

170
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**EFFECTO DE LA INTERLEUCINA -2
(IL-2 EN SOBRENADANTE) EN CULTIVO
DE LINFOCITOS EN POBLACIONES DE
TRES DIFERENTES CENTROS HOSPITALARIOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARTHA CECILIA SANCHEZ GUERRERO

MEXICO, D. F.

1994



FACULTAD DE CIENCIAS
DIRECCION BIBLIOTECA

**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.

A mis padres

A mis hermanos Irma y Jose Luis
por su cariño.

A Paquito

A mis cuñados Guadalupe y Oscar
por su gran apoyo.

Gracias a Roberto Guevara Y. y a Concepción Yerena de Vega por su valiosa amistad y colaboración en el presente trabajo.

A la Dra. Pandora Gómez Arroyo por la confianza y el tiempo dedicado a este trabajo.

A la M en C Ma. Teresa Benitez y al Biólogo Miguel Ángel Meneses por los comentarios al presente.

A Marco por su paciencia y cariño

A la Dra. Sonia Carón J. Jefe del Dep. de Genética y a la Dra. Dolores Paavedra O. subdirectora de investigación del Hospital General "Dr. Manuel G. González" por su apoyo.

A todas aquellas persona que de alguna u otra manera participaron en la elaboración de este trabajo.

I N D I C E

	Página
1.- Agradecimientos.....	1
2.- Resumen.....	2
3.- Introducción.....	3
4.- Objetivos.....	22
5.- Hipótesis.....	23
6.- Material y Métodos.....	24
7.- Resultados.....	27
8.- Discusión y Conclusiones.....	35
9.- Perspectivas de la Técnica.....	37
10.- Referencias.....	38
11.- Apendice I.....	43

RESUMEN

La Interleucina-2 (IL-2) en sobrenadante de cultivos de linfocitos de 48 horas de crecimiento, adicionándola a dos tiempos diferentes es de gran ayuda en el laboratorio de citogenética ya que con este sobrenadante, se puede obtener mayor número de metafases, sin que esto implique un costo adicional.

INTRODUCCION

Entre los exámenes de laboratorio que son específicos de la Genética Humana está el análisis citogenético, para el cual las células más empleadas son los linfocitos T, mediante los cuales se obtienen cromosomas y gracias a su análisis es posible detectar gran cantidad de anomalías, por ejemplo: Síndrome de Turner, parejas con problemas de infertilidad, problemas de diferenciación sexual, etc.

Para realizar un diagnóstico citogenético adecuado es necesario contar con suficientes células en metafase, cuya calidad debe ser óptima para su análisis.

Los linfocitos T constituyen parte del sistema inmune, cuya función básica es identificar, destruir a las sustancias extrañas al organismo así como a los invasores y a las moléculas tóxicas producidas por células (24).

Casi cualquier macromolécula, siempre que sea extraña al individuo, puede inducir una manifestación inmunológica. Toda sustancia capaz de desencadenar dicha respuesta recibe el nombre de antígeno. Existen dos formas de reacción del sistema inmune:

- 1) Respuesta mediada por anticuerpos (Inmunidad Humoral)
- 2) Respuesta mediada por células, (Inmunidad Celular), que implica la activación de células especializadas que realizan funciones que tienen por objeto intervenir en contra de los antígenos.

Dentro de las actividades que tiene el sistema inmune están: la Reactividad altamente específica; y la habilidad para discriminar entre lo propio y lo no propio, para lo cual origina estirpes celulares con capacidad de destrucción del antígeno después de la exposición inicial (2, 47).

Una de las células responsables de la inmunidad son los linfocitos.

Los cuales se localizan en el tejido sanguíneo, linfa y en tejidos linfoides especializados como el timo, ganglios linfáticos, bazo y apéndice. El ser humano en condiciones normales tiene aproximadamente 2×10^{12} linfocitos.

En la década de los 60's se demostró que la respuesta inmunitaria está mediada por dos clases de linfocitos, las células T que se diferencian en el timo y son responsables de la inmunidad mediada por células y las células B que se especializan independientemente del timo, son células secretoras, que dan origen a la inmunidad humoral (2, 6, 37).

Los linfocitos se desarrollan a partir de una célula madre hematopoyética pluripotencial, que produce todas las células sanguíneas. Los linfocitos están capacitados para responder hacia un antígeno determinado antes de haber estado expuestos a él, ya que poseen receptores que se unen específicamente al antígeno (37).

Las zonas reconocidas de un antígeno por un receptor dado reciben el nombre de determinantes antigénicas (2).

A partir de la década de los 70's, se realizaron una serie de trabajos que ayudaron a conocer los mecanismos de activación y el funcionamiento de la respuesta inmunológica, así como las estirpes celulares que participan en ella y los factores polipeptídicos de crecimiento, que las mismas células secretan al ser estimuladas por antígenos o mitógenos (6, 51).

Se sabe en la actualidad que existen una serie de glicoproteínas que actúan preferencialmente sobre células totipotenciales de la médula ósea, a las cuales se les conoce como factores de crecimiento hematopoyético, los cuales estimulan a varias estirpes celulares, que son células de la línea blanca que se han clasificado en tres subtipos: granulocitos, linfocitos y monocitos, cada una con una

función diferente (40).

La médula ósea normal contiene un pequeño número de células o unidades formadoras de colonias (UFC). En cultivos celulares, las UFC producen agregados de granulocitos bajo el estímulo de una glicoproteína similar a una hormona, que se ha denominado factor estimulante de colonias (FEC) y que es elaborado por los monocitos sanguíneos o los macrófagos tisulares (4, 21). Los granulocitos a su vez se dividen en tres clases:

NEUTROFILOS (Polimorfonucleares): constituyen el grupo predominante de granulocitos. Tienen movilidad ameboide, quimiotaxis y capacidad lítica debida a la presencia de algunos tipos de enzimas: proteasas, catepsinas y lisozimas, contenidas en gránulos específicos. Cuando estas células fagocitan bacterias u otras partículas, se provoca la desgranulación, ya que las enzimas de los gránulos son vaciadas hacia la vacuola fagocítica con el material ingerido. De esta manera participan en la respuesta inmune inespecífica.

EOSINOFILOS: células de defensa en contra de helmintos y protozoarios. Poseen gránulos que contienen enzimas similares a los neutrófilos, además tienen alto contenido de peroxidasas y aryl sulfatasa. Los eventos de fagocitosis son similares a los que desarrollan los neutrófilos. No efectúan síntesis de enzimas antimicrobianas lo que indica que su acción no es la de eliminar bacterias (4, 18, 21).

BASOFILOS: son pequeños, en relación a los anteriores, móviles, capaces de fagocitar, aunque no es claro que sea ésta su actividad prioritaria. Parecen tener función secretora (exocitocis). Presentan un contenido alto de histaminas, y heparina lo que facilita el metabolismo de los triglicéridos (4, 21).

LINFOCITOS. constituyen del 30 al 60% de los leucocitos sanguíneos. Células pequeñas que miden de 8 a 15µm de diámetro. Son activamente móviles pero no fagocíticos. Pueden clasificarse básicamente en T o B según sus propiedades físicas e inmunológicas. Las células T al igual que las B responden a un antígeno por división clonal y diferenciación en algunas de las clases de células T específicas para el antígeno.

Las células T citotóxicas (TC), se unen al antígeno viral que se presenta sobre la superficie de una célula infectada y la matan. Los linfocitos T supresores (TS) actúan para inhibir la respuesta inmune a un antígeno, tiempo después que la respuesta se ha desencadenado.

Los linfocitos ayudadores (TA) se adhieren al antígeno sobre la superficie de células B que se han unido ellas mismas al antígeno, cada célula TA libera un tipo de hormonas llamadas linfocinas que permiten a las células B diferenciarse y multiplicarse (8, 21, 34, 37)

MONOCITOS: Células grandes fagocíticas, representan del 1 al 5% de los leucocitos circulantes, su número aumenta en infecciones como: tuberculosis, micosis generalizadas, endocarditis bacteriana y en ciertos ataques por protozoarios. Los monocitos permanecen alrededor de 8 horas en la circulación antes de pasar a los tejidos, donde se transforman en macrófagos alveolares, células de Kupffer u otros macrófagos tisulares. Las células de la línea monocítica ante la presencia de un estímulo antigénico producen linfocinas y/o citocinas sustancias que pueden inducir la secreción de factores estimulantes de colonias (CSF's), tales como Interleucina -1 (IL-1), y el factor de necrosis tumoral (TNF) (21).

Se han encontrado otros factores de crecimiento hematopoyético que forman una gran familia de proteínas extracelulares glicosiladas, que regulan la producción y actividad de células hematopoyéticas. Aquí se

incluyen las Interleucinas (ILs) 1, 2, 4, 5, 6 y 7 (28, 40) su acción primaria es sobre células linfoides, ejemplos de ellos son: los factores de estimulación granulocito-macrófago, estimulantes de colonias de macrófagos (M-CSF), los que estimulan a los granulocitos o a los monocitos (GM-CSF) o solo granulocitos (G-CSF) y Multi-CSF ó IL-3. Actúan sobre neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, megacariocitos y adipocitos (40). Jurgus (25) demostraron que los Factores de crecimiento de células T (TCGF) parcialmente purificados pueden ser usados para regular la proliferación de células TC de cultivos en suspensión, en pacientes con Leucemia Mielocítica crónica (30, 38, 40).

La IL-5 e IL-6 estimulan células que se diferencian en eosinófilos o neutrófilos y macrófagos respectivamente, se ha demostrado en algunos trabajos que la IL-7 puede actuar como una señal mitogénica para timocitos y/o células T; aunque en estos últimos su papel no ha sido bien definido (16). Estos factores de crecimiento hematopoyético son glicoproteínas relativamente pequeñas, que contienen puentes disulfuro intra o intermoleculares, los cuales son N u O glicosilados sobre una treonina (29, 40).

En la actualidad la aplicación terapéutica de la IL-2, interferón (IFN γ) y otros factores de crecimiento linfocitario son de gran ayuda como tratamiento adecuado en pacientes con cáncer de cabeza, cuello, hígado, leucemias, etc. Estos factores se han utilizado como terapia dando buenos resultados en algunos de ellos (12, 14, 15, 50). Todos los factores de crecimiento hematopoyético son sintetizados como moléculas precursoras con una cadena inicial hidrofóbica de 25-32 aminoácidos (aa) adyacente a un sitio clave para su actividad. Para algunos de estos factores, esta secuencia es importante en el control

de la secreción, niveles de glicosilación, transporte o señales peptídicas de anclaje.

Los genes que codifican para GM-CSF e IL-3 se encuentran muy cercanos el uno del otro en el cromosoma 5, esto sugiere que puedan tener un ancestro común. Los genes tanto para el M-CSF como para su receptor se localizan también en el cromosoma 5. El gen de G-CSF se ubica en el cromosoma 17 (tabla 1). Algunos de estos genes se activan cuando existe una señal antigénica, como en el caso de los linfocitos T que actúan a partir de señales intercelulares (40).

Algunos modelos de estimulación inmunológica "in vitro" sugieren que la interacción entre antígeno y un receptor da origen a un anticuerpo, situado en la superficie celular (36).

INICIO DE LA RESPUESTA INMUNE

La activación de las células T requiere de múltiples señales de inicio. El estímulo inicial es provisto por mitógenos ó por el antígeno presentado y procesado. Los mitógenos sobre la superficie celular son necesarios para comenzar cierto estadio del ciclo mitótico. Estos son requeridos para generar procesos metabólicos intracelulares, que pueden ser a nivel de ensamblaje de ARNr. Se ha descrito que algunas lectinas tales como: fitohemaglutinina (PHA), acetato mirístico de forbol (PMA) o la concanavalina A (con A) mediante estimulación alogénica tienen mas actividad para la inducción de IL-2 (17, 28, 29, 38).

La afinidad entre los receptores de las células y las lectinas varía de célula a célula (33, 36, 38).

Las primeras células en efectuar el reconocimiento del antígeno son los macrófagos, los cuales engloban al antígeno, lo procesan para

Tabla 1. FACTORES DE CRECIMIENTO LINFOCITARIO.

Factores de crecimiento	Localización cromosómica	Número de exónes
M-CSF	5q33.1	10
G-CSF	17q21-q22	5
GM-CSF	5q21-q31	4
IL-1	2q13-q21	?
IL-2	4q26-q28	4
IL-3 o Multi-CSF	5q	?
IL-5	5q31	4
IL-6	7p21-p15	5
Interferón	12q24.1	?

Tomado de Nicola 1989 (39).

posteriormente desplegar en su membrana determinantes antigenicos que interactúan con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II, dando inicio así al proceso inmunológico como se muestra en la Fig. 1 (2, 34, 37). El antígeno puede ser reconocido por células T auxiliares (TA) o linfocitos T citotóxicos (TC), una vez iniciado el reconocimiento entre el macrófago y el linfocito TC o el macrófago y el linfocito TA, se inicia la fase de síntesis de factores de crecimiento celular, que inducirán la diferenciación y maduración de distintas estirpes celulares (18, 27).

En 1976 se reportó que las células T humanas también pueden ser cultivadas sin un estímulo antigénico, hasta por un año, solo adicionando a intervalos regulares un medio que contenga el sobrenadante con la molécula estimuladora (28, 35).

Yong y Halliday en 1982 (57) informaron que en sobrenadantes de cultivos donde hubo proliferación linfocitaria, se presenta una molécula que influye en el crecimiento celular, siempre y cuando exista un estímulo antigénico.

Uno de los primeros factores de crecimiento secretado es la Interleucina-1 (IL-1), la cual es liberada por los macrófagos y otros tipos celulares. Esta IL-1 fue llamada anteriormente Factor de Inhibición de la Migración de los Macrófagos (MIF) (34).

La activación de células T por antígenos o estímulo mitogénico en asociación con IL-1 induce la transición de las células en fase G₀ a la fase G₁ del ciclo celular. La salida de células T de la fase G₀ a G₁ es acompañada por la exposición de receptores de Interleucina-2 (IL-2) sobre la superficie de células T y la secreción de IL-2 (33).

La IL-1 una vez sintetizada actúa sobre los linfocitos TA en presencia de la doble señal constituida por IL-1 y por el antígeno contenido en

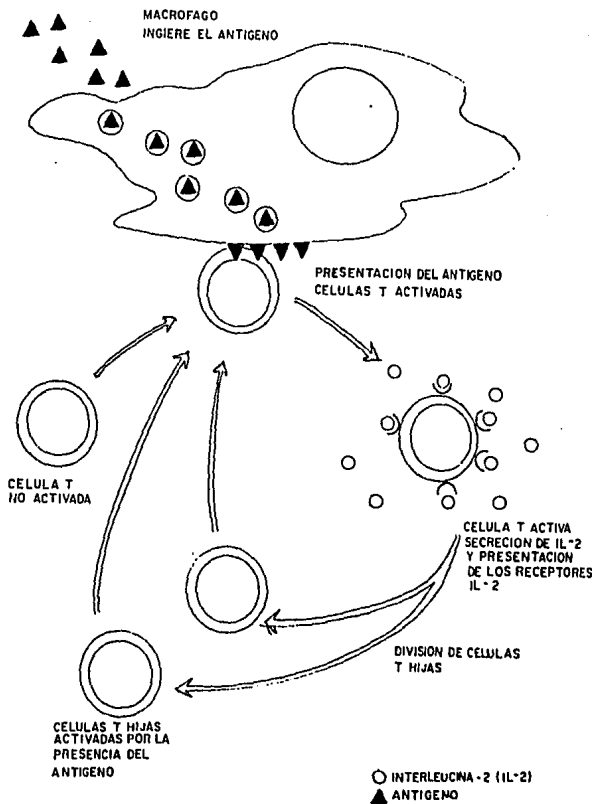


FIGURA 1.

PROLIFERACION DE CELULAS T CONTROLADAS POR IL-2 EN PRESENCIA DEL ANTIGENO (SMITH, 1990)

macrófagos, los linfocitos TA se diferencian y producen IL-2 y esta a su vez provoca la secreción "en cascada" de varias interleucinas y estimula la producción de la misma en algunos linfocitos TA que actúan sobre linfocitos B inductores de anticuerpos (7, 18, 33).

En caso de estimulación por un antígeno, se observa el receptor durante una decena de divisiones después de la presentación de aquel. Una vez secretada la IL-2 por las células TA, migra hacia las mismas TA que le dieron origen (retroalimentación positiva) las cuales han iniciado su proliferación (7, 18).

La IL-2 es requerida para la proliferación de células T, su acción es dependiente de la unión de la IL-2 a receptores específicos para ella, sobre la superficie de células sensibles. La unión de la IL-2 a sus receptores sobre la superficie de células T induce a las células a continuar en el ciclo celular (33).

Taniguchi y cols en 1983 (48) fueron los primeros en descubrir y caracterizar la Interleucina - 2. Esta modula la efectividad de una respuesta inmune. Se ha demostrado que la IL-2 aumenta la proliferación y generación de células citotóxicas y poblaciones de células T estimuladas por antígenos, este proceso a su vez provoca la síntesis de interferón gamma (IFN γ). También es capaz de contribuir a producir una segunda señal para la activación de células TA antígeno-específicas. Estas actividades pueden ser secundarias a un proceso de activación de linfocitos T (17, 35).

ESTRUCTURA DE INTERLEUCINA 2

Se ha demostrado que la IL-2 es una glicoproteína con un peso molecular (PM) de 15 Kd. Mediante la utilización de técnicas de Southern blot, análisis total de ADN humano, y análisis estructural de

los fragmentos clonados obtenidos por Eco R1, se demostró que la Interleucina-2 en una molécula constituida por 133 aminoácidos (aa), los cuales son codificados por un gen que se localiza en el cromosoma 4 en la región q26 a q28. Este gen está constituido por 4 exones y 3 intrones y se encuentra en una sola copia por complemento haploide humano. Presenta cierta heterogeneidad, la cual quizá se deba a modificaciones post-transcripcionales (18, 19, 26). Se han localizado dos regiones de divergencia nucleotídica en la región no codificante en 3', tal divergencia puede representar un polimorfismo genético en esta región del gen (19).

La estructura de la IL-2 es la siguiente: Región I, NH₂ terminal (residuos 1-20); región II, una región interna (residuos 21-65), región III, los residuos de cisteínas (58, 105 y 125); y la región IV, el COOH terminal (residuos 121-133) (26). La delección en la región NH₂ terminal en el aa 20 ó el COOH terminal en el aa 10 resulta en la pérdida del 99% de su bioactividad. La substitución de aa en sitios específicos de estas regiones dan origen a proteínas que poseen 1% de su actividad (26, 29).

La IL-2 presenta una estructura de α hélice, una porción de la molécula forma una estructura de peldaños es ahí en donde se encuentra el sitio de unión de la molécula con el receptor (9).

Ju (26) y Collins (10) demostraron que un segmento corto helicoidal (hélice α , aa 11-19) es esencial para la actividad biológica de la molécula y se requiere esta conformación para la unión con un péptido denominado p75. También demostraron que el aa 20 Asparagina (Asp) es necesario para la unión efectiva de p75. La segunda hélice es una asa extendida, que involucra los residuos 33-56, que a su vez forman un asa intermedia. Estos segmentos son necesarios para el enlace de otro

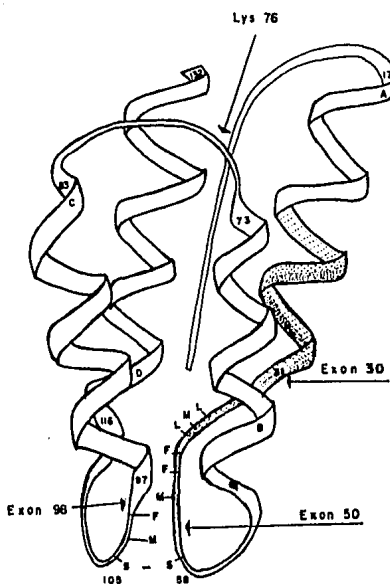
péptido llamado p55. Una α hélice adicional en la región de los aa 107-113, que teóricamente pueden unirse a un péptido adicional del receptor de la IL-2. Finalmente en la región carboxilo terminal de los residuos 131-133 se unen a dos cisteínas (cys 58 y 105) Fig. 2 (9).

Su estructura terciaria se mantiene mediante un puente disulfuro que enlaza dos aa la cys 58 y la cys 105 que son indispensables para la actividad biológica de la molécula. Kuo y Robb (31) usando anticuerpos para regiones específicas de la molécula de IL-2 han demostrado que los residuos 8-27 y 33-54 están involucrados en la interacción del receptor de alta afinidad. Además han sugerido que los aa. 8-25 interactúan con el receptor p75.

En 1978 se demostró que la IL-2 es secretada por linfocitos TA estimulados y que induce la proliferación de todas las células que poseen en su superficie receptores capaces de reconocerla.

Cuando los linfocitos reconocen al antígeno "se activan" al encontrarse con este y expresan el receptor de IL-2.

Este mecanismo involucra receptores de superficie, la IL-2 se une a ellos; estos receptores son de dos tipos: de afinidad baja o bien de alta afinidad, con un peso de 55 Kd (p55) y de 75 Kd (p75) respectivamente (7,18).



INTERLEUCINA - 2

FIGURA 2.

ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA INTERLEUCINA - 2
(COHEN, 1986)

ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE IL-2

Para identificar el receptor de IL-2 se emplearon anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de ratones, a los que se denominó Anti - Tac; con la utilización de los mismos se logró caracterizar bioquímicamente una glicoproteína transmembranal de 55 Kd llamada p55. Warren y cols. (54) demostraron que esta molécula proviene de un precursor peptídico de 33 Kd después de la separación de una secuencia hidrofóbica líder.

Este precursor es N-glicosilado de 35 y 37 Kd para después observarse la forma madura de 55 Kd. Esto hace suponer que los carbohidratos asociados al receptor, son sulfatados y fosforilados sobre un residuo de serina.

A partir de ADN complementario (ADNc) para el receptor de IL-2 humano obtenido de células T infectadas con HTLV -1, se determinó que la secuencia de la proteína madura consiste de 251 aa. Contiene un dominio extracelular de 219 residuos. En el aa 21 se encuentra una señal peptídica para el sitio de glicosilación. Se han identificado residuos de cisteínas en la formación de puentes disulfuro intramoleculares que son requeridos para la unión de la IL-2.

Se encontró un segundo dominio hidrofóbico transmembranal de 19 residuos, donde se evidencia un COOH terminal el cual es una región de unión a la membrana. El tercer dominio es citoplasmático, consta de 13 aa cargados positivamente, los cuales están involucrados en el anclaje de la molécula. En este dominio están presentes aa aceptores de fosfato (serina y treonina).

Utilizando la técnica de hibridación "in situ" se describe que el gen del receptor de IL-2 está localizado en el cromosoma 10, de la región p14 a la p15, el cual está constituido por ocho exones y siete

intrones. En el primer exón se encuentra una señal peptídica y una región no traducida en dirección 5' el exón 2, el cual está localizado hacia las últimas 15 Kb del exón 1, corresponde al primer aa de la proteína madura (52). Utilizando el gen de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se demostró que las secuencias en el extremo 5' del exón 1 contienen la región promotora del receptor de IL-2.

Los exones 2 y 3 codifican los dos sitios de glicosilación; son ricos en serinas y treoninas, lo cual sugiere que pueden contener sitios adicionales de carbohidratos. El exón 2 muestra una homología del 25% de los aa, con el exón 4 incluyendo la conservación de cisteínas, prolinas y residuos de triptofano sugiriendo un evento de duplicación génica en esta región.

Los exones 5 y 6 corresponden a la región del receptor localizada en el exterior de la membrana y los 2, 5 y 6 poseen secuencias de serinas o treoninas, y ellos contienen sitios de adición de carbohidratos. El 7 contiene la mayor parte del dominio transmembranal. Otra parte del 7 y 8 codifican para el dominio citoplasmático, el cual es de 13 aa de longitud, contiene 6 aa cargados positivamente que tal vez sirvan como anclaje citoplasmático. La parte final del exón 8 codifica la región 3' no traducida, incluyendo las tres señales de poliadenilación.

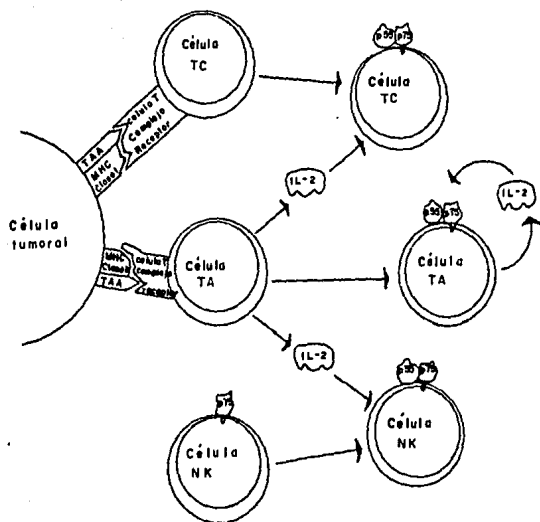
Con estudios de marcaje y entrecruzamiento se demostró la presencia de un nuevo péptido de 68 Kd - 70 Kd (p75) con una afinidad intermedia para la IL-2. Sharon y cols. (44) apoyaron estos hallazgos, ya que también encontraron que todas las líneas celulares que analizaron presentaron receptores de baja o intermedia afinidad es decir, p55 o p75, mientras que los de alta afinidad dependían de la presencia de los dos receptores.

Waldman (52) propone un modelo de multisubunidades para el receptor de alta afinidad, en donde existen independientemente los dos péptidos p55 (TAC) y p75 los cuales crean baja y mediana afinidad; mientras que el de alta es creado cuando ambos se expresan y se asocian en forma covalente en un receptor complejo. Sharon y cols presentan un modelo similar (45).

Dukovich y cols (13) identificaron p70-75 en la ausencia de Tac sobre la superficie de células B. Robb y cols (42), Teshigawara y cols (49) realizaron estudios similares.

La expresión de los receptores de alta afinidad se inicia por su interacción con el antígenos. El antígeno unido en presencia de macrófagos estimulados por IL-1 o IL-6 induce la síntesis coordinada, la secreción de IL-2 y la expresión de receptores de alta afinidad. La continua activación del receptor de células T está asociada con un incremento en el Ca^{++} intracelular, activación del ciclo fosfoinositol y el transporte de la protein kinasa "C" del citoplasma a la membrana Fig. 3 (7, 20, 27, 32, 40, 52).

Utilizando estudios de entrecruzamiento con IL-2 marcada Herrman (23) Diamanstein (11), Saragovi y Malek (43) presentaron evidencias para un péptido en ratón de 90-100 Kd asociado con p75 y p55. Estos autores proponen a un tercer péptido asociado con p55 y p75 en el receptor de alta afinidad. Utilizando entrecruzamiento, e IL-2 marcada para la línea EL-4 del ratón, obtienen una cadena de 100 Kd. Estos estudios sugieren que hay tres péptidos de unión para la IL-2 (p55, p75 y p90-100) y se asocian en un receptor de multisubunidades para formar el receptor de alta afinidad. Utilizando anticuerpos monoclonales (Anti-TAC) marcados sobre



Célula TC = linfocito T citotóxico
 Célula TA = linfocito T ayudador
 Célula NK = linfocito natural Killer

FIGURA 3.
 INTERACCION DE LA INTERLEUCINA 2 (IL-2) CON SU RECEPTOR
 (BORDEN, 1989)

membranas de linfocitos humanos después de la activación con PHA, se ha observado que los receptores se presentan dentro de las siguientes 4 - 8 horas, en un número aproximado de 30 000 a 60 000 molécula/célula y permanecen por un lapso de 48 a 96 horas después de la activación con el mitógeno. El ARNm de Tac es evidente después de 4 horas de activación con PHA, teniendo un pico a las 8-12 horas. Estos datos sugieren que la respuesta inmune de células T dependientes de IL-2 puede ser regulada por la cantidad de IL-2 secretada, así como por la magnitud de la expresión de los receptores de IL-2 (7, 35).

Una serie de linfocinas juegan un papel importante en la regulación de la expresión del antígeno TAC. Se ha demostrado que la IL-1 es requerida para la expresión del receptor para IL-2 en una clona de células TA (46).

Yodoi y cols (56) han identificado un factor derivado de células T leucémicas de adulto (ATL), (ADF) este induce la expresión del receptor de alta afinidad de IL-2.

El péptido p55 es expresado por células activadas en ciertas neoplasias linfoides, enfermedades autoinmunes y en individuos con trasplantes de células T linfotrópicas activas Tipo I (HTLV-I) asociadas a células T leucémicas. Algunas observaciones indican que IL-2 juega un papel en la regulación de sus mismos receptores; la distribución de p55 se ha definido con la utilización de anticuerpos monoclonales (CD 25). Para p75 se empleó IL-2 marcada y entrecruzamiento. p55 se encuentra en timocitos inmaduros, células B activadas, células activadas de monocitos, células rojas Reed - Stenberg del linfoma de Hodgkin; serie macrófagos, células de Kupffer en el hígado, células de Langerhans de la piel, monocitos de sangre periférica estimulados con lipopolisacáridos o interferón γ .

Con base en los resultados de Aguilera Soriano (1), quien en 1991 estableció por medio de electroforesis que la IL-2 está presente en el sobrenadante de cultivos de sangre periférica, encontrando un pico de máxima concentración a las 48 horas de iniciado el cultivo, asimismo demostró, una vez caracterizada la IL-2 que su mayor efectividad es sobre cultivos de sangre periférica cosechados a las 72 horas y otros más pequeños a las 96 horas. Por lo que en el presente trabajo se utilizan estos dos tiempos (72 y 96) de cosecha con el fin de obtener mayor cantidad de metafases, para el análisis citogenético.

OBJETIVOS:

- Determinar el efecto que sobre el Índice Mitótico (IM) se produce al administrar sobrenadante de cultivo de linfocitos de 48 horas de crecimiento que contiene IL-2 a cultivos frescos.
- Comparar el Índice Mitótico (IM) de cultivos de sangre periférica de 72 y 96 horas. de pacientes, con y sin el sobrenadante que contiene IL-2.

HIPOTESIS:

Si el sobrenadante de cultivos de linfocitos contiene IL-2 y este es estimulante del crecimiento celular entonces, al administrar el sobrenadante a otros cultivos linfocíticos , se incrementará el Índice Mitótico (IM).

HIPOTESIS NULA (H₀):

Al administrar el sobrenadante conteniendo la IL-2 a los cultivos, no se incrementará el Índice Mitótico (IM).

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION DEL SOBRENADANTE QUE CONTIENE LA IL-2

Se extrajeron con una jeringa heparinizada 10 ml de sangre periférica obtenida de un individuo sano, (sin antecedentes de infecciones virales o bacterianas anteriores, no fumador, no bebedor), joven, voluntario. Los cultivos de sangre periférica se sembraron siguiendo la técnica de Arakaki y Sparks (3) para la siembra y Moorhead y cols (39) para la cosecha, con algunas modificaciones.

En 4 frascos estériles se adicionó a cada uno:

- 0.50 ml de fitohemaglutinina (PHA), (Microlab, Méx.)
- 0.2 ml de estreptomocina-penicilina (10 UI/ml, 20 µg/ml).
- 2 ml de suero fetal de ternera (SFT), (Microlab, Méx.).
- 8 ml. de medio Mc Coy 5a Modificada (Gibco, Grand Island Biological Company, N.Y.).
- 2ml de sangre periférica
- Se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

EXTRACCION DEL SOBRENADANTE

A las 48 horas de iniciado el cultivo se separó el sobrenadante de los 4 frascos con una jeringa estéril y se procesó de la siguiente manera:

- Se centrifugó a 1500 rpm. durante 10 min.
- Se separó el sobrenadante del paquete celular, el cual se pasó por filtro Millipore con una apertura de 0.22 µm (filtro de jeringa estéril, Millipore Filter Corp., Bedford, Mass., U.S.A.
- Una vez filtrado se guardó en frascos estériles y se congeló a -20 °C, para ser utilizados posteriormente.
- La obtención y la extracción del sobrenadante se realizaron en condiciones de esterilidad.

UTILIZACION DEL SOBRENADANTE

Se tomaron 2 ml de sangre periférica a cada paciente, se sembró con la técnica ya mencionada, se trabajaron cuatro frascos por cada paciente, dos se cosecharon a las 72 h y 2 a 96 h. De cada pareja de frascos, uno fue el testigo y el otro el experimental al cual se le adicionaron 0.25 ml de sobrenadante que contiene la IL-2, previamente obtenido.

- A las 24 h de haberse iniciado el cultivo y en condiciones estériles se agregaron 0.25ml del sobrenadante que contiene IL-2 a cada frasco experimental.

COSECHA Y ELABORACION DE LAMINILLAS

- Se adicionó 0.2 ml de colchicina a una concentración de 10 μ l/ml durante 30 min. A cada uno de los dos tiempos.

- Centrifugar 10 min a 1500 rpm

- Eliminar el sobrenadante, agregar 10 ml de solución hipotónica (KCL) 0.75M durante 30 min.

- Centrifugar, eliminar el sobrenadante

- Fijar con Carnoy (Metanol 3:Ac. acético 1)

- Las laminillas se elaboraron tomando con una pipeta Pasteur la muestra y dejando caer una gota sobre un portaobjetos, previamente desengrasado, dejando secar. Se realizaron laminillas del frasco testigo y del experimental de los dos tiempos probados (72 y 96 h).

- Se tiñeron con Giemsa de forma habitual, para la determinación del Índice Mitótico (IM). La tinción se realizó durante 3 min. en la siguiente mezcla: 45 ml. de amortiguador Sorensen pH 6.8 y 5 ml. de colorante Giemsa (Merck).

- Enjuagar la laminilla, dejar secar para su análisis.

DETERMINACION DEL INDICE MITOTICO

- Para determinar el IM se hizo el conteo de núcleos transformados (núcleos grandes, teñidos pálidamente; color rosa), núcleos no transformados (núcleos pequeños, teñidos intensamente; color morado) y metafases, en un total de 3000 células, por individuo y para cada frasco.

VALIDACION DE DATOS.

- Con el fin de interpretar estadísticamente los resultados entre el grupo testigo y el experimental, en los dos tiempos de cultivo, se aplicaron las pruebas de "t de Student" y la "U de Mann-Whitney". Se describen brevemente en el apéndice (I) (5, 53).

RESULTADOS

Se procesaron un total de 28 muestras de sangre periférica de pacientes que llegaron a los laboratorios de Genética, para descartar alguna alteración cromosómica en los tres centros participantes: Centro Medico Nacional (C.M.N.) IMSS, Hospital General "Dr. Manuel Gea González" S.S., Hospital Regional 20 de Noviembre, ISSSTE.

En las tablas 2 y 3 se presentan los resultados de los Indices Mitóticos (IM), así como el incremento en cada uno de ellos, al agregar el sobrenadante se observan los promedios y las desviaciones estándar para el total de la muestra en los dos tiempos de cultivo. Estos aumentos confirman que la IL-2, sí actúa como factor de crecimiento, es decir se obtiene un mayor número de mitosis en los dos tiempos de cosecha (Gráfica 1).

Al aplicar las pruebas estadísticas de "t Student" y la "U de Mann-Whitney, se observa que con ambas los valores obtenidos son estadísticamente significativos (Tabla 4), es decir se apoya la H_a y se rechaza H_0 .

En las figuras 4, 5 y 6 se notan las diferencias de los Indices Mitóticos de los cultivos con y sin sobrenadante, en los dos tiempos de cosecha, en las muestras de los pacientes de los tres centros hospitalarios.

Esto hace evidente que aquellos cultivos a los que se les adicionó el sobrenadante conteniendo la IL-2, tienen incremento importante del Indice Mitótico, lo cual indica que el sobrenadante conteniendo la IL-2 actúa como inductor de la proliferación celular.

Tabla. 2 INDICE MITOTICO PARA LOS CULTIVOS DE 72 H

SIN Sobrenadante	CON Sobrenadante	$\Delta x\%$
1.33	4.12	309.77
0.66	1.81	274.24
0.50	2.17	434.00
1.10	1.94	176.36
0.81	2.82	348.15
0.78	2.88	369.23
0.37	0.82	221.62
1.58	2.69	170.25
1.61	1.44	89.44
1.91	1.30	68.06
1.38	1.69	122.46
0.61	1.02	167.21
0.61	1.00	163.93
2.39	3.23	135.15
2.48	3.18	128.23
1.69	3.17	187.57
2.07	3.33	160.87
2.35	3.13	133.19
0.48	1.17	247.75
0.81	0.92	113.58
0.76	1.45	190.79
0.40	0.63	157.50
1.50	2.13	142.00
1.39	1.56	112.23
0.75	1.10	146.67
1.23	2.80	227.64
1.47	1.70	115.65
\bar{X} = 1.23 D.E. = 0.63	\bar{X} = 2.06 D.E. = 0.94	\bar{X} = 193.26 D.E. = 87.42

\bar{X} = promedio, D.E. = Desviación estandar

$\Delta X\%$ = incremento en porcentaje

Tabla. 3 INDICE MITOTICO PARA LOS CULTIVOS DE 96 H

SIN Sobrenadante	CON Sobrenadante	$\Delta X\%$
1.18	1.63	138.14
0.35	0.61	174.29
0.56	1.16	207.14
1.57	2.56	163.06
0.93	1.43	153.76
0.50	1.31	262.0
0.27	1.74	644.44
1.26	2.27	180.16
1.45	2.10	144.83
1.58	1.80	113.92
1.66	2.4	144.58
0.56	1.25	223.21
0.47	0.94	200.0
2.32	3.47	149.57
2.48	5.87	236.70
2.22	3.26	146.85
2.73	3.95	144.69
2.78	4.03	144.96
1.00	1.59	159.0
2.44	2.80	114.75
1.85	2.19	118.38
0.97	1.90	195.78
2.92	3.11	106.51
2.95	4.15	140.68
1.43	2.34	163.64
1.44	2.43	168.75
1.77	2.13	120.34
2.67	3.30	123.60
\bar{X} = 1.55 D.E. = 0.89	\bar{X} = 2.44 D.E. = 1.16	\bar{X} = 177.99 D.E. = 97.37

\bar{X} = promedio, D.E. = desviación estandar

$\Delta X\%$ = incremento en porcentaje

Grafica 1

Valores de Índice Mitótico para cultivos de 72 y 96 horas

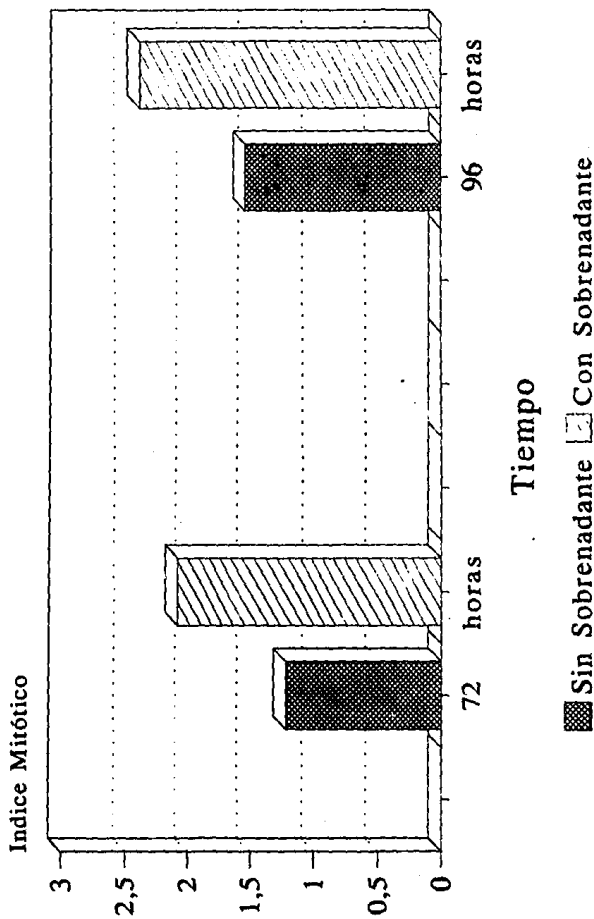


Tabla 4. Comparación de los resultados de las pruebas estadísticas en los dos tiempos de cosecha. "t Student" y "U de Mann Whitney".

	72 Hrs		96 Hrs	
"t"	5.92	p < 0.001	7.35	p < 0.001
"U"	3.37	p < 0.005	2.74	p < 0.01

Indice Mitótico

GEA GONZALEZ

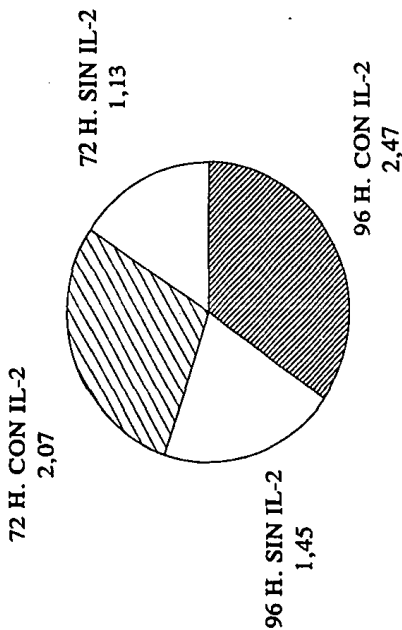


Fig.4 Muestras con y sin sobrenadante a 72 y 96 horas de cultivo.

Indice Mitótico

Centro Médico Nacional

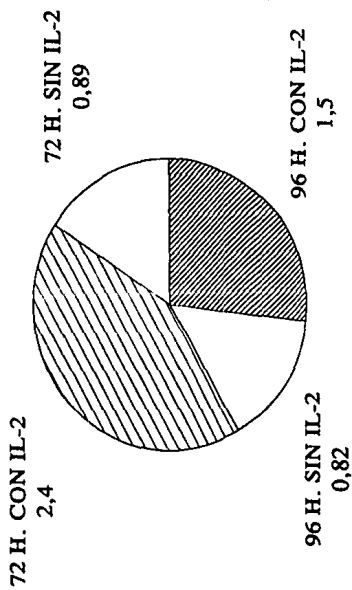


Fig.5 Muestras con y sin sobrenadante a 72 y 96 horas de cultivo.

Indice Mitótico 20 DE NOVIEMBRE

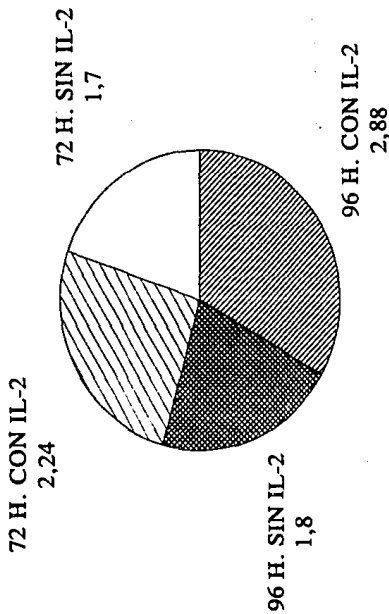


Fig.6 Muestras con y sin sobrenadante a 72 y 96 horas de cultivo.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El cultivo de linfocitos de sangre periférica es la técnica más empleada en citogenética, por la facilidad de obtención del tejido y por el bajo costo; pero en ocasiones no se obtiene la cantidad de mitosis adecuada para realizar el análisis, es decir, no hay suficiente multiplicación celular, lo cual se traduce en pocas o ninguna metafase para realizar el cariotipo. Esto obliga a efectuar una 2a ó 3a toma de muestra, con las consecuentes molestias para el paciente, así como mayor utilización de recursos tanto materiales como humanos, por lo que es necesario contar con un agente que permita la obtención de mas células en metafase para lograr un cultivo de óptima calidad. Una sustancia que reúne estas características, como previamente lo ha mostrado Aguilera Soriano (1) es la IL-2 que actúa como factor de crecimiento de linfocitos T.

Con respecto al empleo de la IL-2 no tiene grandes requerimientos, ya que se obtiene de cultivos de sangre periférica de 48 h, de crecimiento como lo demostró Aguilera Soriano (1), sin embargo a pesar de que no se obtiene pura, ya que el sobrenadante además de IL-2 contiene otros factores de crecimiento, como lo describen Laing y Weiss (32) y Koyama y cols (30) quienes encontraron que además de la IL-2, existen otros factores de crecimiento tales como: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN γ y TNF, por lo cual se puede utilizar como un potenciador de la división celular que ayudara al análisis citogenético, ya que aumenta el número y calidad de metafases (20, 30, 41), estos datos coinciden con los resultados de este trabajo (Tablas 2, 3 y Gráfica 1).

Al probar la IL-2 obtenida en sobrenadante de cultivos de linfocitos

de 48 h de crecimiento y adicionario a cultivos a las 24 h de iniciado este y cosechados a las 72 y 96 h, se comprobó que se puede obtener material con las características necesarias para un buen diagnóstico citogenético (1, 30) este comportamiento coincide con el descrito previamente por Aguilera Soriano (1) y Jurgus y cols (24).

Al comparar los resultados de los centros hospitalarios participantes, en todos los casos se obtiene un mejor IM a las 96 h, Fig. 4, 5 y 6 lo cual implica que posiblemente la IL-2 al actuar sobre los cultivos 24 h mas, en un sistema asincrónico, produce mayor estímulo. No obstante existe el riesgo que al ir aumentando el tiempo de cultivo estos linfocitos no respondan al estímulo mitogénico, ni al de la IL-2, ya que estos al envejecer ya no responden, como lo han señalado Gullberg y cols (22) y Wu y cols (55).

Con la aplicación de las pruebas estadísticas, se observa que existen diferencias significativas, entre el grupo testigo y el experimental, lo cual apoya el hecho de que el sobrenadante que contiene la IL-2 actúa estimulando a los linfocitos T (Tabla 4).

Este factor de crecimiento como se mencionó anteriormente es fácil de obtener y aumenta las posibilidades de lograr cultivos óptimos que aseguren el mejor resultado citogenético, de manera económica y sencilla ya que no es necesario comprar la IL-2 sintética y se puede preparar en el mismo lugar de trabajo.

PERSPECTIVAS DE LA TECNICA

El tipo de pacientes en los que obtendríamos mayores beneficios son los que se encuentran en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCIN), aquellos que por alguna causa en el primer intento no se ha obtenido material y hay que poner atención especial en sus cultivos; inmunodeprimidos, los que requieren de técnicas especiales tales como: Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH). "X" frágil (X Fra) Alta resolución, ya que en estos casos el crecimiento linfocitario es muy deficiente, debido a los reactivos que se utilizan. Otro tipo de pacientes en los que se puede aplicar son, en los que de alguna manera es difícil obtener una 2a muestra; en caso de que no haya crecimiento, como son los pacientes foráneos (es difícil que pueda venir a una segunda muestra), o niños con múltiples malformaciones con venas muy delgadas, pacientes con compromiso hematológico, e incluso médula ósea.

Se propone comparar esta metodología con medio Gibco, ya que este medio presenta mayor control de calidad dando mejores resultados (en la práctica diaria), así como la utilización de IL-2 sintética para determinar la eficacia del sobrenadante obtenido en el laboratorio. En el presente trabajo no se utilizaron estas variables debido a que solo se quería comprobar si este sobrenadante funciona como factor de crecimiento de linfocitos T.

REFERENCIAS

- 1) Aguilera Soriano, F. (1991). Caracterización y efecto de la Interleucina-2 (IL-2) en cultivos celulares de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias U.N.A.M. México, D. F.
- 2) Alberts, B., Brenz, D., Lewis, J., et al. Molecular Biology of The Cell. (1983). Capítulo 17, Garland Publishing, Inc. N.Y. y Londres.
- 3) Arakaki, D. y Sparkes, P. (1963). Microtechnique for culturing leucocytes from whole blood. Cytogenetics 2:57-60.
- 4) Behrman, M., Vaughan, V. y Nelson. (1989) Tratado de Pediatría. Capítulo 15, Ed, Interamericana, 13a edición, México.
- 5) Berenson, M. y Levine, D. Estadística para Administración y Economía. Nueva Editorial Interamericana. 1982, 1a. edición. México.
- 6) Bochner, M., Batuman, O., Hamptman S., Zitron, M. y Smith, J. (1983). Ontogeny of interleukin - 2 responsive in the fetal thymus. J. Immunol. 131:533-535.
- 7) Borden, E. y Sandel, P. (1990). Lymphokines and cytokines as cancer treatment. Cancer 65:800-814.
- 8) Brodie, Ch. y Gelfand, E. (1992). Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. J. Immunol. 148:3492-97.
- 9) Cohen, F., Kosen, P., Kutz, I., Epstein, L., Ciardelli, T. y Smith, K. (1986). Structure-activity studies of Interleukin-2. Science 234:349-352.
- 10) Collins, L., Tsien, W., Seals, C., Hakiwi, J. y Webs, D. (1988). Identification of specific residues of human interleukin 2 that effect binding to the 70 kDa subunit (p70) of the interleukin 2 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7709.
- 11) Diamantstein, T., Osawa, H. (1986). The interleukin-2 receptor, its physiology and a new approach to a selective Immunosuppressive therapy by anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibodies. Immunol Rev. 92:5-27
- 12) Dillman, R., Curtis, Ch., Oldman, R., West, W., Skhwartzberg, L. y Birch, R. (1993). Impatient continuous-infusion Interleukin -2 in 788 patients with cancer. Cancer 71:23-58-2370.
- 13) Dukovich, M., Wano, Y., Thuy, L., Le Thi Bich, T., Katz, P. Cullums, B., kehr, J. y Greene, W. (1987). A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high affinity interleukin-2 receptors. Nature 327:518-21.

- 14) Ebihara, T., Fukao, K. y Koyama, S. (1990). Functional and phenotypic characteristics of recombinant Interleukin-2 or T-cell growth factor- activated splenic lymphoid cells from patients with gastric or hepatocellular carcinoma. *Cancer* 66:923-29.
- 15) Ebihara T. y Koyama, S. (1990). Functional and phenotypic characteristics of effusion-associated lymphoid cells cultured in the presence of either recombinant Interleukin 2 or T- cell growth factor from malignant pleural and peritoneal effusions in patients with advanced carcinoma. *Tonoku J. Exp. Med.* 162:49-63.
- 16) Everson, M., Eldridge, J. y Koopman, W. (1990). Synergism of Interleukin 7 with the thymocyte growth factors Interleukin 2, Interleukin 6 and tumor necrosis factor in the induction of thymocyte proliferation. *Cell Immunol.* 127:470-482.
- 17) Farrar, J., Benjamin, W., Hilfiker, M., Howard, M., Farrar, W. y Fuller, F. (1982). The biochemistry, biology and role of Interleukin 2 in the Induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell response. *Immunol. Rev.* 63:129-165.
- 18) Fradelizi, D. (1986). Los Mensajeros de la Inmunidad. *Mundo Científico* 6:807-815.
- 19) Fujita, T., Takaoka, CH., Matsui, H. y Taniguchi, T. (1983). Structure of the Interleukin 2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7437-41
- 20) Gearing, A., Wadhwa, M. y Perris, A. (1986). In vivo administration of Interleukin - 2 stimulates mitosis in thymus and bone marrow. *Eur. J. Immunol.* 16:1171-1174.
- 21) Golde, D. y Gasson, J. (1988). Hormones that stimulate the growth of blood cells. *Scientific American* 259:62-71.
- 22) Gullberg, M., Ivan, F., Coutinho, A. y Larson, E. (1981). Regulation of cell growth factor production: arrest of TCGF production after 18 hours in normal lectin-stimulated mouse spleen cell cultures. *J. Immunol.* 127:407-411.
- 23) Herrman, F. y Diamantstein, T. (1987). *Immunobiology* 175:145-48. Tomado de 52.
- 24) Jamway, Ch. (1993). How the immune system reconizes invader. *Sci. Am. Special Issue.* Sept 41-49.
- 25) Jurjus, A., Mier, J., Ridgeway, A., Bomhard, G., Herberman, R., Witz, I. y Gallo, R. (1979). *Blood* 54, Suppl. 1, 1729. Tomado de 52.
- 26) Ju, G., Collins, L., Kaffka, K., Tsien, W. y Chizzonite, R. (1987). Structure-function analysis of human Interleukin - 2. Identification of amino acid residues required for biological activity. *J. Biol. Chem.* 262:5723-31.

- 27) Kimura, K., Matsubara, H., Sogoh, A., Kita, Y., Sakata, T., Neshitani, Y., Watanabe, S., Hamaoka, T. y Fujiwara, H. (1990). Role of glycosaminoglycans in the regulation of T cell proliferation induced by thymic stroma - derived T cell growth factor. *J. Immunol.* 146:2618-24.
- 28) Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R., Clark, S., Chan, S., London, R., Sherman, F., Perussia, B. y Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic affects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170:827-845.
- 29) Korner, J., Dettner, R., Kopp, J., Gaestel M. y Malz, W. (1986). Simple preparative-two-step purification of IL-2 from culture medium of lectin stimulated normal human lymphocyte. *J. Immunol. Methods.* 87:185-191.
- 30) Koyama, S., Ebihara, T., Fukao, K. y Osuga, T (1989). Differential activation of lymphokine-activated killer cells with different surface phenotypes by cultivation with recombinant Interleukin - 2 T-cell growth factor in gastric cancer patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 80:150-157.
- 31) Kuo, L. y Robb, R. (1986). Structure-function relationships for the IL-2 receptor system. 1. Localization of a receptor binding site on IL-2. *J. Immunol.* 137:1538-43.
- 32) Laing, T. y Weiss, A. (1988). Evidence for IL-2 independent proliferation in human T- cells. *J. Immunol.* 140:1056-1062.
- 33) Lakhanpal, S. y Handwerker, B. (1986). Stimulation of resting normal human peripheral blood mononuclear cells by fetal calf sera. Activation to an Interleukin - 2 responsive state. *J. Immunol. Methods* 94:197-200.
- 34) Lattime, E., Gillis, S., David, Ch. y Stutman, O. (1981). Interleukin-2, production in the synergic mixed lymphocyte reaction. *Eur. J. Immunol.* 11:67-69.
- 35) Lø Thi Bich - Thuy, H., Clifford, L. y Fauci, A. (1986). Recombinant Interleukin-2 induced polyclonal proliferation of in vitro unstimulated human peripheral blood lymphocytes. *Cell Immunol.* 98:396-410.
- 36) Lindhal - Kiessling, K. (1972). Mechanism of phytohemagglutinin (PHA) action. *Exp. Cell. Res.* 70:17-26.
- 37) Marrack, P. y Kappler, J. (1986). The T cell and its receptor. *Scientific American.* Abril:36-45.
- 38) Mier, J. y Gallo, R. (1981). Purification and some characteristics of human T cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte- conditioned media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6134-38.

- 39) Moorhead, P., Nowell, P., Mellman, W., Battips, D. y Hungerford, D. (1960). Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20:613-616.
- 40) Nicola, N. (1989). Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 58:45-77.
- 41) Packard, B. (1990). Mitogenic stimulation of human tumors infiltrating lymphocytes by secreted factors from human tumor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4058-62.
- 42) Robb, R., Ruck, C., Yodoi, J. y Green, W. (1987). Interleukin 2 binding molecule distinct from the TAC protein: analysis of its role in formation of high affinity receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2002-11.
- 43) Saragovi, H., Malek, T. (1987). The murine interleukin 2 receptor. *J. Immunol.* 139:1918-26.
- 44) Sharon, M., Klausner, R., Cullen, B., Chizzonite, R., Leonard, W. (1986). Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high affinity conditions. *Science* 234:859-63.
- 45) Sharon, M., Siegel, J., Tosato, G., Yodoi, J., Gerrard, T. y Leonard, W. (1988). The human interleukin 2 receptor β chain (p70). Direct identification, partial purification, and patterns of expression on peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 167:1265-70.
- 46) Smith, K., Lackman, L., Oppenheim, J. y Favata, M. (1980). The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* 151:1551-56.
- 47) Smith, K. (1990). Interleukin - 2. *Scientific American* 1262:26-33.
- 48) Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. y Hamuro, J. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin 2. *Nature* 302:305-310.
- 49) Teshigawara, K., Wang, H., Kato, K. y Smith, K. (1987). Interleukin 2 high affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J. Exp. Med.* 165:223-38.
- 50) Urba, S., Forastiere, A., Wolf, G. y Amrein, D. (1993). Intensive recombinant Interleukin-2 and Alpha- interferon therapy in patients with advanced head and neck squamous carcinoma. *Cancer* 71:2326-2331.
- 51) Varesio, L., Holden, H. y Taramelli, D. (1980). Mechanism of lymphocyte activation, II. Requirements for macromolecular synthesis in the production of lymphokines. *J. Immunol.* 125:2810-2817.
- 52) Waldman, T. (1989). The multi-subunit Interleukin - 2 receptor. *Ann. Rev. Biochem.* 58:875-911.

53) Walpolee, R., Myers, R. Probabilidad y estadística para ingenieros. Interamericana, 3a ed. México.

54) Warren, L., Depper, J., Kanehisa, M., Kronke, M., Peffer, N., Svltik, P., Sullivan, M. y Greene, W. (1985). Structure of the human Interleukin-2 receptor gene. Science 230:633-639.

55) Wu, W., Pahlavanı, M., Cheung, H. y Richardson, A. (1986). The effect of aging on the expression of Interleukin - 2 messenger ribonucleic acid. Cell Immunol. 100:224-231.

56) Yodoi, J., Tagaya, Y., Shendo, T., Sugie, K. y Nakamura, Y. (1988). Gann Monogr. Cancer Res. 34:177-89. Tomado de 52.

57) Yong, W. y Halliday, W. (1982). Apparence of three lymphokines in culture supernatans harvested at different times. Immunology Letters. 4:21-26.

APENDICE I

PRUEBA DE WILCOXON DE SUMA DE RANGOS

La Prueba "U" es alternativa no paramétrica de la prueba "t" bimuestral. La prueba "U" también se denomina "prueba de Wilcoxon o prueba de Mann-Whitney".

La prueba de rangos esta diseñada para detectar cualquier clase de diferencia entre los dos grupos: Ubicación, dispersión, forma, o los tres. Las únicas suposiciones necesarias para esta prueba son:

1. Ambas muestras se toman en forma aleatoria, e independientemente de sus respectivas poblaciones.
2. La variable fundamental, aleatoria de interés es continua (para evitar empates).
3. Los datos obtenidos constituyen, cuando menos, un nivel ordinal de medición, tanto dentro como entre las muestras.

Para efectuar la prueba, se deben reemplazar las observaciones en las dos muestras de tamaño n_1 y n_2 con sus rangos combinados (salvo, por supuesto, que los datos obtenidos contuvieran inicialmente los rangos). Los rangos se asignan de la misma manera que se hace en la prueba de Kruskal-Wallis.

Sean n_i ($i=1,2,3,\dots,n$) el número de observaciones en la i -ésima muestra. Primero se combinan todas las K muestras y se arreglan las $n=n_1+n_2,\dots,n_k$ observaciones en orden creciente, sustituyendo el valor apropiado de $1, 2, 3,\dots,n$ a cada observación. En caso de empates (observaciones idénticas), se sigue el procedimiento usual de reemplazar las observaciones por las medias de los valores que las

observaciones tendrian si fuesen distinguibles. La suma de los valores correspondientes a los n_i observaciones en la i -ésima muestra se anota con la variable arbitraria k_i .

La prueba estadística T_{n_1} de la prueba Wilcoxon de suma de rangos es solo la suma de los rangos asignados a las observaciones n_1 en la muestra mas pequeña. Para muestras de tamaño igual, se puede seleccionar cualquier grupo para la determinación de T_{n_1} .

Para muestras de tamaño grande, la prueba estadística T_{n_1} tiene una distribución aproximadamente normal. Por lo tanto, se puede usar la siguiente fórmula de aproximación para muestras grandes para la prueba de la hipótesis nula.

$$Z = \frac{T_{n_1} - \frac{n_1(n+1)}{2}}{\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n+1)}{12}}}$$

y con base en el nivel de significación seleccionado, se puede rechazar la hipótesis nula si el valor de Z calculado cae en la región apropiada de rechazo, según si se tiene una prueba de dos o una cola.

PRUEBA T DE DIFERENCIA APAREADA.

El procedimiento para analizar la diferencia entre las medias de dos grupos cuando los datos se obtienen de muestras que están relacionadas, es decir, los resultados del primer grupo no son independientes de los del segundo. Esta característica de dependencia de los dos grupos ocurre, ya sea porque las observaciones están apareadas según alguna característica o porque se obtienen mediciones repetidas con el mismo

grupo de observaciones. en cualquier caso la variable de interés se convierte en la diferencia entre los valores de las observaciones, mas bien que el de las observaciones en si.

Como se va a demostrar que las dos muestras son diferentes, entonces, se tiene una prueba de dos colas.

$$t_{n_1} = \frac{\bar{D}}{\frac{s_D}{\sqrt{n}}}$$