).

Por esta razón, en el presente estudio se realizaron co-cultivos autólogos, de LSP y células tumorales, de cuatro pacientes con CaCu, en presencia IL-2 y su combinación con IFN- γ y TNF- α . Evaluando la actividad lítica de los LSP obtenidos a los 14 y 21 días. Para ello los LSP sensibilizados en MLTC fueron retados con células de tumor autólogo, LSP autólogos y con células de la línea CaLo proveniente de otro CaCu.

La evaluación de la citotoxicidad de los LSP sensibilizados en co-cultivo de 14 y 21 días mostraron una alta especificidad hacia las células del tumor autólogo independientemente de los moduladores biológicos empleados. Sin embargo, el grado de citotoxicidad fue diferente dependiendo del MB usado, siendo mayor cuando se emplearon los tres MB, llegando casi al 100% de citotoxicidad. Mientras que la actividad lítica hacia los LSP autólogos y la línea CaLo fue baja a los 14 días, la cual se ve disminuida aún más a los 21 días (Tabla 1).

Estos resultados nos proporcionan evidencias de que es posible generar una respuesta citotóxica-específica de los LSP de pacientes con CaCu, desde la segunda semana de co-cultivo usando IL-2 sola o la combinación de IL-2+IFN- γ +TNF- α , siendo mayor en ésta última.

TABLA 1. CITOTOXICIDAD DE LSP DE PACIENTES CON CANCER CERVICO-UTERINO A 14 Y 21 DIAS DE CO-CULTIVO AUTOLOGO EN PRESENCIA DE IL-2, IFN- γ Y TNF- α

	14 DIAS		21 DIAS	
	CO-CULTIVO EN PRESENCIA DE			
	IL-2	3F	IL-2	3F
A. PACIENTE I				
TUMOR AUTOLOGO	87	98	85	97
LSP AUTOLOGOS	7	8	1	0
CaLo	14	10	4	1
B. PACIENTE II				
TUMOR AUTOLOGO	82	88	86	90
LSP AUTOLOGOS	0	14	3	9
CaLo	7	14	1	3
C. PACIENTE III				
TUMOR AUTOLOGO	64	78	65	89
LSP AUTOLOGOS	2	1	5	2
CaLo	36	30	15	13
D. PACIENTE IV				
TUMOR AUTOLOGO	82	90	84	95
LSP AUTOLOGOS	12	14	6	6
CaLo	25	2	5	2

IL-2 *INTERLEUCINA-2*

3F *TRES FACTORES (INTERLEUCINA-2, INTERFERON- γ Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL - α)*

CaLo *LINEA CELULAR DE CANCER CERVICO UTERINO*

EFFECTO CITOTOXICO DE LSP DE PACIENTES CON CaCu, PROVENIENTES DE CO-CULTIVO AUTOLOGO CON CELULAS TUMORALES, SOBRE CTA, CELULAS NORMALES AUTOLOGAS Y CELULAS TUMORALES HETEROLOGAS.

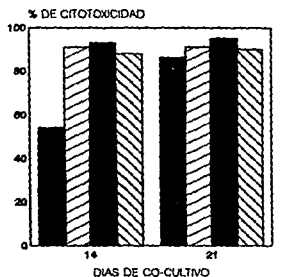
Se ha determinado que los LSP co-cultivados en presencia de CTA, IL-2 + IFN- γ + TNF- α , son capaces de generar una respuesta citotóxica-específica hacia el tumor autólogo a los 14 días de co-cultivo. Sin embargo, no se sabe cual modulador biológico es el que está induciendo el efecto lítico o si es necesaria la presencia de varios MB para obtener éste efecto.

Para evaluar cual de los MB o que combinación de éstos es necesaria para inducir el efecto citotóxico observado, se realizó un primer ensayo donde se co-cultivaron los LSP de la paciente II con CTA en presencia de IL-2, TNF- α , IL-2 + TNF- α y la combinación de las tres citocinas. Evaluando a los 14 y 21 días la actividad citotóxica de los LSP sensibilizados contra CTA, la línea CaLo y LSP autólogos. Encontrando que en todos los casos se obtuvo una alta citotoxicidad hacia las CTA de más del 90%, cabe hacer notar que a los 14 días, los LSP que habían sido sensibilizados con IL-2 presentan una citotoxicidad menor hacia las CTA que la observada en las demás combinaciones (Figura V A). Ahora bien, la citotoxicidad de las células efectoras sensibilizadas en presencia de IL-2, TNF- α y los tres MB hacia los LSP autólogos disminuyó de manera gradual con respecto al tiempo de co-cultivo, mientras que las células que se estimularon con IL-2 + TNF- α a los 14 y 21 días mantuvieron una citotoxicidad del 14% (Gráfica V B). La actividad lítica hacia la línea CaLo fue menor al 14% y disminuyó a los 21 días de co-cultivo, los LSP sensibilizados con TNF- α , son la excepción ya que mantienen el mismo porcentaje de citotoxicidad durante todo el tiempo de cultivo (Gráfica V C).

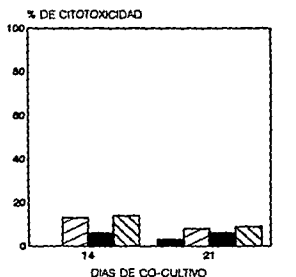
GRAFICA V

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE LA PACIENTE CON CANCER CERVICO UTERINO (II)

A TUMOR AUTOLOGO

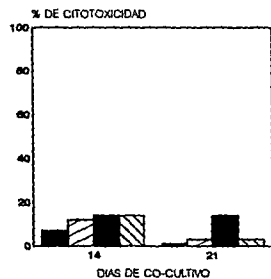


B LSP AUTOLOGO



IL-2
 TNF- α
 IL-2+TNF- α
 IL-2+IFN- γ +TNF- α

C CaLo



IL-2
 TNF- α
 IL-2+TNF- α
 IL-2+IFN- γ +TNF- α

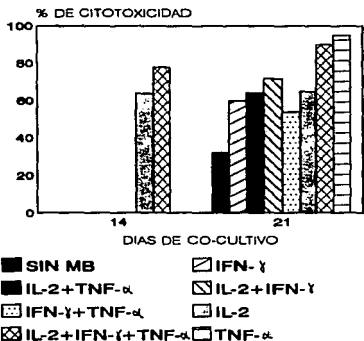
En el siguiente ensayo también quisimos evaluar el efecto de IFN- γ sobre la citotoxicidad, con este propósito se realizó un co-cultivo autólogo con LSP de la paciente III con células tumorales autólogas en ausencia y presencia de las citocinas así como de sus respectivas combinaciones. Al igual que en el experimento anterior se observa una alta citotoxicidad hacia la CTA con los MB solos o sus combinaciones, en este caso los LSP inducidos con IL-2 mostraron una actividad semejante a la combinación de los tres MB desde los 14 días de co-cultivo (Gráfica VI A). De manera similar que en el ensayo anterior la citotoxicidad de los LSP inducidos con TNF- α hacia los LSP autólogos fue menor del 13% (Gráfica VI B).

Se realizó otro ensayo semejante al anterior con las células de la paciente IV, en el cual se observó una vez más un alto porcentaje de citotoxicidad hacia las CTA, tanto con las citocinas solas como con sus combinaciones (Gráfica VII A). La actividad lítica hacia los LSP autólogos y la línea CaLo se mantuvo en un porcentaje menor al 25% (Gráfica VII B, C), solo los LSP que fueron estimulados con IFN- γ presentaron un ligero aumento en la citotoxicidad contra la línea CaLo con un 38% (Gráfica VII C).

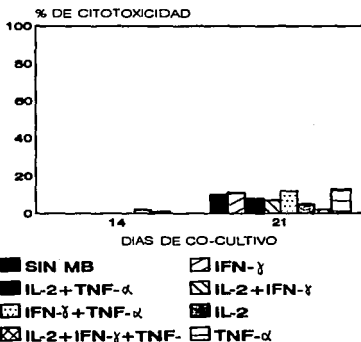
Los resultados hasta ahora obtenidos no proporcionan evidencias suficientes para atribuirle a algún factor el efecto citotóxico-específico generado por los LSP de pacientes con CaCu, sin embargo, como los porcentajes de citotoxicidad son altos en todas las condiciones empleadas, sería recomendable realizar los ensayos de citotoxicidad con diferentes relación de células efectoras:células blanco para evaluar cual MB induce la actividad lítica observada.

GRAFICA VI PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE LA PACIENTE CON CANCER CERVICO UTERINO (III).

A TUMOR AUTOLOGO



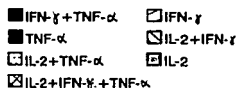
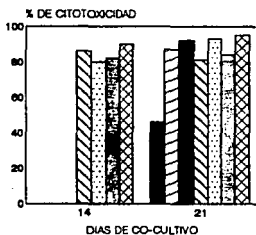
B LSP AUTOLOGOS



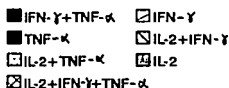
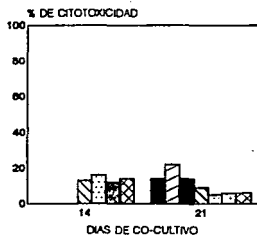
GRAFICA VII

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE LA PACIENTE CON CANCER CERVICO UTERINO (IV)

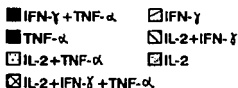
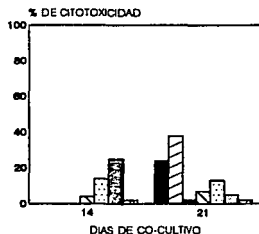
A TUMOR AUTOLOGO



B LSP AUTOLOGOS



C CaLo



VIABILIDAD Y CITOTOXICIDAD DE LOS LSP GENERADOS EN CO-CULTIVO AUTOLOGO, DESPUES DE CUATRO DIAS EN AUSENCIA DE MB.

Una vez que se corroboró que los LSP de pacientes con CaCu proliferan y tienen actividad citotóxica-específica hacia las células del tumor autólogo cuando son generados en presencia de los MB, el siguiente paso fue conocer si estos LSP siguen viables y con actividad lítica cuando eran co-cultivados en ausencia de MB. Con este propósito los LSP de la paciente IV sensibilizados por 21 días con los MB solos y sus combinaciones, fueron co-cultivados por cuatro días más en presencia de CTA y ausencia de MB para evaluar su viabilidad y citotoxicidad usando como células blanco CTA, LSP autólogos y la línea CaLo.

A los 4 días las células efectoras de la paciente IV provenientes del co-cultivo con los MB solos o en combinaciones sin IL-2 se encontraban muertas. Interesantemente, cuando se utilizaron combinaciones donde se encontraba presente la IL-2 los LSP presentaron diferentes grados de viabilidad, siendo mayor ésta cuando se emplearon los tres MB (75%) (Tabla 2).

Para confirmar que los LSP inducidos con IL-2 mueren a diferencia de aquellos generados con la combinación de los tres MB. Los LSP de la paciente II provenientes de estas dos combinaciones se co-cultivaron cuatro días en presencia de CTA y en ausencia de MB. Corroborándose los resultados anteriores y en este caso la viabilidad de los LSP previamente sensibilizados con los tres MB fue mayor (90%).

Una vez que se determinó que la combinación de los tres MB confiere a los LSP la capacidad de mantenerse viables en ausencia de los MB, se procedió a evaluar si los LSP de la paciente IV que habían sido sensibilizados con los tres MB conservan su capacidad citotóxica específica. Encontrándose que seguía siendo muy alta (87%).

Para confirmar que esta citotoxicidad sigue siendo específica los LSP de la paciente II sensibilizados por 21 días con los tres MB y co-cultivados por cuatro días, más, en ausencia de MB fueron retados con CTA, LSP autólogos frescos y la línea CaLo. Los resultados mostraron que los LSP conservan su alta citotoxicidad

hacia las CTA (96%) y una baja actividad lítica contra los LSP autólogos y la línea CaLo (0 y 2%).

TABLA 2. PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LSP DESPUES DE CUATRO DIAS DE CULTIVO EN AUSENCIA DE MODULADORES BIOLÓGICOS.

CONDICION	PACIENTE	
	II	IV
CT+LSP	ND	-
CT+LSP+IL-2	-	-
CT+LSP+IFN- γ	ND	-
CT+LSP+TNF- α	ND	-
CT+LSP+IL-2+IFN- γ	ND	50%
CT+LSP+IL-2+TNF- α	ND	50%
CT+LSP+IFN- γ +TNF- α	ND	-
CT+LSP+IL-2+IFN- γ +TNF- α	90%	75%

CT	CELULAS TUMORALES
LSP	LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA
IL-2	INTERLEUCINA-2
IFN- γ	INTERFERON- γ
TNF- α	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α
ND	NO DETERMINADO
-	LSP MUERTOS

Los resultados de estos ensayos proporcionan evidencias de que es posible aumentar el grado de proliferación de los LSP de pacientes con CaCu, hasta 20 veces el número inicial a 21 días, utilizando la combinación de IL-2 + IFN- γ + TNF- α . Asimismo, se observó que se mantiene una gran respuesta citotóxica-específica contra las CTA, hasta por cuatro días de cultivo en ausencia de MB.

RELACION DE LINFOCITOS CD4:CD8 GENERADOS POR EL CO-CULTIVO DE LSP DE PACIENTES CON CaCu.

Es conocido que existen alteraciones en la relación de células CD4:CD8 en sangre periférica de pacientes con diversas enfermedades como artritis reumatoide, micosis, lepra y en algunos tumores como el melanoma (107), lo cual nos da indicios de que este tipo de linfocitos T intervienen en estas enfermedades y tomando en consideración que las poblaciones citotóxicas son generalmente de fenotipo CD8 era importante conocer la relación de linfocitos CD4:CD8 en pacientes con CaCu. Además de determinar el fenotipo y la relación de linfocitos CD4:CD8 de los LSP que presentaron una gran actividad proliferativa y citotóxica en contra de las células tumorales autólogas.

Para ello a los LSP de pacientes con CaCu extraídos de sangre periférica se les realizó un marcaje diferencial para identificar los linfocitos CD4 y CD8, mediante anticuerpos monoclonales (anti-CD4 y anti-CD8). Asimismo, se marcaron los LSP generados en los co-cultivos con CTA en ausencia y presencia de MB y sus combinaciones, evaluándose el marcaje tanto al inicio del cultivo como cada 7 días.

El marcaje de los LSP al inicio del cultivo mostró que las cuatro pacientes tenían una relación normal de linfocitos CD4:CD8 de 2:1 (Tabla 3). A los 7 días la relación CD4:CD8 presentó variaciones sin observarse un patrón constante para ninguna de las pacientes (Tabla 4). A los 14 días de co-cultivo, los LSP generados en presencia de TNF- α o con la combinación de los tres MB presentaron una proporción CD4:CD8 de 1:1, mientras que el resto de las condiciones varía, sin presentar un comportamiento regular (Tabla 5). Por otro lado, a los 21 días la población CD8 es mayor en todas las combinaciones de MB, excepto para los LSP de la paciente IV sensibilizados con IL-2 + IFN- γ en donde se mantiene la relación inicial (Tabla 6).

TABLA 3. RELACION DE LINFOCITOS CD4:CD8 DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu), AL INICIO DEL CO-CULTIVO.

PACIENTE	EC-IB	EC-IIB	EC-IV
I	2:1		
II	2:1		
III		2:1	
IV			2:1

EC ESTADIO CLINICO

TABLA 4. RELACION DE LINFOCITOS CD4:CD8 DESPUES DE 7 DIAS DE CO-CULTIVO AUTOLOGO.

CONDICION	PACIENTE			
	I	II	III	IV
CT+LSP	ND	ND	3:1	2:1
CT+LSP+IL-2	1:2	2:1	1:3	1:2
CT+LSP+IFN- γ	ND	ND	1:1	1:2
CT+LSP+TNF- α	ND	1:2	1:1	2:1
CT+LSP+IL-2+IFN- γ	ND	ND	3:2	2:1
CT+LSP+IL-2+TNF- α	ND	2:1	4:1	1:1
CT+LSP+IFN- γ +TNF- α	ND	ND	3:1	1:1
CT+LSP+IL-2+IFN- γ +TNF- α	1:2	2:1	2:1	1:1

CT CELULAS TUMORALES
 LSP LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA
 IL-2 INTERLEUCINA-2
 IFN- γ INTERFERON- γ
 TNF- α FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α
 ND NO DETERMINADO

TABLA 5. RELACION DE LINFOCITOS CD4:CD8 DESPUES DE 14 DIAS DE CO-CULTIVO AUTOLOGO.

CONDICION	PACIENTE			
	I	II	III	IV
CT+LSP	ND	ND	1:1	1:3
CT+LSP+IL-2	1:2	1:1	2:1	2:1
CT+LSP+IFN- γ	ND	ND	2:1	1:4
CT+LSP+TNF- α	ND	1:1	1:1	1:1
CT+LSP+IL-2+IFN- γ	ND	ND	1:1	1:1
CT+LSP+IL-2+TNF- α	ND	2:1	1:1	2:1
CT+LSP+IFN- γ +TNF- α	ND	ND	2:1	1:3
CT+LSP+IL-2+IFN- γ +TNF- α	1:1	1:1	1:1	1:1

CT *CELULAS TUMORALES*
LSP *LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA*
IL-2 *INTERLEUCINA-2*
IFN- γ *INTERFERON- γ*
TNF- α *FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α*
ND *NO DETERMINADO*

TABLA 6. RELACION DE LINFOCITOS CD4:CD8 DESPUES DE 21 DIAS DE CO-CULTIVO AUTOLOGO.

CONDICION	PACIENTE			
	I	II	III	IV
CT+LSP	ND	ND	1:1	1:4
CT+LSP+IL-2	1:1	1:1	1:1	1:1
CT+LSP+IFN- γ	ND	ND	1:4	1:1
CT+LSP+TNF- α	ND	1:2	1:2	1:2
CT+LSP+IL-2+IFN- γ	ND	ND	1:2	2:1
CT+LSP+IL-2+TNF- α	ND	1:1	1:2	1:1
CT+LSP+IFN- γ +TNF- α	ND	ND	1:3	1:3
CT+LSP+IL-2+IFN- γ +TNF- α	1:1	1:1	1:1	1:1

CT	<i>CELULAS TUMORALES</i>
LSP	<i>LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA</i>
IL-2	<i>INTERLEUCINA-2</i>
IFN-γ	<i>INTERFERON-γ</i>
TNF-α	<i>FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α</i>
ND	<i>NO DETERMINADO</i>

Por lo tanto, podemos decir que en la mayoría de los casos se da un aumento de la población CD8+, lo cual puede explicar el efecto citotóxico específico observado.

Las poblaciones que fueron estimuladas con citocinas solas así como sus combinaciones mostraron tener una gran citotoxicidad-especifica hacia las células del tumor autólogo, además de haber observado que en algunas combinaciones los LSP se encuentran viables aún en ausencia de MB, lo cual nos hacia sospechar que esta células pudieran ser de memoria, dadas las características antes mencionadas. Para determinar la presencia de este tipo de células, los LSP de las pacientes II, III y IV que habían sido sensibilizados por 21 días en presencia de IL-2 + TNF- α y la combinación de los tres MB fueron marcados con el anticuerpo anti-CD45RO que es conocido como marcador específico para las células de memoria, dando reacción positiva en todos los casos, pero el porcentaje de células de memoria fue mayor cuando se utilizaron los tres MB (Tabla 7).

TABLA 7. PORCENTAJE DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu) MARCADOS COMO CELULAS DE MEMORIA (CD45RO).

	CO-CULTIVO EN PRESENCIA DE	
	<i>IL-2+TNF-α</i>	<i>IL-2+IFN-γ+TNF-α</i>
		CD4 5RO
PACIENTE II	**	***
PACIENTE III	**	***
PACIENTE IV	**	***

TNF-α	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α
IL-2	INTERLEUCINA-2
IFN-γ	INTERFERON-γ
CD45RO	POBLACIONES DE MEMORIA
**	50% DE CELULAS POSITIVAS
***	75% DE CELULAS POSITIVAS

DISCUSION

El cáncer es una enfermedad que por mucho tiempo se ha considerado incurable, por esta razón durante las últimas dos décadas se ha tratado de desarrollar alternativas terapéuticas para dar mayores oportunidades de supervivencia a pacientes oncológicos, en particular con estadios avanzados. Entre las terapias implementadas con este fin destaca la Inmunoterapia Adoptiva que ha mostrado tener un futuro prometedor, ya que por medio de ella es posible generar *in vitro* células efectoras dirigidas contra antígenos tumorales como los virales. La transferencia de las células efectoras obtenidas *in vitro* ha tenido algunos éxitos disminuyendo masas tumorales parcial o totalmente (108, 109), sin embargo, ha resultado ser muy tóxica. Por esta razón, se han implementado proyectos de investigación básica para adecuar metodologías que permitan la generación de un número suficiente de células efectoras con actividad antitumoral específica, que puedan ser transferidas *in vivo* pensando en su posible aplicación clínica, en pacientes oncológicos sobre todo en estadios avanzados para quienes los tratamientos convencionales suelen ser paliativos con una baja esperanza de supervivencia a 5 años.

En nuestro país el tipo de cáncer con mayor incidencia es el cáncer cérvico uterino (CaCu), que en la actualidad ocupa el primer lugar de mortalidad por enfermedades neoplásicas. Por esta razón y por la poca efectividad de las terapias utilizadas para este tipo de cáncer y dada su asociación con una etiología viral, el CaCu, se considera un buen candidato para ser incluido en protocolos de Inmunoterapia. Es por ello en los últimos 5 años nuestro laboratorio ha trabajado en el desarrollo de una metodología que permita obtener células efectoras específicas dirigidas contra células tumorales de CaCu.

Los trabajos hasta ahora realizados han demostrado que la combinación de moduladores biológicos como IL-2 + IFN- γ + TNF- α son capaces de generar una gran respuesta proliferativa sobre LSP de pacientes con CaCu (105), lo cual se

corroborar en el presente trabajo, sin embargo, no se conocía cual de estos MB era el responsable de dicha proliferación. No obstante, al probar el efecto de cada uno de estos moduladores sobre la proliferación de LSP no encontramos que alguno de ellos individualmente induzca una gran acción proliferadora como la observada al utilizar los tres MB juntos por lo que la proliferación observada se puede atribuir a un efecto sinérgico entre las funciones de estos tres MB, en donde la IL-2 actúa como agente mitogénico, IFN- γ como factor diferenciador y TNF- α potenciando la actividad de IL-2. Por otro lado, la proliferación observada con IFN- γ o TNF- α solos puede estar inducida por la IL-2 endógena ya que IFN- γ adicionado actúa como diferenciador más que proliferador, por su parte el TNF- α que induce la expresión del receptor de 55 kD para la IL-2 parece no ser señal suficiente para incrementar la proliferación de los LSP que requieren de la presencia del receptor de alta afinidad, por tanto en este caso la proliferación observada puede ser el resultado de la IL-2 endógena, lo cual requeriría de más tiempo de co-cultivo para obtener una proliferación semejante a la inducida por la IL-2 exógena (71, 110-112). Por otra parte, el haber encontrado que el tiempo de doblaje de los LSP es de aproximadamente nueve días, nos hace pensar que bajo nuestras condiciones de trabajo se están generando linfocitos T citotóxicos (LTC), debido a que su crecimiento exponencial es más lento que el de las células NK y LAK, cuyo crecimiento exponencial es de cuatro días en presencia de altas concentraciones de IL-2.

Otro dato interesante, es el hecho conocido de que los LSP de pacientes oncológicos en estadios avanzados disminuyen su capacidad proliferadora (115), por lo cual pensamos que los LSP de la paciente IV no mostraron grandes diferencias en proliferación con IL-2 y los tres MB ya que se trata de LSP de una paciente en estadio IV A. No obstante, debemos destacar que fue posible obtener una población considerable de LSP con IL-2 o los tres MB con respecto al control, y aunque la diferencia entre ellos no es tan grande, también en este caso se obtuvo la mayor población con los tres MB.

Por otro lado, se había observado que en cultivos MLTC de 4 semanas (105, 106), la combinación de IL-2 + IFN- γ + TNF- α generaba una actividad citotóxica aún mayor que la inducida por la IL-2 sola. Para explicar esto podemos pensar que bajo estas condiciones de cultivo se proporcionan las dos señales necesarias para la generación de linfocitos T citotóxicos (LTC) a partir de sus

precursores, pre-LTC. La primera señal es proporcionada por la interacción del receptor de células T (RCT), presente en la superficie del pre-LTC, con el antígeno asociado a el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I o clase II. Como resultado de esta señal, los pre-LTC expresan en su superficie receptores para IL-2. Sin embargo, los LTC activados por antígeno no pueden dividirse a menos que se produzca una segunda señal, dada por la presencia de algún mitógeno como la IL-2. De tal manera, si un pre-LTC es estimulado con las dos señales, se divide y madura bajo la influencia de las citocinas secretadas por ellos mismos, por ejemplo, la población de células CD4 (Th1) producen IFN- γ y TNF- α , que convierte a los CD8 en células citotóxicas. Una vez maduro, el LTC puede atacar y destruir células tumorales (80). En este caso pensamos que al cultivar los LSP en presencia de las células tumorales, proporcionamos una de las señales necesarias para la maduración de LTC observándose solo el mantenimiento de los LSP a lo largo del cultivo con una pequeña actividad citotóxica hacia las CTA por ausencia de la segunda señal que en este caso estaría dada por el mitógeno. Sin embargo, no descartamos que esta citotoxicidad se pueda incrementar al aumentar el tiempo de cultivo.

Por otra parte, al emplear en nuestros ensayos el co-cultivo autólogo estamos proporcionando la primera señal, mientras que la segunda se encuentra ausente en algunos casos, en éstos últimos transcurrirá un tiempo mayor para que se secreten MB endógenos que induzcan la proliferación y diferenciación de los LTC, por esta razón observamos que a los 21 días de co-cultivo encontramos una alta citotoxicidad hacia las CTA en la mayoría de las combinaciones de MB. Por lo tanto, es necesario emplear en los ensayos de citotoxicidad diferentes proporciones de LTC:CTA para medir la eficiencia citotóxica al utilizar los MB solos y sus combinaciones.

Por otra parte, debemos destacar la gran importancia que tiene el haber encontrado en nuestros ensayos *in vitro*, que la actividad citotoxicidad-específica en presencia de las tres citocinas se puede generar a partir de los 14 días de co-cultivo. Dicha actividad se puede atribuir a la presencia constante del antígeno y los MB, que estarían proporcionando las condiciones necesarias para inducir y mantener la actividad lítica específica de LSP en un tiempo menor que el requerido durante una respuesta inmune común, en la que también se secretan estos MB pero en un periodo más largo actuando de manera similar, desarrollando una actividad lítica pero menor a la presentada por los LSP sensibilizados con los tres

MB. Estos resultados son muy alentadores, sin embargo, aunque pequeña, a este tiempo existe actividad lítica contra células heterólogas y LSP autólogos que puede ser el resultado de la presencia de células NK y LAK, que tienen la capacidad de ser muy activas y por tanto producir un gran porcentaje de mortalidad. Para confirmar esta hipótesis sería necesario utilizar anti-CD16 en LSP de 14 días de sensibilización.

Dada la gran actividad lítica mostrada por los LSP sensibilizados con IFN- γ o TNF- α solos esperábamos que este comportamiento se mantuviera al adicionarlos de manera simultánea a los cultivos. Sin embargo, los LSP generados en presencia de IFN- γ + TNF- α mostraron una menor capacidad citotóxica, este fenómeno puede estar dado por la autorregulación de la respuesta inmune, en la cual se producen citocinas, como la IL-10, que es secretada por los linfocitos Th2 (CD4) y T2 (CD8), y es capaz de inhibir la proliferación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, además de bloquear la acción diferenciadora de IFN- γ (39, 113). Por esta razón pensamos que los LSP generados en presencia de IFN- γ + TNF- α , están secretando IL-10 que regula tanto la proliferación mediada por TNF- α como la diferenciación inducida por IFN- γ , dando como resultado la baja proliferación y menor citotoxicidad observadas por los LSP sensibilizados con esta combinación de MB. Además, la falta de la segunda señal dada por el estímulo mitogénico de IL-2 exógena, ausente al inicio del cultivo, provoca que sea necesario más tiempo para generar LTC ya que se requiere sintetizar IL-2 endógena que sirve como segunda señal, por lo cual al adicionar IFN- γ y TNF- α se requiere de un tiempo semejante al de la respuesta inmune *in vivo* para generar la actividad citotóxica. Aun así pensamos que si se evalúa la actividad lítica a 28 o 42 días, en estas condiciones, no se obtendría una citotoxicidad semejante a la alcanzada cuando se adicionan los tres MB desde el inicio del cultivo por el efecto sinérgico de TNF- α sobre IFN- γ e IL-2.

Las diferencias encontradas en el grado de proliferación y citotoxicidad hacia las CTA por los LTC puede deberse a las diferentes subpoblaciones de linfocitos T estimulados por la combinación de citocinas empleadas, ya que éstas inducen diferentes subpoblaciones de las células T, por ejemplo, la IL-2 puede inducir la proliferación de células CD4 a bajas concentraciones y CD8 en altas concentraciones (111, 114), el TNF- α favorece la aparición de linfocitos CD8 y el IFN- γ células CD4 (84, 108).

Ahora bien, los LSP generados en presencia de la combinación de IL-2 + IFN- γ + TNF- α mostraron una gran actividad proliferativa y lítica, que parece ser el resultado de la acción conjunta de IL-2 actuando como mitógeno, IFN- γ como el factor diferenciador y TNF- α aumentando la acción mitogénica de IL-2 e induciendo la secreción de enzimas proteolíticas necesarias para la lisis de células transformadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la combinación de los tres MB es la mejor condición para obtener una mayor proliferación y gran actividad lítica como consecuencia de un efecto sinérgico entre la IL-2, IFN- γ y TNF- α , ya que al utilizarlos por separado o en combinaciones de dos MB no se observa un aumento paralelo en la proliferación y citotoxicidad, observándose que la citotoxicidad es muy alta y la proliferación baja. Sin embargo el TNF- α parece jugar un papel muy importante en la inducción de la actividad lítica de los LSP ya que cuando se utilizó solo éste induce un porcentaje de lisis similar o mayor al producido por los tres MB.

Por otro lado, en todas las condiciones empleadas no se detectó citotoxicidad hacia los LSP autólogos y la línea CaLo por parte de los LSP generados a 14 días. Esto se atribuye a la generación de CTLs que ejercen su función lítica mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), cuyas moléculas presentan diversos haplotipos; de tal forma que la respuesta de los linfocitos se encuentra restringida a un reconocimiento específico de éstas moléculas a las cuales se encuentra unido el antígeno particular. De esta forma, pensamos que en nuestros ensayos los linfocitos T generados están restringidos a un haplotipo particular, por lo cual se da un reconocimiento y lisis específica hacia la célula tumoral autóloga, sin presentar lisis hacia células heterólogas aunque procedan de un mismo tipo de tumor. Esto nos hace pensar que se están generando células específicas, ya que la citotoxicidad contra los LSP autólogos frescos y la línea CaLo disminuye a los 21 días si se compara con la observada a los 14.

Así como las citocinas pueden favorecer la generación de una población de linfocitos, también pueden controlar la proporción de estas poblaciones, de esta manera la combinación de las tres citocinas antes mencionadas parece generar

variaciones en la proporción de linfocitos CD4:CD8 que a su vez determinan el tipo de citocinas secretadas que regulan la proliferación y citotoxicidad de los LSP. Por tanto, el haber encontrado a los 21 días una proporción de linfocitos CD4:CD8 de 1:1 en los cultivos estimulados en presencia de IL-2 puede estar inducida por la síntesis endógena de IFN- γ importante en la maduración de los pre-LTC (113). Ahora bien la determinación de la proporción 1:1 de linfocitos CD4:CD8 desde los 14 días de co-cultivo en presencia de IL-2 + IFN- γ + TNF- α nos indica que la administración exógena de estos MB reduce el tiempo de generación de células específicas. Ya que se proporcionan simultáneamente en el cultivo las principales citocinas involucradas tanto en los procesos de proliferación y diferenciación de pre-LTC favoreciendo el equilibrio en la proporción CD4:CD8 además de conferirles una gran actividad proliferativa y lítica manifestándose esta última por el aumento de células CD8.

Por otra parte, el encontrar la misma relación CD4:CD8 con TNF- α solo, se atribuye a la inducción de la expresión de receptores para IL-2, con la subsecuente producción de IL-2, que podría desplazar la relación normal de linfocitos CD4:CD8 a una relación 1:1 a los 14 días de co-cultivo. Sin embargo, la disminución de la relación a 21 días de co-cultivo con una mayor proporción de células CD8 parece estar inducida por TNF- α que incrementa la población de linfocitos T restringidos al CMH-clase I (71) los cuales en presencia de IFN- γ endógeno induce la diferenciación de una población de células altamente citotóxicas.

Por otro lado, es importante destacar el hecho de haber identificado células de memoria en nuestros cultivos que son resultado de una expansión clonal de células T activadas mediante un antígeno, que necesitan de ciertas condiciones para llegar a ser linfocitos T de memoria, entre éstas se encuentra la activación a través del receptor de la célula T (RCT) en conjunción con la molécula de CD3 (40, 67), por esta razón pensamos que al cultivar los LSP de pacientes con CaCu en presencia de IL-2 + TNF- α se generó un porcentaje de células de memoria, el cual fue superado al utilizar los tres MB lo que indica que al administrar los tres MB de manera simultánea se favorece la proliferación de células citotóxicas que en presencia constante de antígeno son diferenciadas a células de memoria. Bajo las condiciones de cultivo empleadas podríamos estar neutralizando el efecto de citocinas, como IL-10, que regulan negativamente la respuesta inmune. La

suposición anterior se basa en el hecho de mantener constantemente un nivel elevado de MB a diferencia con una respuesta normal en la que se dan fluctuaciones en la presencia y niveles de los MB, lo que favorece la proliferación de linfocitos CD8 por la presencia de TNF- α que sinergiza con IL-2 e IFN- γ manteniendo de esta manera la diferenciación de LTC.

Ahora bien, es conocido que las células de memoria son capaces de mantenerse viables por periodos prolongados de tiempo exclusivamente en presencia del antígeno (41, 42) y que para convertirse en células de memoria requieren de IFN- γ y TNF- α que son secretados por los linfocitos CD4 (Th1) activados mediante un antígeno o como en este caso son adicionados de manera exógena. Por esta razón pensamos que los LSP que habían sido sensibilizados con los MB solos o las combinaciones en las que no se utilizó IL-2 se mueren, ya que pueden no haberse generado linfocitos T de memoria o su número fue muy bajo, por lo que al retirar del cultivo los MB las poblaciones citotóxicas desaparecen por la falta de la señal mitogénica. Mientras que al utilizar las combinaciones de IL-2 + IFN- γ , IL-2 + TNF- α y los tres MB juntos se obtienen diferentes grados de viabilidad, lo que puede estar mediado por la cantidad de células de memoria generadas y dado que cuando los LSP fueron sensibilizados con los tres MB se obtuvo la mayor viabilidad y actividad lítica, se atribuye a la aparición de una mayor cantidad de células de memoria, confirmando nuevamente que esta combinación es la mejor para inducir una alta proliferación, citotoxicidad y células de memoria, lo que se puede atribuir a un efecto sinérgico de éstos tres MB.

El hecho de haber encontrado un 50% de células viables con fenotipo CD45RO⁺, en los LTC generados en presencia de IL-2 + TNF- α o IL-2 + IFN- γ , parece ser el resultado de la existencia de una mayor cantidad de células CD8 de memoria que células CD4 ya que las células CD8 tienen la capacidad de sintetizar una gran cantidad de IL-2 y TNF- α (67), en comparación a las células CD4, las cuales permitirían el mantenimiento de las células de memoria a pesar de retirar los MB. Debemos destacar que aunque los LSP sensibilizados con los tres MB y co-cultivados cuatro días en ausencia de MB se mantienen vivos y disminuye un 20% su actividad lítica con respecto a los 21 días. Esto se puede atribuir a la muerte de las células citotóxicas-específicas, pero no de memoria, que también son obtenidas en nuestros cultivos.

El mayor porcentaje de viabilidad obtenido a cuatro días de cultivo en ausencia de MB con los LTC sensibilizados es en presencia de los tres MB que puede ser el resultado de la generación de una mezcla de poblaciones de memoria CD4 y CD8, que secretan las citocinas como IL-2 e TNF- α , necesarias para mantener y sustentar las poblaciones de células citotóxicas sean o no de memoria.

Ante las evidencias mostradas en el presente trabajo consideramos que la utilización de los tres MB es la mejor combinación para obtener una gran población de células efectoras de memoria, con acción citotóxica-específica hacia el tumor ya que ninguno de los MB llegó a tener la actividad proliferadora y diferenciadora sobre los LSP como la inducida por los tres MB. Sin embargo, es necesario determinar específicamente el fenotipo de la población de las células que presentan gran actividad lítica estableciendo la proporción de células CD4 CD45RO :CD8 CD45RO, además de valorar la presencia de IL-10 y otras citocinas como IL-2, IL-4, IFN- γ y TNF- α que se estén secretando al utilizar cada una de las combinaciones de MB. Asimismo sería recomendable probar si la citotoxicidad es dada por los linfocitos CD4 o CD8 por medio del bloqueo de antígenos del CMH clase I. Por otra parte, es importante destacar que el tiempo para generar LTC en presencia de los tres MB es muy corto debido a que a partir de los 14 días se obtiene una actividad citotóxica específica, esto tiene gran trascendencia ya que se pueden generar LTC en un tiempo relativamente corto, pensando en su posible aplicación clínica en pacientes oncológicos en estadios avanzados para los cuales los tratamientos convencionales no son eficientes. Por último, es pertinente mencionar que estos resultados son muy alentadores ya que ante la falta de tratamientos que ofrezcan una mejor calidad de vida a estos pacientes se pueden implementar técnicas de Inmunoterapia Adoptiva que parecen ofrecer una gran ayuda al paciente sin dañarlo.

CONCLUSIONES

1. Es posible obtener linfocitos T citotóxicos específicos hacia células tumorales de CaCu, sensibilizados en presencia de IL-2 + IFN- γ + TNF- α , a partir de los 14 días de co-cultivo autólogo.
2. La citotoxicidad observada por los LSP co-cultivados en presencia de IL-2 + IFN- γ + TNF- α se debe a un efecto sinérgico de IL-2, IFN- γ y TNF- α sobre proliferación y citotoxicidad de los LTC.
3. Con la combinación de IL-2 + IFN- γ + TNF- α se genera un alto porcentaje de células de memoria con actividad citotóxica específica hacia las células tumorales autólogas, la cual se mantiene aún en ausencia de lqs MB, después de 4 días de co-cultivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Marinello, Z. (1983). **Nociones y reflexiones sobre cáncer**. Ed: Científico Técnica. La Habana, Cuba. pp:189.
2. Wyke, J.A. (1986). **Viruses and cancer**. In: Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Franks, L.M., Feich, Editors. Oxford, U.K. pp:3-20.
3. Wheather, P.R. Bukitt, H.G., Daniels, V.G. (1980). **Histología funcional**. Ed. JIMS. Barcelona, Espana. pp.278.
4. De Vita, V.T., Hellman, S., y Rosenberg, S. (1989). **Cancer: principles and practice of oncology**. 3a. ed. J.B. Lippincott Co. U.S.A. pp:149-347.
5. Potter, V.R. (1982). In: **Concepts in cancer medicine**. Grune and Stratton. Inc. J.N.Y. U.S.A. pp: 119-125.
6. Henry, S.A. (1947). **Occupational cancer attributable to certain chemical in industry**. Br. Med. Bull. 4:389.
7. Yamagiwa, K., y Ichikawa, K. (1918). **Experimental study of the pathogenesis of carcinoma**. J. Cancer Res. 3:1.
8. Cook, J.W., Hieger, I., Kenneway, E.L., y Mayneord, W.V. (1932). **The production of cancer by pure hydrocarbon part I**. Proc. R. Soc. B. 111:455.
9. Clayton, D. B. (1990). **The prevention of cancer. Introduction: An overview of current and anticipated methods for cancer prevention**. Cancer Letters. 50:3.
10. Stern, P. (1991). **Human papillomaviruses and cervical cancer**. From: Paterson Symposium No. 26. 28-30 de Octubre 1991. Manchester, Inglaterra.
11. Rojas, C.J., Ramírez, H.J. (1992). **Carcinoma cérvico uterino intraepitelial análisis de cien casos**. Cancerología. 38:1509.

12. Rommery, S.L. (1980). **Gynecology and obstetrics: The health care of women.** 2a. Mc. Graw-Hill. U.S.A.
13. Krupp, M.A., Chatton, M.J. (1982). **Diagnóstico Clínico y tratamiento.** 17a. Ed. La Prensa Medica Mexicana, S.A. México 2499 pp.
14. Haley, N.J., Hoffmann, D., Wynder, E.L. (1986). **Uptake of tobacco smoke components.** In: Hoffman, D., Harris, C.C., eds. **Mechanisms in tobacco carcinogenesis.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A. 186:3.
15. Slattery, M.L., Robinson, L.M., Schuman, K.L., et al. (1989). **Cigarette smoking and exposure to passive smoke are risk factors for cervical cancer.** JAMA. 261:1593.
16. McNab, J. (1991). **Human papillomaviruses and cervical cancer.** From: Paterson Symposium No. 26 28-30 de Octubre, 1991. Manchester, Inglaterra.
17. Rulison, R.H. (1942). **Spontaneous regression of human papillomas.** Arch. Dermatol. Syphilol. 46:66.
18. Massing, A.M. y Epstein, W.L. (1963). **Study of human papilloma virus lesions.** Arch. Dermatol. 87:306.
19. Zur Hausen, H. (1988). **Prevalence of human papilloma virus type 16 and 18 in cervical cancer.** Mol. Carcinogenesis. 8:147.
20. Walboomers, J. y Schiffman, M. (1991). **Human papillomaviruses and cervical cancer.** From: Paterson Symposium No. 26, 28-30 de Octubre, 1991. Manchester, Inglaterra.
21. Peto, R., y Zur Hausen, H. (1986). **Viral etiology of cervical cancer.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. p. 245.
22. Jenson, A.B., y Lancaster, W.D. (1990). **Association of human papilloma virus with benign, premalignant, and malignant anogenital lesions.** In: H. Pfister (ed) **papillomaviruses and human cancer.** CRC Press, Boca Ratón. p.11.
23. Reeves, W.C., Caussy, D., Briton, L.A. y Rawes, W.E. (1987). **Case-control study of human papillomaviruses and cervical cancer in Latin America.** Int. J. Cancer 40:450.

24. Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1986). **Immunology**. The C.V. Mosby Co. St. Louis Toronto, Canada. pp:25-100.
25. 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.
26. Stevenson, H. Editor (1989). **Adoptive Cellular Immunotherapy of Cancer**. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. pp:1.
27. Von Boehmer, H., Rajewsky, K. (1992). **Lymphocyte development**. Current Opinion in Immunology. 4:162.
28. Pardoll, D., Cerrera, A. (1992). **T cell development and selection in the thymus**. Bone Marrow Transplantation. 1:46.
29. Kronenberg, M., Siu, G., Hood, L.E. (1986). **The molecular genetics of T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition**. Annu. Rev. Immunol. 4:529.
30. Allison, J.P., Lanier, L.L. (1987). **Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex**. Annu. Rev. Immunol. 5:503.
31. Dembic, Z., Haas, W., Weiss, S. (1986). **Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes**. Nature. 320:232.
32. Saito, T., Weiss, A., Miller. (1987). **Specific antigen-Ia activation of transfected human T cells expressing murine Ti alpha beta-human T3 receptor complexes**. Nature. 325:125.
33. Matis, L.A., Cron, R., Bluestone, J.A. (1987). **Major histocompatibility complex-linked specific of gamma delta receptor bearing T lymphocytes**. Nature. 330:262.
34. O'Brein, R.L., Happ, M.P., Dallas, A. (1989). **Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor gamma delta by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis***. Cell. 57:667.
35. Paul, W.E. (1989). **The immune system: An introduction**. In: **Fundamental Immunology**. (ed) Paul, W.E. Raven Press, LTD, N.Y., U.S.A. pp: 3.

36. De Jong, R., Brouwer, M., Kuiper, H.M., Hooibrink, B., Miedema, F., y van Lier, A.W. (1992). **Maturation- and differentiation-dependent responsiveness of human CD4 T helper subsets.** *J.Immunol.* 149:2795.
37. Mossmann, R.T., y Moore, W.K. (1991). **The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses.** *Immunol. Today.* 12:A48.
38. Romagnani, S. (1991). **Human Th1 and Th2 subset: doubt no more.** *Immunol. Today.* 12:256.
39. Cox, F., Liew, F. (1992). **T-cell subsets and cytokines in parasitic infections.** *Immunol. Today.* 13:445.
40. Hollsberg, P., Melinek, J., Benjamin, D. and Hafler, D. (1993). **Increased protein kinase C activity in human memory T cells.** *Cell. Immunol.* 149:170.
41. Gray, D. and Matzinger, P. (1991). **T cell memory is short-lived in the absence of antigen.** *J. Exp. Med.* 174:969.
42. Jamieson, B., Ahmed, R. (1989). **T cell memory: long persistence of virus-specific cytotoxic T cells.** *J. Exp. Med.* 169:1993.
43. Lotze, M.T. (1992). **Interleukin-2.** In: Bharat, B.A., Jordan, U.G., (eds). *Human Cytokines.* Blackwell Scientific Publication. Boston, USA. pp: 81.
44. Robb, R. (1984). **Interleukin-2: The molecule and its function.** *Immunology Today.* 5:203.
45. Schwinger, B., Resch, K. (1990). **Interleukin-2.** In: Habenicht, A. (eds). *Growth factors, differentiation factors, and cytokines.* Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
46. Smith, K.A., Ruscetti, F.W. (1981). **T cell growth factor and the culture of cloned functional T cells.** *Adv. Immunol.* 31:137.
47. Ceredig, R., Lowenthal, J.W., Nabholz, M., Mac Donald, H.R. (1985). **Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker on intrathymic stem cells.** *Nature* 314:98.
48. Raulet, D.H. (1985). **Expression and function of interleukin-2 receptors on immature thymocytes.** *Nature* 314:101.

49. Chu, E., Rossenwasser, L., Dinarello, C., Lareau, M., y Geha, H. (1984). **Role of interleukin-1 in antigen-specific T cell proliferation.** *J. Immunol.* 132:1311.
50. Farrar, J., Benjamin, W., Hilfiker, M., Howard, M., Farra, W., y Fuller-Farra, J. (1982). **The biochemistry, biology and role of interleukin-2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming cell responses.** *Immunol. Rev.* 63:129.
51. Howard, M., Matis, L., Malek, T., Shevach, E., Kell, W., Cohen, D., Nakanaishi, K., y Paul, W. (1983). **Interleukin-2 induces antigen-reactive T cell lines to secrete BCGF-1.** *J. Exp. Med.* 158:2024.
52. Hu, J., Vaquero, C., Huet, S., Bernard, A., y Sterkes, G. (1987). **Interleukin-2 up-regulates its own production.** *J. Immunol.* 139:4109.
53. Siegel, J.P., Sharon, M., Smith, P.L., Leonard, W.J. (1987). **The IL-2 receptor β chain (p70): role in the mediating signal for LAK, NK, and proliferative activities.** *Science* 238:75.
54. Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957). **The interferon.** *Proc. R. Soc. Lond. B.* 147:258.
55. Stewart, W. (1979). **The interferon system.** Springer, Vienna, New York.
56. Zoon, K. C. (1987). **Human interferons: structure and function.** In: Gresser (ed): *Interferon 9*, New York, U.S.A. Academic Press. pp:1-12.
57. Brown, G.D., Choi, Y., Pampeno, C. (1988). **Regulation of H-2 class-I gene expression in virally transformed and infected cells.** *Crit. Rev. Immunol.* 8:175.
58. Gastl, G., Huber, C., (1988). **The biology of interferon actions.** *Blut.* 56:193.
59. Habenicht, A. (ed). (1990). **Growth factors, differentiation factors, and cytokines.** Springer-Verlag, Berlin, Alemania. p.243.
60. Okita, K., Kaneko, T. (1990). **The potential of interferons in malignant disease.** *Drugs.* 39:1.
61. Jones, E.Y., Stuart, D.I., y Walker, N.P. (1989). **Structure of tumour necrosis factor.** *Nature.* 338:225.

62. Old, L.J. (1985). Tumor necrosis factor (TNF). *Science*. 230:630.
63. Bonavida, B., y Granger, G. (1990). Tumor necrosis factor: structure, mechanism of action, role in the disease and therapy. S. Karger, Basel, Suiza. pp: 350.
64. Bonavida, B., Gifford, G.E., y Kirchner, H. (1988). Tumor necrosis factor/Cachectin and related cytokines. S. Karger, Basel, Suiza.
65. Cherewinsky, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.P., y Mossmann, T.R. (1988). Two types of mouse helper T clones. II. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 166:1229.
66. Pawelec, G., Sachandt, K., Rehlein, A., y Busch, F.W. (1989). Differential secretion of tumor necrosis factor α and granulocyte/macrophage colony stimulating factor but not interferon γ from CD4 compared to CD8 human T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 19:197.
67. De Jong, R., Brouwer, M., Miedema, F. and van Lier, R. (1991). Human CD8⁺ T lymphocytes can be divided into CD45RA and CD45RO cells with different requirements for activation and differentiation. *J. Immunol.* 46:2088.
68. Scheurich, P., Thomas, B., y Ucer. (1987). Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)- α : induction of TNF receptors on human T cells and TNF- α mediated enhancement of T cells responses. *J. Immunol.* 138:1786.
69. Talmadge, J.E., Phillips, H., Schneider, M. (1987). Immunomodulatory properties of recombinant immune and human tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 4:544.
70. Yokota, S., Geppert, T.D., y Lipsky, P.E. (1988). Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 140:531.
71. Robinet, E., Branellec, D., Termijtelen, A., Yves, J., Gay, G. y Chouaib, S. (1990). Evidence for tumor necrosis factor- α involvement in the optimal induction of class I allospecific cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 144:4555.

72. Mueller, D.L., Jenkins, N.K., Schwartz, R.H. (1989). **Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a co-stimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigens receptor occupancy.** *Annu. Rev. Immunol.* 7:445.
73. Chen, L., Linsley, P.S., y Hellstrom, K.E. (1993). **Costimulation of T cells for tumor immunity.** *Immunol. Today.* 14:483.
74. Schwartz, R.H. (1989). **Acquisition of immunologic self-tolerance.** *Cell.* 57:1073.
75. Chesnut, R.W., Grey, H.M. (1985). **Antigen presenting cells and mechanism of antigen presentation.** *Crit. Rev. Immunol.* 5:263.
76. Chesnut, R.W., Grey, H.M. (1985). **Antigen processing and presentation to T cells.** *Immunol. Today.* 6:101.
77. Germain, R.N. (1986). **Immunology: The ins and outs of antigen processing and presentation.** *Nature.* 322:687.
78. Braciale, T.J., Morrison, L.A., Sweetse, M.T. (1987). **Antigen presentation pathways to class I and class II MHV-restricted T lymphocytes.** *Immunol. Rev.* 98:95.
79. Townsend, A., Bodmer, H. (1989). **Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes.** *Annu. Rev. Immunol.* 7:601.
80. Berke, G. (1989). **Functions and mechanisms of lysis induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells.** In: *Fundamental Immunology* (ed). Paul, W.E. Raven Press, LTD. New York, U.S.A. pp:735
81. Lancki, D.W., Kaper, B.P., y Fitch, F.W. (1989). **The requirements for triggering of lysis by cytolytic T lymphocyte clones.** *J. Immunol.* 142:416.
82. Gomard, E., Henin, Y., Colombani, M., y Levy, J. (1980). **Immune response genes control T killer cell response against Moloney tumor antigen. Cytolysis regulating reactions against the best available H-2+viral antigen association.** *J. Exp. Med.* 151:1468.
83. Lu, P., Garcia, J.A., Lichtenheld, M.G., y Podack, E.R. (1992). **Perforin expression in human peripheral blood mononuclear cells.** *J. Immunol.* 148:3354.

84. Fortier, A.H., Nacy, C.A., y Sitrovsky, M.V. (1989). Similar molecular requirements for antigen receptor-triggered secretion of interferon and granule enzymes by cytolytic T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 124:64.
85. Cohen, J.J., y Richard, C.D. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10:267.
86. Ostergaard, H.L., Clark, W.R. (1989). Evidence for multiple lytic pathway used by cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 143:2120.
87. Robbins, S., Cotran, R.F., y Kumar, V. (1984). Neoplasia. In: *Pathologic basis of disease.* chap. 6. 3rd ed. p.214.
88. Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J., y Weiner, A. (1987). The genetic basis of cancer. In: *Molecular Biology of the gene.* Vol. 2. Chap. 26. Benjamin Cummings, U.S.A. p.1006.
89. Farber, E. y Camerson, R. (1980). The sequential analysis of cancer development. *Adv. Cancer Res.* 31:125.
90. Snell, G. (1981). Studies in histocompatibility. *Science.* 213:172.
91. Koch, S., Zalenberg, J., y McKenzie, I. (1984). Description of a murine B lymphoma tumor-specific antigen. *J. Immunol.* 133:1070.
92. Carswell, E., Wanebo, H., Old, L., y Boyse, E. (1970). Immunogenetic properties of reticulum cell sarcomas of SJL/J mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 44:1281.
93. Balwin, R. (1966). Tumor-specific immunity to spontaneous rat tumors. *Int. J. Cancer.* 1:257.
94. Klein, G., y Klein, E. (1977). Immune surveillance against virus-induced tumor and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:2121.
95. Hewit, H.B., Blanke, E., y Walder, A. (1976). A critique of the evidence for active host defense against cancer based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer.* 33:241.

96. Middle, J., y Embelton, M. (1981). Naturally arising tumors of the inbred WAB/Not rat strain. II. Immunogenicity of transplanted tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 67:637.
97. Hewit, H.B. (1978). The choice of animal tumors for experimental studies on cancer therapy. *Adv. Cancer Res.* 27:149.
98. O'Connel, K., y Gooding, L. (1984). Cloned cytotoxic T lymphocytes recognize cells expressing discrete fragments of the SV40 tumor antigen. *J. Immunol.* 132:953.
99. Fer, M., Berman, J., Stevenson, H. (1984). A trial of autologous plasma perfusion over protein A in patients with breast cancer. *J. Biol. Response Mod.* 3:352.
100. Foon, K., Maluish, A., Abrams, P. (1984). Recombinant leukocyte α -interferon therapy for advanced hairy cell leukemia: Therapeutic and immunologic results. *Am. J. Med.* 80:351.
101. Foon, K., Sherwin, S., Abrams, P. (1984). Recombinant leukocyte α -interferon: An effective agent for the treatment of advanced non-Hodkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 311:1148.
102. Kyogo, I., Tilden, A., Kamagai, K. (1985). Leu 11 lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursor of recombinant (rIL-2)-induced activated killer (AK) cells. *J. Immunol.* 134:802.
103. Yoshida, S., Tanaka, R., Takai, N., Ono, K. (1988). Local administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with malignant brain tumors. *Cancer Res.* 48:5011.
104. Yoshino, I., Yano, T., Murata, M., Ishida, T., Sugimachi, K., Kimura, G., Nomoto, K. (1991). Cytolytic potential of peripheral blood T-lymphocytes following adoptive immunotherapy with lymphokine-activated killer cells and low-dose interleukin-2. *Cancer Res.* 51:1494.
105. Rocha, Z. (1992). Estudio de la proliferación y citotoxicidad de leucocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer cérvico uterino contra células de tumor autólogo, en presencia de interleucina-2, interferon- γ y factor de necrosis tumoral- α . Tesis de Maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.

106. Wang, P., Végh, Z., Vanky, F. and Klein, E. (1992). **HLA-B5-Restricted auto-tumor-specific cytotoxic T cells generated in mixed lymphocyte-tumor-cell culture.** *Int. J. Cancer.* 52:517.
107. Fazard, Z., Cochran, A., McBride, W., Dixon, J., Wong, V. and Morton, D. (1990). **Lymphocyte subset alterations in nodes regional to human melanoma.** *Cancer Res.* 50:3585.
108. Rosenberg, S., Spiess, P. and Lafreniere, R. (1986). **A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes.** *Science.* 223:1318.
109. Rosenberg, S., Lotze, T. (1989). **Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients.** *Annals of Surgery.* 210:474.
110. Hornicek, F., Gerstner, C., Kirkwood, J. (1991). **Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the development of cytotoxic T lymphocytes in autologous mixed lymphocyte tumour cultures with human melanoma.** *Clin. Exp. Immunol.* 86:163.
111. Winkelstein, A., Weaver, D., Salva, N. and Machen, L. (1990). **Interleukin-2 induced lymphoproliferative responses.** *Cancer Immunol. Immunother.* 32:110.
112. Maraskovsky, E., Chen, W-F., Shortman, K. (1989). **IL-2 and IFN- γ are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells.** *J. Immunol.* 143:1210.
113. Taga, K., Tosato, G. (1992). **IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production.** *J. Immunol.* 148:1143.
114. Rosenberg, S. and Grimm, E. (1982). **Production and properties of human IL-2.** In: *Isolation, characterization and utilization of T lymphocyte clones.* Ed. by C. Garrison Fathman. Ac. Press. U.S.A.
115. Sharma, S., Saha, K., Shinghal, N. and Malik, B. (1991). **Serum soluble interleukin-2 (IL-2) receptor levels in women with breast carcinoma and its correlation with IL-2 receptor expression on blood lymphocytes and lymphocytic infiltration within the tumour.** *Cancer Immunol. Immunother.* 33:198.

APENDICES

APENDICE 1

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO EAGLE MEDIUM (EM)

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, utilizando para ello dos matraces. Se adicionan 13.4 g/l de EM en polvo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Chem. U.S.A.) agitándose suavemente, se agregan 3.7 g de Bicarbonato de Sodio, 100 U/ml de Penicilina y 100 U/ml de Estreptomina. Se complementa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del ideal, que es 7.2, empleando para ello Acido Clorhídrico diluido y se esteriliza por filtración con membrana de poro de 0.22 micras.

COMPOSICION DEL EM

Aminoácidos	Concentración (mg/l)
L-arginina	84.00
L-cistina	62.57
L-glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-histidina	42.00
L-isoleucina	105.00
L-leucina	105.00
L-lisina	146.00
L-metionina	30.00
L-fenilalanina	66.00
L-serina	42.00
L-treonina	95.00
L-triptofano	16.00
L-tirosina (sal disódica)	104.20
L-valina	94.00

Vitaminas

D-Ca Pantotenato	4.00
Cloruro de Colina	4.00
Acido Fólico	7.20
Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxal	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina	4.00

Sales Inorgánicas

Cloruro de Calcio Anhidro	200.00
Nitrato de Hierro III nonhidratado	0.10
Cloruro de Potasio	400.00
Sulfato de Magnesio anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.00
Fosfato Monosódico monohidratado	125.00

Otros Compuestos

L-glucosa	4500.00
Rojo Fenol	15.00

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

APENDICE 2

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO RPMI-1640

Se mide un 90% del volumen final requerido de agua destilada y desionizada y se coloca en un recipiente de tamaño lo más cercano posible a la medida del volumen final a preparar. La temperatura del agua debe ser de 15-20°C. Bajo agitación lenta y constante se adiciona el RPMI-1640 (RPMI-1640 MEDIUM, Sigma Chem. U.S.A.) hasta su disolución, no debe aplicarse calor al agua. Con un volumen menor al 5% del total de agua se enjuaga el paquete que conteng el Medio en polvo para remover cualquier traza de éste que hubiera quedado adherido y se adiciona al recipiente.

A la solución obtenida se le adicionan 2.0 g de Bicarbonato de Sodio o 26.7 ml de solución de Bicarbonato de Sodio al 75% por cada litro de volumen final de Medio a prepararse. El Medio en su presentación comercial contiene ya el aminoácido L-glutamina, sin embargo, el cultivo de células linfoides requiere de una mayor concentración del mismo. Por tal motivo, en esta etapa de la preparación se adiciona L-glutamina (Sigma, Chem. U.S.A.) en una concentración 2mM. La agitación es útil para la total disolución de estos compuestos.

Se ajusta la solución a pH 7.2-7.4 a 20°C usando, para este fin, una solución concentrada de Hidróxido de Sodio. Se adiciona la cantidad de agua requerida para completar el volumen final y se esteriliza la solución filtrandola con membranas de poro de 0.22 micras.

COMPOSICION DEL RPMI-1640

Sales Inorgánicas	Concentración (g/l)
Nitrato de Calcio 4H ₂ O	0.100
Sulfato de Magnesio anhidro	0.04884
Cloruro de Sodio	6.0
Fosfato Dibásico de Sodio anhidro	0.8

Aminoácidos

L-arginina	0.2
L-asparagina	0.050
L-ácido aspártico	0.20
L-cistina 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.300
Glicina	0.10
L-histidina	0.015
L-hidroxiprolina	0.020
L-isoleucina	0.050
L-leucina	0.050
L-lisina HCl	0.040
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.020
L-serina	0.030
L-treonina	0.020
L-triptofano	0.005
L-tirosina	0.02883
L-valina	0.020

Vitaminas

D-biotina	0.0002
Cloruro de Colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Acido-p-Amino Benzóico	0.001
Acido-D-Pantoténico	0.00025
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B-12	0.000005

Otros

D-Glucosa	2.00
Glutation reducido	0.001
HEPES	5.958
Rojo Fenol	0.0053

APENDICE 3

PREPARACION DE ENZIMAS

COLAGENASA

La solución de Colagenasa al 0.05% se prepara disolviendo 0.05 g de Collagenase Type IV (Sigma Chem. U.S.A.) y 0.1 g de Glucosa Anhídra en 100 ml de Verseno. La solución final se esteriliza mediante el uso de filtros de membrana millipore de 0.22 micras. Para facilitar su manejo, la solución estéril se distribuye en tubos pequeños y se almacena a - 4°C para evitar su autodigestión.

TRIPSINA

La solución de Tripsina al 0.05% se prepara disolviendo 0.05g de Tripsina tipo II (Sigma Chem. U.S.A.) y 0.02 g de EDTA en 100 ml de PBS. La esterilización y almacenaje son similares a los de la Colagenasa.

APENDICE 4

PREPARACION DE LA SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

En 1 l de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de Sodio	8.00
Fosfato de Sodio Monobásico	2.16
Fosfato de Potasio	0.20
Cloruro de Potasio	0.20

Una vez disueltas las sustancias, se ajusta el pH a 7.2 con Acido Clorhídrico y se esteriliza la solución por medio de autoclave por 20 minutos a 20 lb de presión.

APENDICE 5

PREPARACION DE LA SOLUCION AMORTIGUADORA (SALINA) DE BORATOS

En un litro de agua bidestilada (la destilación se debe llevar a cabo en destiladores de vidrio) se disuelven las siguientes sustancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g)
Acido Bórico	6.19
Borato de Sodio	9.54
Cloruro de Sodio	4.39

Esta solución debe ser aforada a 1000 ml.

APENDICE 6

PREPARACION DE LA SOLUCION PBS-TWEEN

En un litro de agua destilada se disuelven las siguientes sustancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g)
Cloruro de Sodio	8.0
Fosfato de Potasio	0.2
Fosfato de Sodio monobásico	2.9
Cloruro de Potasio	0.2
Téecn 20	0.5

Se ajusta el pH a 7.4 y se almacena a 4°C.