



11227  
105  
2eg

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES - ZARAGOZA

**LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER**

***Proliferación de LSP en presencia de Medios Condicionados  
de las líneas celulares de CaCu: Calo, InBL, Hela y las  
estirpes ALMe y HaVi***

***Reporte preliminar presentado por:***

*Tesis para obtener título Medicina Interna*  
**DR. CARLOS SANCHEZ GIRON**

TUTORES:

M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA

DR. GERMAN GONZALEZ HIDALGO

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

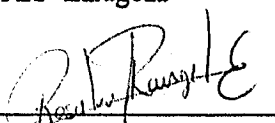
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

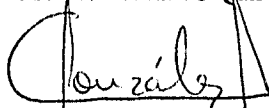
TUTORES:

M. en C. Rosalva Rangel Corona  
Laboratorio de diferenciación celular y cáncer  
FES- Zaragoza



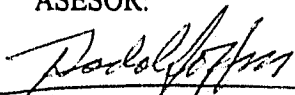
---

Dr. Germán Gonzalez Hidalgo  
Medicina Interna  
H.G. Dr. Fernando Quiróz Gtz.



---

ASESOR:



Dr. Rodolfo Herrejón Miranda  
Medicina Interna  
H.G. Dr. Fernando Quiróz Gtz.

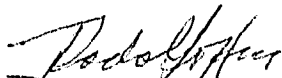
---

I. S. S. Y. E.  
SUBDIRECCION GENERAL MEDICA  
H.G. DR. FERNANDO QUIROZ GTZ.

✦ OCT. 26 1995 ✦

COORD. DE ENSEÑANZA E  
INVESTIGACION

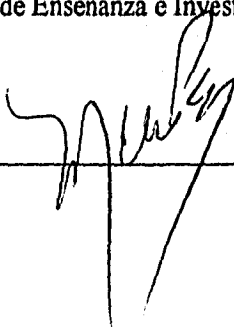
SERVICIO DE ENSEÑANZA  
HOSPITAL GENERAL DR. FERNANDO QUIRÓZ GUTIERREZ.  
I.S.S.S.T.E.



Dr. Rodolfo Herrejón-Miranda  
Jefe del Servicio de Medicina Interna  
Profesor titular del curso de Post-grado, UNAM

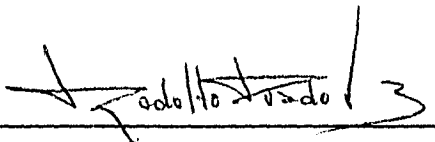
---

Dra. María Eugenia Espinoza Pérez  
Jefe de Enseñanza e Investigación



---

Dr. Rodolfo Prado Vega  
Coordinador de Investigación



---

**Al hombre enfermo,  
primum movens de la profesión médica.  
Con el firme deseo de poder, algún día, aliviar su dolor**

La ciencia, como creía Francis Bacon, tiene la genuina y legítima finalidad de dotar a la vida humana de nuevos conocimientos, y éstos, como pensaba Ernest Renan, deben mejorar la condición humana.

Sin embargo, como ya lo ha reflexionado René Dubos, los progresos de la medicina no se realizan en un vacío social; son el producto de elementos surgidos entre el conocimiento científico de una época determinada y las exigencias de la comunidad; pero ésta última está determinada en gran medida por la publicidad, los estilos de vida creados por el mismo hombre y que integran un ciclo terrible que ya ha sido descrito por Marcus en su teoría del consumismo y la creación de necesidades ficticias por el hombre. Cada sociedad engendra sus propias enfermedades.

Parece que cada individuo tiene su propio concepto particular de salud, aunque en realidad, técnicamente no hay una definición plena y concreta de salud, la cual los médicos pretendemos entender como un equilibrio bio-psico-social, y considerando esta triada, es ya comprensible suponer que depende de muchísimos factores.

La ilusión de que la salud debe ser un derecho innato del hombre es una de las grandes utopías médicas, pues ella dependerá del modo de vida y de la manera en que los hombres respondan a los problemas que seguirán surgiendo de un medio siempre cambiante.

El médico actual ha de tomar del cúmulo de adelantos científicos y tecnológicos que hoy enriquecen a la medicina, aquellos elementos que tengan un valor verdadero en el diagnóstico y/o terapéutica de las enfermedades y que tengan un verdadero efecto favorable en la preservación de la vida y supresión del dolor de los enfermos, teniendo siempre en cuenta uno de los principios médicos fundamentales: "primum non nocere".

La responsabilidad moral del médico, en todas las sociedades, es emplear todos los recursos disponibles para socorrer al enfermo y para preservar la vida; para ello, ha de dejar a veces la cabecera del paciente para ir al laboratorio y ahí buscar el remedio a los males de sus enfermos.

Así pues, el médico (al igual que deben hacer los biólogos y los químicos) debe buscar el trabajo interdisciplinario y el intercambio de conocimientos, para de esa manera aportar nuevos elementos que le permitan satisfacer esa responsabilidad de socorro al enfermo y preservación de la vida.

Las Instituciones encargadas de la formación de médicos, tendrán la responsabilidad de fomentar en sus estudiantes la investigación, elemento importante para el desarrollo de la ciencia médica.

En lo que se refiere al aspecto específico del presente reporte, debo comentar que la Inmunoterapia Adoptiva promete ser un elemento que resolverá muchos problemas de giro inmunológico. El presente trabajo se ha realizado con la intención de comprender mejor algunos aspectos de esta bioterapia con miras a un adecuado control, y así poder aplicarla en un modelo experimental para CaCu.

Por otro lado, deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider por haberme permitido una estancia en su laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer en la FES- Zaragoza, así como también a la M. en C. Rosalva Rangel Corona por su dirección y ayuda.

Carlos Sánchez Girón

## INDICE:

	pag.
1. Introducción .....	1
2. Marco teórico:	
a) Cultivo de tejidos .....	3
b) Sistema inmune .....	5
c) Inmunoterapia .....	6
d) Cáncer cervico-uterino .....	13
3. Justificación .....	16
4. Hipótesis .....	16
5. Objetivos .....	17
6. Metodología .....	18
7. Resultados .....	22
8. Discusión .....	24
9. Gráficas .....	27
10. Apéndices .....	33
11. Bibliografía .....	40

## 1. INTRODUCCIÓN:

Desde tiempos remotos se ha considerado a los trasplantes de tejidos como un posible recurso para sustituir la función de un tejido homónimo perdido o cuya falla impide la adecuada función de un sistema dentro del organismo. Los primeros trasplantes fueron de órganos y se realizaron sin éxito debido al rechazo de los tejidos implantados en el receptor, lo cual implicaba una respuesta inmune a los antígenos de histocompatibilidad en cada uno de los organismos, como se estableció en los experimentos de Medawar, cuyos trabajos posteriormente dieron la pauta para el estudio de sustancias naturales capaces de inhibir la respuesta inmune.

Actualmente se han utilizado factores (recombinantes) de la respuesta inmune y que pueden actuar como moduladores de ella misma. Esto ha permitido conocer la forma de rechazo de células extrañas y alteradas, las cuales adquieren características diferentes a las consideradas normales. Estas células transformadas pueden ser detectadas por el mecanismo de "vigilancia inmunológica" que reconoce y destruye a estas células extrañas; sin embargo es posible que estas células proliferen descontroladamente (evadiendo dicho mecanismo) dando origen a una neoplasia. Una de las técnicas utilizadas para estudiar los mecanismos de escape inmunológico es el cultivo de tejidos que proporciona información valiosa acerca de la biología de células tumorales.



## 2. MARCO TEÓRICO:

### a) Cultivo de tejidos:

Uno de los principales objetivos del estudio de las células en cultivo, es determinar sus funciones y principales actividades (4), así como el interpretar la relación que guarda con su ambiente natural y de esta manera facilitar el entendimiento de las reacciones y procesos biológicos en torno a los cuales se desarrolla y regula su actividad (5).

Por lo tanto, la técnica de cultivo de tejidos es esencial en varias ramas de la investigación, ya que establece las condiciones favorables para el crecimiento, desarrollo y proliferación de las células dentro de medios nutritivos de cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio.

Los estudios iniciales para tratar de mantener células en cultivo se dan a principios del siglo XIX, siendo uno de los problemas esenciales la falta de un medio nutritivo adecuado para el mantenimiento de las diferentes estirpes celulares. En 1941 A. Fisher propuso el uso de un medio de cultivo sintético (44). H. Eagle desarrolló este medio y en 1945 elaboró la fórmula para su medio mínimo esencial, constituido por 15 aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y una fuente de carbono (glucosa), el cual era capaz de sostener la supervivencia y proliferación de ciertas células de mamíferos, sin necesidad de algún tipo de suplemento.

La obtención de un medio de cultivo sintético, dió un gran paso en el avance de las técnicas de cultivo de tejidos, sin embargo, los factores que influyen sobre el crecimiento de los diversos tipos celulares in vivo, quedaron de manifiesto con el cultivo in vitro, lo que dió como resultado el establecimiento de los requerimientos específicos de cultivo dependiendo de la especie celular a cultivar (7). Por lo tanto, se hizo indispensable el uso de un suplemento

que enriqueciera el medio esencial propuesto por Eagle, ya sea con hormonas, metabolitos especiales y, de una manera más general, con el uso de sueros de caballo, fetal de bovino o humano, los cuales proporcionan al medio una gama de importantes promotores del desarrollo celular.

Los sueros son sustancias complejas que han sido poco caracterizadas, aunque contienen muchos factores definidos, los cuales pueden disminuir el crecimiento y diferenciación de algunos tipos celulares. Las hormonas del suero pueden enmascarar, disfrazar, estimular o inhibir los elementos metabólicos bajo estudio. Su presencia, sin embargo, no resulta constante y varía según el lote, lo que debe ser tomado en cuenta cuando se realizan estudios sobre las propiedades de componentes en el medio de cultivo (7).

Las condiciones para la generación de cultivos in vitro, hecha por L. Ham (8), O. Lewis (9), y H. Warren (10), se resumen a continuación:

- \* Sustrato o superficie de crecimiento
- \* Sales inorgánicas en el medio de cultivo, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> disueltos
- \* Variables fisicoquímicas: temperatura (37°C), pH (6.8 a 7.2), osmolaridad, potencial redox y un sistema amortiguador en medio de cultivo.
- \* Nutrientes esenciales para la biosíntesis y el metabolismo, tales como azúcares, aminoácidos, vitaminas, componentes nucleicos y elementos traza.
- \* Factores reguladores y hormonales para la multiplicación celular.
- \* El uso de antibióticos para asegurar la esterilidad del medio (penicilina y estreptomina).
- \* Humedad saturante en el medio de cultivo (10%)
- \* Técnicas de manejo de células durante el cultivo y el subcultivo.

Después de optimizar las concentraciones de los componentes del medio, y las condiciones necesarias para favorecer la fijación y el crecimiento celular, se ha logrado hacer crecer un número variable de líneas celulares a partir de diversos tipos de tejido humano. El tejido conectivo ha sido motivo de estudio por medio de cual se han obtenido líneas celulares de origen sanguíneo, que son de gran importancia desde el punto de vista del buen desarrollo fisiológico de los organismos, me refiero a los leucocitos.

Estos constituyen las células del sistema inmune, las cuales requieren de la presencia de factores de crecimiento o modificadores biológicos (MB) para lograr su proliferación y actividad inmunológica (37, 38).

#### **b) Sistema inmune:**

Todos los vertebrados tienen un sistema inmunitario, el cual representa un sistema de defensa, que se desarrolla mediante el reconocimiento específico y eliminación selectiva de invasores extraños a través de la respuesta inmune (39).

La respuesta inmune tiene las siguientes características:

Especificidad, Diversidad, Memoria, Autorregulación y Discriminación entre lo propio y lo no propio.

El proceso de protección y vigilancia contra invasores extraños en el organismo está compuesto de un complejo de actividades bioquímicas y celulares. La complejidad de este proceso se divide en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. El innato lo protege contra las infecciones y el adaptativo es un sistema dual, que se mantiene a través de dos bases de defensa, que de manera específica responden contra muchas sustancias extrañas, constituido por la inmunidad celular y la humoral.

El sistema inmune esta caracterizado por una diversidad de células que interaccionan entre sí (40); un grupo de éstas se conoce como células accesorias, a las cuales pertenecen los monocitos y macrófagos; estas células se originan en la Médula ósea a partir de un precursor que sufrirá una serie de cambios transicionales que lo llevará a una total maduración (41). El curso natural establecido para el desarrollo de estos blastos se acompaña de cambios en la composición y metabolismo celular así como en su arquitectura. El otro grupo celular que forma al sistema inmune es la familia linfoide, que a su vez se forma de dos poblaciones de linfocitos que comparten características morfológicas, pero que poseen diferentes funciones, ciclos de vida y metabolismo: linfocitos B y T.

La línea de células linfoides se originan a partir de células madres pluripotenciales en la médula ósea. Estas son células hematopoyeticas que se autorepican y son capaces de diferenciarse en células unipotentes comprometidas. Los linfocitos T y B se generan, maduran y accionan dentro de un sistema de órganos y circuitos que constituyen el sistema linfoide.

Durante la respuesta inmune, los linfocitos secretan activamente una serie de sustancias llamadas linfocinas definidas como factores polipeptídicos, diferentes de las inmunoglobulinas, que son secretadas por linfocitos activados y que tienen un gran número de efectos fisiopatológicos sobre reacciones mediadas inmunologicamente. El empleo de estas linfocinas ha permitido el desarrollo de una nueva área de investigación como lo es la Inmunoterapia .

### **c) Inmunoterapia:**

Los enfoques biológicos al tratamiento del cáncer son variados, pero en general pueden dividirse en tres categorías:

- 1) Agentes que aumentan las defensas de hospedero

- 2) Agentes que son directamente tumoricidas, y
- 3) Agentes que modifican la conducta del tumor.

Los agentes que aumentan las defensas del hospedero incluyen las citocinas, tales como: Interferones (INF), Interleucina-2 (IL-2) y Factor de necrosis tumoral (TNF).

Los Interferones, glucoproteínas naturales producidas por leucocitos en respuesta a infecciones virales, no solo poseen una actividad antiviral, sino también antitumoral e inmunomoduladora. IFN- $\alpha$  es secretado por leucocitos, INF- $\beta$  por fibroblastos, y el IFN- $\gamma$  es secretado por linfocitos en respuesta a mitógenos, puede inhibir la proliferación de células infectadas con virus y aumenta la citotoxicidad de células T. IFN- $\alpha$  es el tratamiento de elección en la Leucemia de células peludas, produciendo una respuesta completa en el 50% de los pacientes y parcial en el 90%, además tiene efecto antitumoral efectivo en el carcinoma de células renales, cáncer de ovario, Melanoma, Linfoma folicular y Leucemia Mielógena crónica (32), y recientemente está indicado su uso en el Sarcoma de Kaposi asociado al SIDA.

Por su parte la IL-2 es muy conocida por su actividad mitogénica sobre linfocitos T, liberada por células T estimuladas por antígeno. La IL-2 purificada ha sido usada para activar células NK (del inglés Natural Killer) produciendo las llamadas células LAK (células killer activadas por linfocina), que se caracterizan por tener una mayor actividad lítica sobre células tumorales, sin tomar en cuenta su inmunogenicidad, que las células NK.

Estudios clínicos de inmunoterapia adoptiva con administración de IL-2 y células LAK, han producido algunas remisiones completas y parciales en pacientes con melanoma y cáncer renal avanzados.

Otro de las citocinas utilizada en el tratamiento del cáncer es el TNF, producido y secretado por macrófagos y linfocitos T activados, se ha mostrado que tiene efecto citotóxico directo contra células tumorales, especialmente células del Melanoma en cultivo, también ha mostrado tener una toxicidad similar a la IL-2 in vivo.

En la Inmunoterapia adoptiva celular (IAC), las células del sistema inmune son estimuladas *in vitro* para adquirir propiedades antitumorales y posteriormente son transferidas al huésped para que ejerzan su acción citotóxica. La IAC está basada fundamentalmente en la premisa de que las células malignas expresan Ag de superficie distintos de aquellos presentes en células normales y estos Ag tumorales pueden ser reconocidos por el sistema inmune celular (29).

Tanto en los experimentos animales como en los ensayos clínicos de IAC, se usan células inmunes autólogas que son activadas y expandidas ex vivo y posteriormente se regresan al huésped en forma sistémica, pudiendo usarse en combinación con otros agentes terapéuticos. Este cultivo celular ex vivo requiere manipulación selectiva de la respuesta inmune antitumoral y de las condiciones inmunosupresoras que pueden estar presentes en el huésped.

Las Células empleadas para IAC pueden clasificarse como: específicas y no específicas, por su reactividad contra tumores autólogos; en el segundo caso (no específicas) algunas células pueden ser ampliamente reactivas tanto contra tumores autólogos como para tumores alogénicos, como lo hacen las células Killer activadas por Linfocinas (LAK). Las células sensibilizadas *in vitro* (IVS) son células linfoides cultivadas en presencia de tumor, previo a la transferencia adoptiva activadas con MB.

En los estudios humanos, estas células son obtenidas de sujetos con tumor y se presume que ya han sido sensibilizadas a Ag's tumorales *in vivo*, de manera primaria, de tal forma que el periodo de sensibilización *in vitro* de células linfoides a los tumores autólogos representa una inmunización secundaria.

La sensibilización *in vitro* trata de crear o promover una respuesta inmune antitumoral bajo condiciones controladas, estas condiciones pueden ser manipuladas para producir células linfoides activadas con efectos antitumorales terapéuticos óptimos.

Sin embargo, tales células pueden fracasar *in vivo* para detener el crecimiento tumoral, lo que puede deberse a un número insuficiente de condiciones inmunoregulatoras existentes en el huésped.

La inmunización *ex vivo* implica mecanismos inmunorreguladores y requiere expansión de linfocitos sensibilizados a un número deseable. Esta expansión no siempre se lleva a cabo en los cocultivos para generar células IVS, una posible explicación a este fenómeno podría ser la modificación del sustrato, presumiblemente por condicionamiento del medio por liberación de metabolitos solubles por las células neoplásicas. Tal efecto explicaría el fracaso de la proliferación de linfocitos en algunos bioensayos de inmunoterapia.

En las técnicas empleadas en la IAC ha sido necesario administrar exógenamente citocinas para mantener la actividad lítica de las células inmunocompetentes transferidas. La utilización de citocinas en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos, como rIL-2, rIFN- $\alpha$  o combinaciones de ambos ha proporcionado algunos resultados alentadores, sin embargo, estos tratamientos se han visto limitados por la toxicidad de dichas citocinas.

Para el caso de la IL-2 los efectos colaterales tóxicos de la terapia incluyen: fiebre, diarrea, náusea, rigidez, síndrome pseudo-gripal, letargia y anorexia, con efectos en los sistemas hematológico, pulmonar, renal, hepático y cardiovascular.

Las alteraciones hemodinámicas resultantes incluyen: Hipotensión sistémica, Taquicardia, disminución de la Resistencia Vascular sistémica (RVS), aumento del Índice Cardíaco (IC) y cambios variables de la presión capilar pulmonar en cuña. Estas alteraciones cardiovasculares pueden explicarse, en parte, por el incremento en la permeabilidad vascular capilar y el desarrollo de un síndrome de lecho capilar.

Por otro lado, se han reportado arritmias auriculares y ventriculares asociadas a rIL-2, así como también Angor Pectoris e Infarto agudo del miocardio (IAM), y Miocarditis con infiltración eosinofílica variable la cual se ha demostrado en reportes de autopsia y biopsia

cardíaca.

El rIFN- $\alpha$  también se ha asociado con toxicidad cardiovascular, que incluyen hipotensión sistémica, arritmias y disfunción ventricular izquierda.

Las alteraciones hemodinámicas constituyen el efecto secundario tóxico más importante de la terapia con rIL-2. Cuando se han administrado dosis altas (del orden de  $3 \times 10^5$  U cetus/kg/día) se ha demostrado disminución de la Presión Arterial media (PAM), aumento del IC y de la frecuencia cardíaca (FC), así como disminución de la RVS, sin cambios en la Presión capilar pulmonar en cuña. Se ha visto que la estabilidad hemodinámica y normalización de la PAM se alcanza dentro de 24 a 48 horas después de suspender la administración de rIL-2; sin embargo, se ha encontrado que en algunos pacientes puede persistir una disminución significativa en la RVS por más de 6 días (pudiendo mantenerse hasta por 14 días).

Otro factor que puede tener un papel importante en el estado de hipotensión durante el tratamiento con rIL-2 es el Péptido Atrial Natriurético (ANP), el cual posee propiedades vasodilatadoras y se han encontrado niveles plasmáticos elevados de este péptido en pacientes tratados con rIL-2 que han desarrollado hipotensión.

Existe también una depresión de la función ventricular izquierda, con reducción del porcentaje de la fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF, por sus siglas en inglés), esta caída en la LVEF a pesar de la disminución de la RVS apoya el diagnóstico de una disfunción miocárdica primaria.

Se ha documentado también, elevación de CPK-MB y cambios electrocardiográficos en la onda T, los cuales ocurren en ausencia de enfermedad arterial coronaria e incluso se ha presentado IAM en pacientes con coronarias normales, lo cual puede ser atribuido a la profunda hipotensión que estos pacientes presentan. La miocarditis no infecciosa relacionada



con rIL-2 se caracteriza por infiltrado linfocítico y/o eosinofílico.

A nivel pulmonar se ha documentado congestión intersticial, edema pulmonar, derrame pleural y en algunos casos dificultad respiratoria severa. No es claro el mecanismo exacto del edema, pero puede estar relacionado al incremento en la permeabilidad capilar inducido por la rIL-2.

Los efectos tóxicos del interferon están limitados a la dosis, y se han relacionado más al rIFN- $\alpha$ . Algunos pacientes presentan taquicardia ventricular no sostenida, insuficiencia cardiaca congestiva e hipotensión profunda, esta última puede conducir a paro cardiaco (disociación electromecánica).

Además de sus efectos arritmogénicos y de trastornos de la conducción, puede también ocasionar cardiomiopatía dilatada y muerte súbita. Se ha reportado la instalación de Hipertensión Arterial durante el tratamiento con interferon, sin embargo esto no ha podido ser explicado por ningún resultado, ni *in vitro* ni *in vivo*, en reportes previos (35).

La cardiomiopatía congestiva relacionada con rIFN- $\alpha$  se ha visto con dosis de  $9 \times 10^6$  U/día. Las dosis utilizadas actualmente son del orden de  $10 \times 10^6$  U/día para la Leucemia Mieloide Crónica y de 3 a 5 millones de Unidades tres veces por semana en la Hepatitis C.

A pesar de que es posible activar células inmunocompetentes de pacientes oncológicos *in vitro* por medio de citocinas conservando su actividad al ser transferidas, aun no se ha dado una explicación contundente al hecho de que *in vivo* no se observe actividad antitumoral aun en los casos en que encuentran masas tumorales altamente infiltradas. Ante esta situación han surgido algunas hipótesis para explicar la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales, entre ellas se encuentra la posible existencia de factores inhibidores de la proliferación o actividad lítica producidos por las células tumorales.

#### Factores inhibidores en la proliferación de Linfocitos:

Los mecanismos por los cuales las células malignas evaden el sistema inmune son inciertos, ya que actúan al mismo tiempo una serie de factores complejos entre el paciente y el tumor (42).

Se han planteado algunas hipótesis que sugieren la presencia de factores inmunorreguladores (IRF), que parece ser una familia de glicoproteínas interesantes por su estabilidad a la digestión enzimática y al calor, se piensa que estos IRF con características bioquímicas aún no definidas son los causantes de la inhibición a la proliferación de linfocitos, sin embargo se desconoce su mecanismo de acción.

Entre las hipótesis formuladas se encuentran:

- 1) Los IRF y el mitógeno o Ag puede competir por un receptor común, en la superficie del linfocito, importante en la iniciación de la proliferación que tiene una afinidad superior para IRF que para otras moléculas.
- 2) Simultáneamente, los IRF pueden impedir que el Ag se una a su respectivo receptor por enlace a un sitio cercano pero separado.
- 3) interferencia por IRF con la generación de la señal, en la membrana celular, necesaria para iniciar la proliferación causada por unión de IRF a un receptor separado.

Así mismo, se ha planteado que existen otros factores que pueden intervenir en esta evasión al sistema inmune, entre los que se encuentran algunas sustancias solubles producidas por los tumores y secretadas al medio exterior.

Por otro lado, existen evidencias que demuestran que los sobrenadantes derivados de

algunas líneas celulares tumorales pueden inhibir la proliferación de linfocitos así como la producción de citocinas. Sin embargo, los efectos de esos sobrenadantes sobre la generación de respuesta citotóxica ha sido muy poco estudiada dando como resultado que se conozca poco acerca del efecto tanto **in vitro** como **in vivo** .

No obstante, estudios **in vitro** realizados con líneas celulares tumorales han demostrado que estos factores solubles pueden inhibir la proliferación y capacidad citotóxica de linfocitos en cultivo, fenómeno que se observa incluso en cocultivo de células tumorales con linfocitos.

En líneas celulares de carcinoma de colon se ha mencionado la presencia de un factor soluble en el medio que bloquea la proliferación mitógena de células T, así como la producción de IL-2. Este fenómeno también se ha observado en líneas de otros tipos de carcinomas como RCM-1 y CoCM-1 derivadas de adenocarcinoma colorectal, hepatocelular, melanoma, cáncer pulmonar y sarcomas (35). Sin embargo, no existen reportes de la existencia de este tipo de factores en medios condicionados por células de CaCu.

#### **d) Cáncer cervico-uterino:**

En México el CaCu tiene gran importancia como causa de mortalidad, ya que dentro de las enfermedades neoplásicas de la mujer ocupa el primer lugar, además de tener una alta incidencia en mujeres jóvenes en etapa reproductiva.

Los tumores de cervix se desarrollan de manera gradual a partir de precursores preinvasores que, en un estado **in situ**, reversible, pueden existir por varios años siendo completamente asintomáticos. Las anomalías tempranas conocidas como Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) son diagnosticadas entre los 30 y 40 años de edad, y generalmente

evolucionan a CaCu invasor en un periodo de tiempo variable que puede ser de 8 a 20 años.

En la actualidad se han incrementado los avances en las investigaciones en el campo epidemiológico del CaCu, lo que ha llevado a la aparición de nuevas hipótesis acerca de su etiología. Se ha discutido el papel que juega el cigarro, el uso de anticonceptivos, las deficiencias nutricionales, los factores dietéticos, los hábitos higiénicos así como el comportamiento sexual en el desarrollo de este tipo de neoplasia. Como resultado de estos estudios el CaCu se ha asociado estrechamente con una etiología viral, ya que existen evidencias que han demostrado el patrón de distribución de partículas virales en la superficie celular de este cáncer.

Entre estos agentes involucrados en la transformación, se encuentra el virus del Papilloma humano (VPH), el virus del Herpes simple (VHS) y en menor grado el Citomegalovirus (CMV). De la familia de los Papillomavirus se han clasificado más de 60 tipos en el humano, de los cuales 23 pueden infectar al hombre y a la mujer, pero los más frecuentemente detectados son los VPHs 11, 16, 18 y 31 que están asociados con la transformación de células epiteliales del cérvix, así como las del cuello del utero, lo cual se ha comprobado mediante estudios citológicos e histológicos de tejidos infectados.

Otro de los virus involucrados en la carcinogénesis del CaCu es el VHS tipo II miembro de la familia Herpesviridae humana. Así mismo, se tienen evidencias directas de que el VHS-II tiene potencial oncológico para producir neoplasias en animales, observándose la presencia de Ag's específicos del virus en la membrana de células de tumores cervicales. La mayoría de los estudios actuales consideran que el VPH es el principal agente etiológico del CaCu. Finalmente, la detección del ARN viral en algunos tipos de cáncer y líneas derivadas de CaCu hacen sugerir que para que se manifieste este cáncer debe expresarse continuamente el agente viral.

En conclusión, existen evidencias moleculares como es la presencia de Ag's virales

(VPH y VHS), que apoyan la hipótesis de que muchos compañeros sexuales y una edad temprana de actividad sexual, son factores que pueden contribuir al desarrollo de una neoplasia cervical debido a que el paciente está expuesto a múltiples infecciones genitales. Se ha demostrado que los virus implicados alteran el comportamiento celular mediante la activación de genes celulares por mutación o acarcinogénesis. Por lo que aparecen nuevas proteínas de membrana las cuales pueden ser altamente inmunogénicas.

### **3. JUSTIFICACIÓN:**

Por esta razón, en este trabajo se cultivaron *in vitro* células tumorales, a partir de biopsias de CaCu, para obtener medios condicionados en los cuales se cultivaron LSP de donadores sanos; para determinar la posible existencia de factores inhibidores, midiendo la capacidad proliferativa de los LSP en estos medios.

Se ha elegido CaCu por ser un tumor frecuente en nuestro medio y por el fácil acceso para la obtención de las biopsias.

### **4. HIPOTESIS:**

Existen indicios que indican que algunas células tumorales pueden secretar moléculas que inhiben la activación de linfocitos, escapando de esta manera al reconocimiento inmunológico. Así mismo es sabido que este tipo de moléculas pueden estar presentes en el medio donde fueron cultivadas las células tumorales; por lo tanto, si se cultivan LSP de donadores normales en presencia de medios condicionados, se esperaría encontrar alteraciones en la proliferación de linfocitos.

## **5. OBJETIVOS:**

### **Objetivo general:**

Determinar la influencia de los medios condicionados en la proliferación de linfocitos.

### **Objetivos específicos:**

- 1) Cultivo de células tumorales de CaCu y recolección del medio de cultivo condicionado.
- 2) Cultivo de LSP de sujetos sanos en medios condicionados en presencia de IL-2.
- 3) Evaluación de la proliferación de LSP a intervalos de tiempo de 3 días.

## **6. METODOLOGIA:**

### **Siembra de células tumorales:**

Las muestras de tejido tumoral se transportaron en tubos de plástico de 50 ml de capacidad (Falcon USA) conteniendo medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. USA) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB, Microlab, México) previamente desactivado a 56°C, al cual se le adicionó penicilina 1000 U/ml y estreptomina 1 mg/ml (Lakeside, S.A. México). El transporte se efectuó en un recipiente que contenía hielo.

Antes de procesar las muestras se lavaron bajo condiciones de esterilidad con una solución amortiguadora de fosfatos PBS (Phosphate Buffer solution). A continuación el tejido fue cortado en pequeños trozos y procesado por diferentes métodos de cultivo dependiendo de su consistencia.

#### **a) Método de disgregación mecánica.**

Los fragmentos de tejido se colocaron en un matraz Erlenmeyer para someterlos a lavados intensivos con PBS en un baño de agua a 37°C y con agitación constante, a intervalos de 15 minutos cada lavado hasta obtener la disgregación completa del tejido. Las células que se obtuvieron de cada procesamiento fueron lavadas tres veces con RPMI-1640 mediante centrifugación a 500 g, 5 minutos cada una.

Este método se empleó preferentemente para muestras de consistencia blanda.



b) Método de disgregación por Colagenasa-Tripsina.

Los fragmentos de tejido son lavados inicialmente durante 15 minutos con PBS en un baño de agua a 37°C con agitación constante. A continuación el sobrenadante se desecha por decantación y el tejido restante es sometido a la digestión enzimática con una solución de colagenasa (tipo IV, Sigma Chemical Co. USA) al 0.1% a 37 °C en baño de agua durante 20 a 30 minutos. Después de este tiempo las células en suspensión son aisladas mediante pipeteo, se lavan 3 veces, para finalmente resuspenderlas en 5 ml de RPMI-1640 y posteriormente distribuir las en cajas de petri llevándolas a un volumen final de 5 ml para incubarlas. El tejido restante es sometido a una solución de tripsina (Sigma Chemical Co. USA) a 0.025% durante 30 minutos a 37°C. Este método se empleó cuando la consistencia del tejido era fibrosa.

c) Método de disgregación multienzimática.

Los fragmentos de tejido son lavados inicialmente durante 15 minutos en PBS a 37 °C y agitación constante, luego el tejido es sometido a una mezcla de enzimas compuesta por DNAsa 0.002%, Colagenasa 0.01% y tripsina 0.01% durante 30-60 minutos dependiendo de la apariencia del disgregado. Después de este tiempo, las células contenidas en el sobrenadante son aisladas mediante pipeteo y el tejido restante es sometido a una nueva mezcla enzimática compuesta por DNAsa 0.002%, Colagenasa 0.01%, Hialuronidasa 0.1% durante 30 minutos. Las células obtenidas de cada disgregación son lavadas 3 veces con RPMI-1640. Este método se empleó cuando la consistencia del tejido era muy rígida y fibrosa.

Condiciones de Cultivo:

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

#### Obtención de medios condicionados:

Las líneas celulares derivadas de CaCu llamados: CaLo, InBl y HeLa, fueron cultivadas en cajas de Petri con RPMI-1640 suplementado con suero fetal de bovino (SFB) hasta saturación de sustrato de 75% momento en el cual se recolectó el medio de cultivo; así mismo se obtuvo el medio completamente saturado.

#### Obtención de LSP:

Con una jeringa de 20 ml, impregnada con 0.1 ml de Heparina a concentración de 1000 U/ml, previa asepsia de la región se obtuvieron 15 ml de sangre de una vena periférica de sujetos sanos.

La sangre obtenida se centrifugó a 55 speed durante 10 min., se separó el plasma del concentrado celular, el cual posteriormente fue lavado con volumen igual de RPMI-1640, centrifugándose nuevamente bajo los mismos parámetros, se desechó el sobrenadante y nuevamente se lavó con RPMI. Se resuspendió mediante pipeteo suave para homogeneizar la muestra y se separó en volúmenes de 5 ml que fueron vertidos con mucho cuidado en tubos que contenían 2 ml de Ficoll-Hypaque, posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 1000 rpm; se separa cuidadosamente la capa de leucocitos, situada entre el paquete de eritrocitos y el RPMI. Se lavaron los leucocitos tres veces con RPMI-1640 centrifugándolos por 5 min., a 55 speed.

#### Ensayo de proliferación de LSP con medios condicionados:

Se sembraron LSP en RPMI-1640 en una placa de 96 pozos (de 200  $\mu$ L cada uno), poniendo en cada pozo 30% de MC, 100 U/mL de IL-2, 10% de SFB y 100  $\mu$ L de una suspensión de LSP, fue incubada a 37 GC, en medio ambiente húmedo con 10% de CO<sub>2</sub>. La proliferación de LSP fue evaluada a los 3, 6, 9 y 12 días.

#### Evaluación de la proliferación de LSP:

La proliferación de linfocitos fue evaluada mediante el método de reducción del MTT. Las células vivas reducen enzimáticamente el MTT a Formazan (de color amarillo), el cual es extraído con Isopropanol y posteriormente la solución es leída determinando densidades ópticas (DO) mediante un lector de ELISA, que permite determinar concentraciones muy pequeñas de color, efectuándose lecturas a absorvancias de 570 y 630 nm. Para determinar el número de linfocitos vivos los valores de absorvancia obtenidos se restan y el valor final se interpola en la recta obtenida de una curva patrón elaborada con un número conocido de linfocitos, con MTT, a los cuales se les practica una curva de regresión.

El contenido de los pozos a evaluar se resuspende y se pasa a otra placa de trabajo, se centrifuga a 2500 rpm, durante 10 min., desechando posteriormente el medio. Se lava con 200 µL de PBS; se centrifuga nuevamente y se desecha el medio.

Se agrega MTT a concentración de 0.05% y se incuba 3.5 a 5 hrs. Después de la incubación se centrifuga nuevamente y se agrega Isopropanol agitando suavemente en vortex para lograr homogeneidad de la suspensión, posteriormente se realiza la lectura de la DO en cada pozo; se comparan los resultados con el testigo y se obtiene el número celular.

## RESULTADOS:

Se probaron medios condicionados de 3 líneas celulares (CALO, HELA, INBL) y 2 estirpes de Carcinoma Cervico-uterino (CaCu) de distintas etapas clínicas, denominándolas: HaVi y AlMe.

HAVI fue establecida a partir de una biopsia de NIC obtenida de una paciente de 49 años de edad, del Hospital Fernando Quiróz. ALME es una estirpe proveniente de una biopsia de CaCu etapa clínica II-B, CALO e INBL son dos líneas establecidas desde hace 2 años a partir de biopsias de pacientes con CaCu en etapas clínicas II-B y IV-A respectivamente, y HELA es la conocida línea celular establecida desde los años 50.

Para los ensayos se sembraron 100,000 leucocitos de sangre periférica (LSP) suspendidos en 100  $\mu$ L de RPMI-1640 en cuatro columnas (que correspondían a los días de lectura 3, 6, 9 y 12), en cada uno se colocó 30% de medio condicionado (MC) de las líneas y estirpes celulares antes mencionadas (dos pozos para cada medio condicionado). A cada pozo se agregaron: 20  $\mu$ L de IL-2, 20  $\mu$ L de suero fetal de bovino (SFB), en un volumen total de 200  $\mu$ L por pozo; para el control no se usó medio condicionado. La concentración de LSP en la suspensión sembrada fue determinada por hemocitómetro.

Se montaron seis ensayos, de los cuales se excluyeron dos para el análisis estadístico por estar incompletos debido a contaminación de pozos.

La evaluación de la proliferación de LSP se llevó a cabo cada 3 días, mediante el método descrito previamente, de reducción del MTT. Se determinaron Densidades Ópticas (DO) a 570 y 630 nM y el número de LSP se calculó de la siguiente manera:

$$DO\ 570 - DO\ 630 = \text{no. de células vivas}$$

El valor obtenido se extrapola en una curva de regresión con valores conocidos (figura 1).

En todos los ensayos se observó proliferación en los LSP utilizados como control, esta proliferación alcanzó el máximo a los seis días de cultivo. El porcentaje de proliferación de LSP en los medios condicionados fue menor en comparación con los controles.

El porcentaje de proliferación de LSP en relación al control, en comparación con el evaluado con los distintos medios condicionados se muestra en la figura 2. En donde la menor proliferación se observó en CALO y ALME, 49 y 50% respectivamente (promedios en el día 6 de cultivo). Para HeLa el porcentaje más bajo de proliferación fue de 58%, esto ocurrió también al sexto día de cultivo, en promedio.

HaVi tuvo un patrón de proliferación muy similar al control, llegando en ocasiones a superar a éste en su número.

La menor proporción en que se encontró disminuída la proliferación de LSP en medio condicionado de INBL fue de 36%.

Los valores de LSP medidos a 9 y 12 días de cultivo fueron considerablemente menores a los obtenidos a los 3 y 6 días, aunque en el control el número de LSP fue mayor a los sembrados (más de 100,000). Después del sexto día observamos una disminución progresiva de la proliferación de LSP en la mayoría de los medios condicionados probados, e incluso en el control en un caso (figuras 3 a 5).

## DISCUSION:

En algunos tipos de tumores, como carcinoma de pulmón, cáncer renal y melanoma, se han encontrado factores inhibidores de la proliferación de LSP, la cual a veces se relaciona con el grado de malignidad del tumor. Esto limita la acción del mecanismo de vigilancia inmunológica y puede ser una forma por la cual las células tumorales la evadan. De hecho, en los pacientes con cáncer se ha visto baja actividad de la citotoxicidad natural así como baja vigilancia inmunológica, lo cual puede ser un factor que contribuya al desarrollo del cáncer o ser consecuencia de la propia neoplasia; también es un hecho conocido que la respuesta inmune contra el tumor es débil y tardía, por lo que no enfrenta exitosamente el crecimiento progresivo del tumor. Es decir, los paciente con cáncer se encuentran inmunodeprimidos, con disminución tanto en su actividad como en el número de células T y B. Así mismo se ha reportado que tienen una baja expresión de antígenos del sistema HLA.

Los linfocitos se activan por el reconocimiento de antígenos en la superficie de la célula blanco, los cuales están asociados con moléculas del MHC y de adhesión como ICAM-1 (moléculas de reconocimiento inmune); ambas moléculas son esenciales en el reconocimiento de células blanco por parte de células T. Existen evidencias de que la alteración en la expresión de estas moléculas puede bloquear el inicio de respuestas antitumorales efectivas, la expresión de moléculas de adhesión o antígenos HLA puede ser regulada positiva o negativamente por citocinas como el IFN y TGF- $\beta$ .

Recientemente se ha reportado que la inmunosupresión puede ser inducida por productos tumorales (metabolitos), agentes físicos, químicos o infecciosos que inducen la transformación maligna de las células. Entre los productos tumorales se encuentra el Factor de transformación del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) el cual es de particular interés por su alta distribución y efectos, se sabe que este factor es secretado en grandes cantidades por varios

tumores, además es un potente inmunosupresor, que inhibe la proliferación de células T y la producción de citocinas a muy bajas concentraciones.

En nuestros resultados pudimos observar disminución de la proliferación de LSP en presencia de MC de pacientes con CaCu. Los resultados demuestran que la proliferación de LSP en dichos medios condicionados está disminuída de manera importante en comparación con el control, siendo mayor este efecto para CALO y ALME.

Los MC de células procedentes de tumores de mayor estadio clínico, como son CALO y ALME con estadio clínico II causaron mayor disminución de la proliferación de LSP.

El MC de HAVI no mostró inhibición de la proliferación sino que, por el contrario, aumenta la proliferación, tal vez debido a su estadio clínico temprano, el cual de acuerdo al reporte histopatológico se trata de un NIC. Por lo que es probable que el grado de inhibición de la proliferación esté en relación con el estadio del tumor, siendo este efecto directamente proporcional (a mayor estadio clínico del tumor, menor proliferación de LSP); además la posible secreción de factores inhibidores de LSP puede estar relacionada con la progresión del tumor ya que de acuerdo a nuestros resultados a mayor estadio clínico se observa una mayor disminución de la proliferación.

Ahora bién, es importante mencionar que a los 7 días de cultivo debe cambiarse el medio en los pozos, ya que de lo contrario los LSP morirían al terminarse los nutrientes y los factores estimuladores, este cambio debe efectuarse con las mismas condiciones iniciales, sin embargo, en estos ensayos creemos que durante el procedimiento perdimos LSP, debido a la centrifugación o por barrido en el momento de retirar el sobrenadante. Consideramos que este punto es crítico y que puede ser un factor que influya en la disminución del número de LSP obtenida despues del día 6 de cultivo. Sin embargo, a pesar del menor número de LSP se observa el mismo comportamiento de proliferación con los distintos medios condicionados; es decir, el patrón de proliferación observado en los días 9 y 12 es muy similar al observado en

los días 3 y 6 sólo que con un número menor de LSP.

Esto nos hace pensar que la pérdida de LSP se debe a un problema técnico al cambiar el medio de cultivo a los 7 días.

De cualquier manera, nuestros resultados sugieren disminución de la proliferación de LSP en los medios condicionados correlacionado con el estadio clínico del CaCu. Es fuerte la sospecha de que este efecto sea producido por un factor que antagoniza con el reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos, posiblemente por modulación en la expresión de moléculas MHC y de adhesión, las cuales son esenciales para el reconocimiento antigénico. En particular pensamos que puede ser TGF- $\beta$ , el cual también puede ocasionar proliferación de ciertos tumores porque este factor no es exclusivamente inhibidor del crecimiento, ya que algunas células tumorales son resistentes a esta inhibición y ocasionalmente pueden ser estimulados a crecer. TGF- $\beta$  promueve la angiogénesis y la adhesión-movilidad de células tumorales, lo cual explicaría la capacidad de metastatizar de las células tumorales en estadios avanzados. Y en este contexto pensaríamos que a través de TGF- $\beta$  la célula tumoral puede evadir el sistema inmune bloqueando la síntesis de adhesinas y/o moléculas de CMH al mismo tiempo que favorece la migración. Sin embargo, no debemos descartar que existan receptores solubles de IL-2 en el MC como se ha reportado para otros carcinomas, que pueden estar capturando la IL-2 (mitógeno de linfocitos) que se adiciona al medio impidiendo de esta manera la activación a la proliferación de los linfocitos.

El siguiente paso en nuestro estudio es determinar la presencia de TGF- $\beta$  en el medio condicionado de las estirpes y líneas celulares establecidas, lo cual se puede lograr por medio de anticuerpos monoclonales dirigidos contra TGF- $\beta$ . De resultar negativa esta prueba se tendría que buscar el factor responsable de la inhibición por medio de una cromatografía del medio condicionado, y probando cada fracción para saber en cual de ellas se encuentra el factor y posteriormente caracterizarlo.



CURVA PATRON PARA LA ESTIMACION DEL NUMERO DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) A DIFERENTES DENSIDADES OPTICAS (DO)

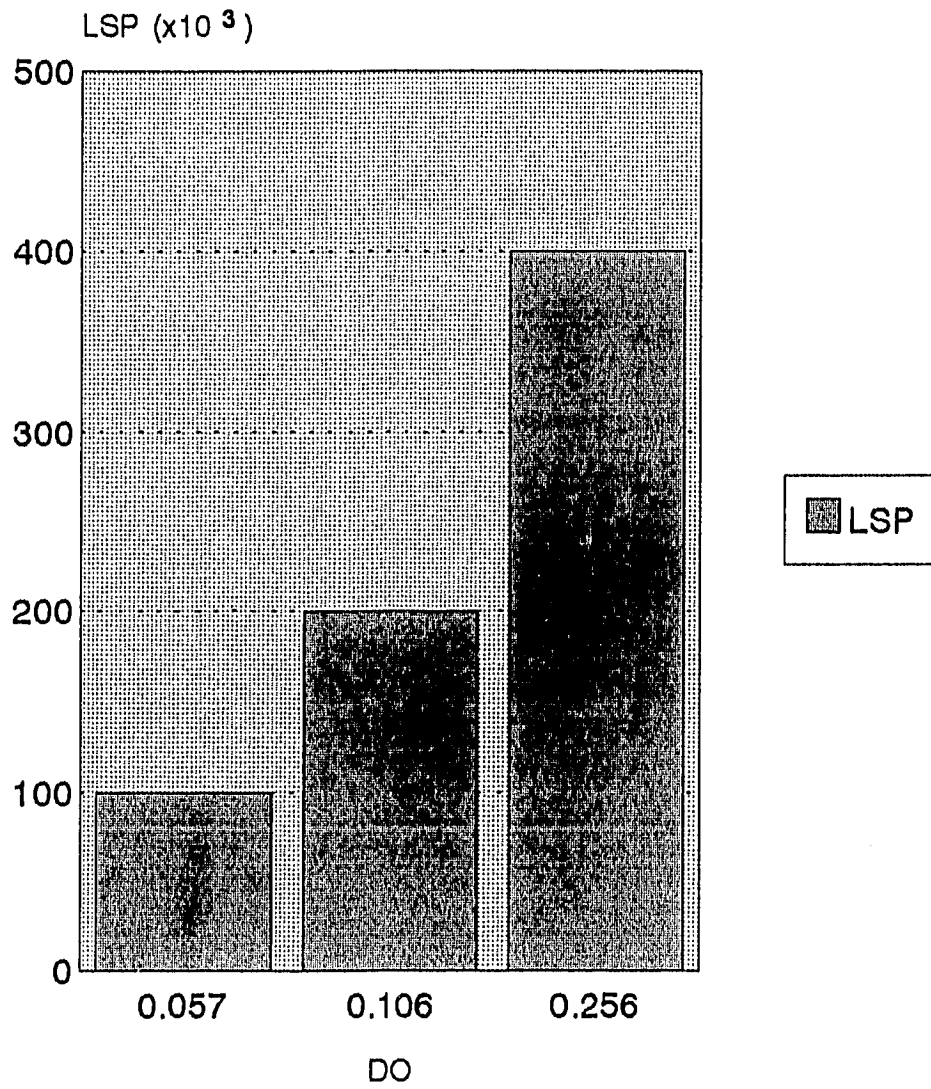


FIGURA 1.

**PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) EN PRESENCIA DE MEDIOS CONDICIONADOS DE LINEAS CELULARES DE cancer cervico-uterino**

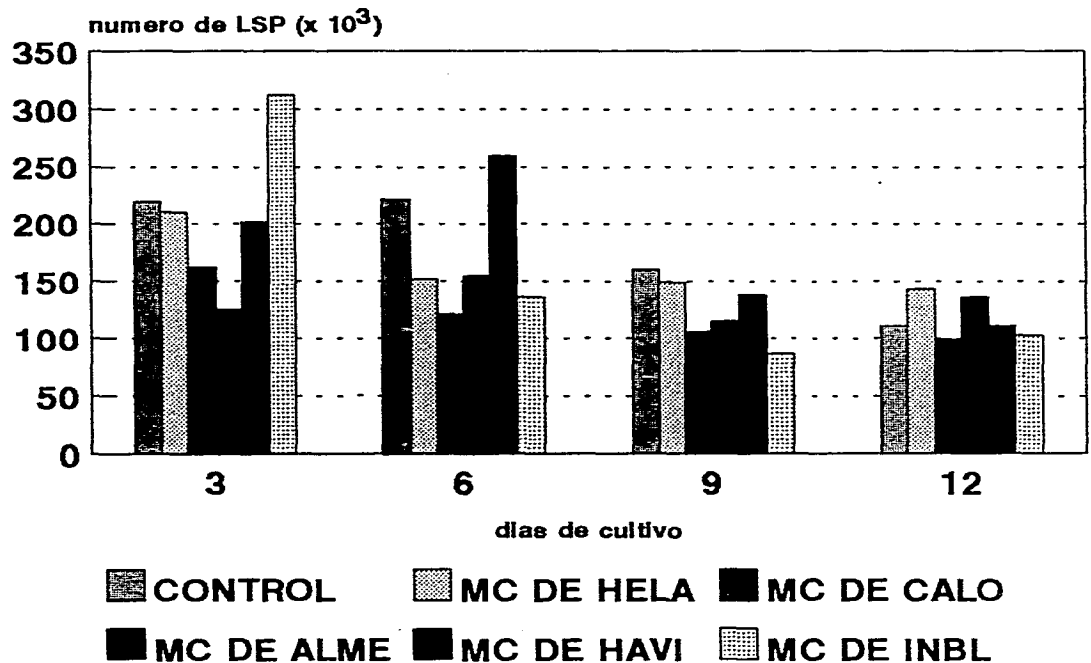


Figura 2

**PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) EN PRESENCIA DE MEDIOS CONDICIONADOS DE LINEAS CELULARES DE CANCER CERVICO-UTERINO**

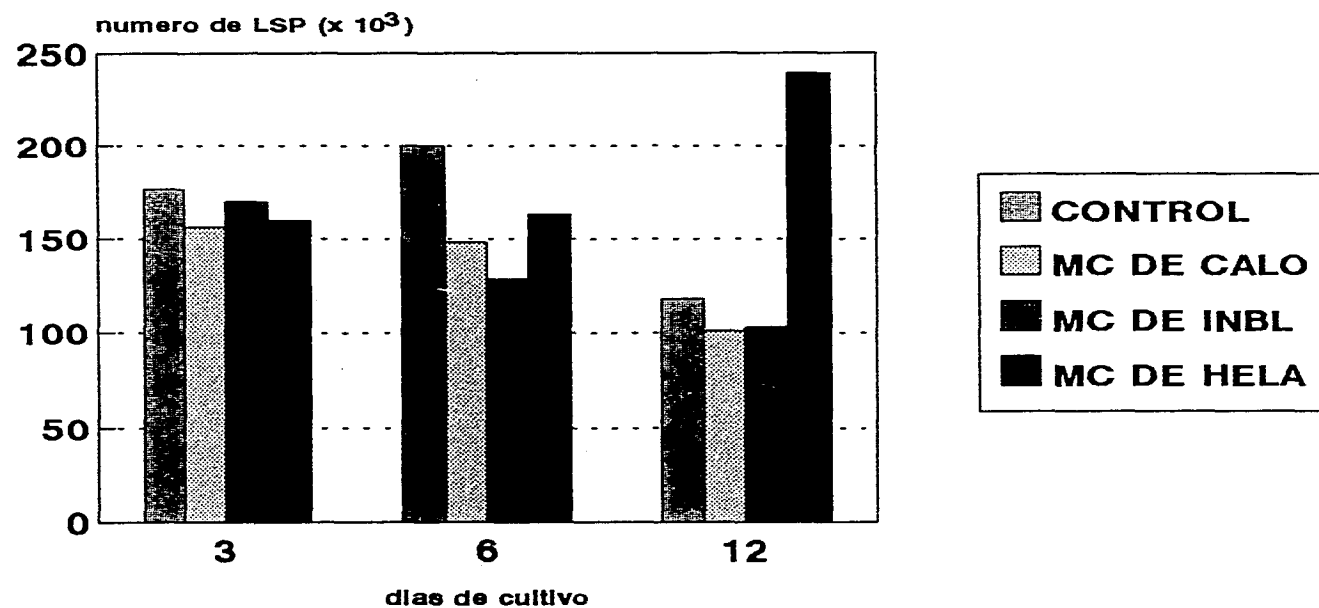


Figura 3

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) EN PRESENCIA DE MEDIOS CONDICIONADOS DE LINEAS CELULARES DE CANCER CERVICO-UTERINO

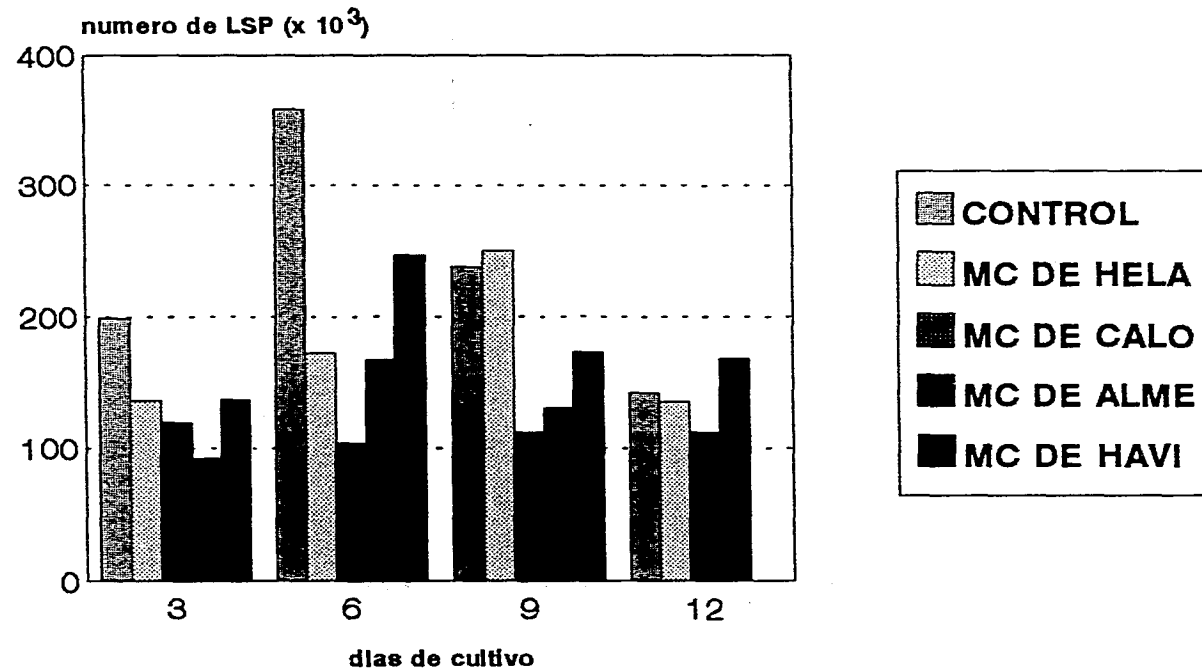


Figura 4

**PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) EN PRESENCIA DE MEDIOS CONDICIONADOS DE LINEAS CELULARES DE CANCER CERVICO-UTERINO**

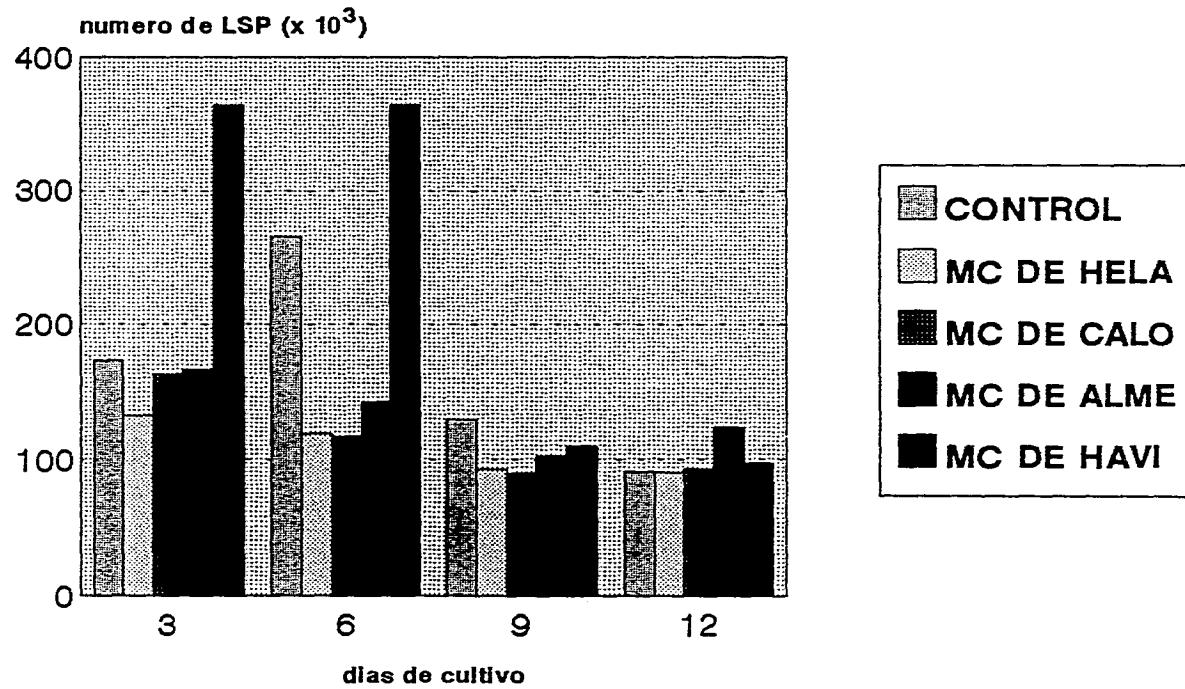


Figura 5

**PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) EN PRESENCIA DE MEDIOS CONDICIONADOS DE LINEAS CELULARES DE CANCER CERVICO-UTERINO**

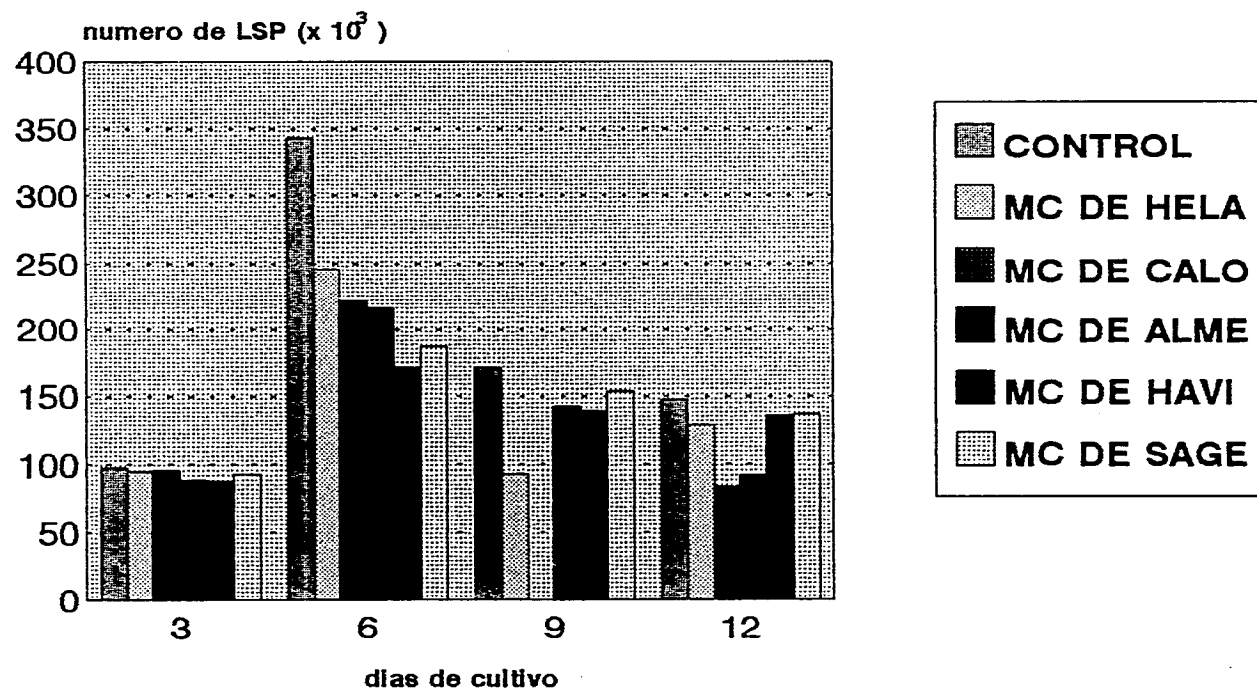


Figura 6

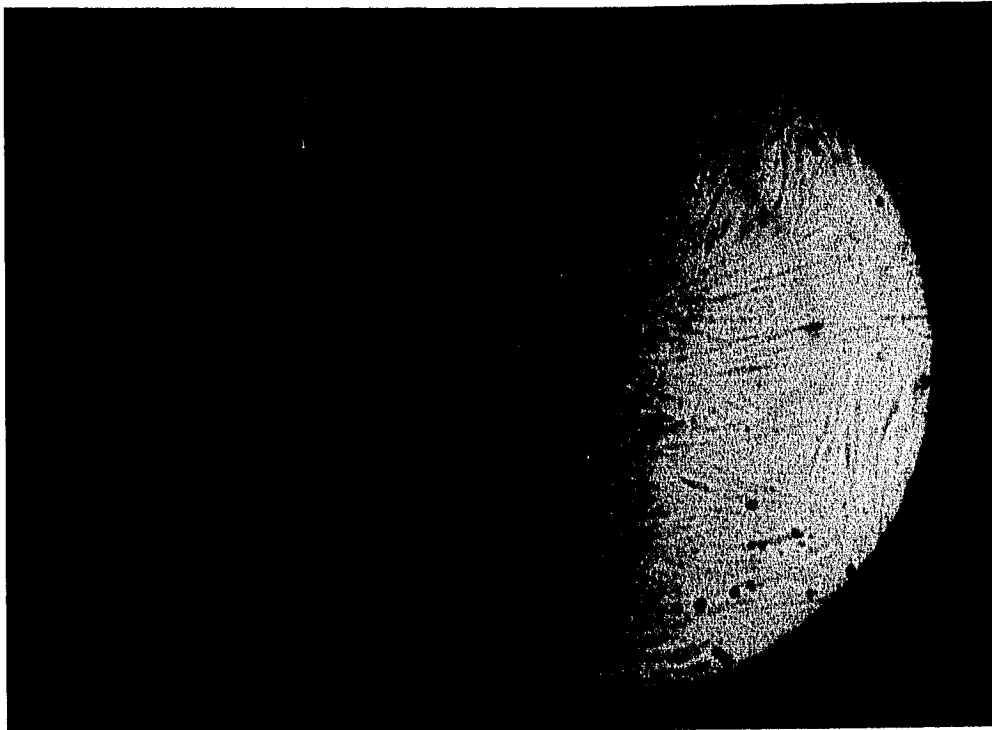


Figura 6.1 : Células de HaVi (NIC), estirpe aislada a partir de una paciente del H.G. Dr. Fernando Quiróz G. Saturación a 75% (microfotog. inv. 10X)

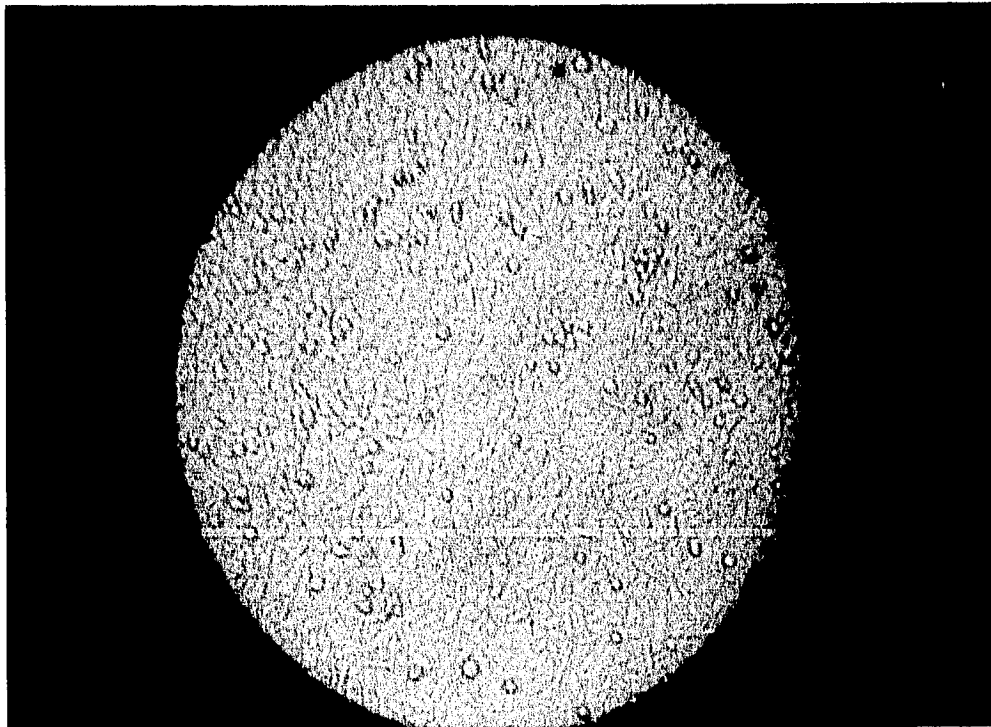


Figura 6.2 : Células InBI (CaCu II-B), creciendo en RPMI-1640, adheridas al fondo del plato de cultivo, característica de los epitelios. (microfotog. inv. 10X).

## 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 Estreptomicina.

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-fenialanina	66.00
L-serina	42.00
L-treonina	95.00
L-triptofano	16.00
L-tirosina (sal disodica)	104.20
L-valina	94.00



Vitaminas :

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

Sales Inorgánicas :

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

Otros Compuestos :

L-glucosa	4500.00
Rojo Fenol	15.00

APENDICE 2

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 contenga 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 filtrándola con membranas de poro de 0.22 micras.

#### COMPOSICION DEL RPMI-1640

Sales Inorgánicas :	Concentración (g/l)
Nitrato de Calcio 4H <sub>2</sub> 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 VERSENO

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

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

Posteriormente se agitan perfectamente los compuestos con el agua y se afora a 1 L con agua bidestilada, ajustándose el pH a 7.7 con Acido Clorhídrico 10 N y se esteriliza en autoclave a 20 lb de presión durante 20 minutos.

### APENDICE 4

#### PREPARACION DE SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

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

Cloruro de sodio	8.00 g
Fosfato de sodio monobásico	2.16 g
Fosfato de potasio	0.20 g
Cloruro de potasio	0.20 g

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

## APENDICE 5

### PREPARACION DE ENZIMAS

#### COLAGENASA

La solución de Colagenasa al 0.05% se prepara disolviendo 0.05 g de Colagenasa Tipo IV (Sigma Chem. U.S.A.) y 0.1 g de Glucosa Anhidra 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 se prepara colocando 0.025 g de tripsina (Sigma Chemical U.S.A.) en 100 ml de verseno, esto se mezcla y se filtra utilizando un filtro millipore de 0.22 micras. Se recomienda colocarla en tubos pequeños y almacenarla a temperatura bajo cero para evitar su autodigestión.

#### HALURONIDASA

La solución de Hialuronidasa al 0.01% se prepara disolviendo Hyaluronidase (Sigma Chem. U.S.A.) y 0.01 g de Glucosa Anhidra en 100 ml de Verseno. La esterilizaciòn y almacenaje son similares a los de la Colagenasa.

#### DNAsa.

La solución de DNAsa al 0.002% se prepara disolviendo DNAsa (Sigma Chem. U.S.A.) y 0.01 g de Glucosa Anhidra en 100 ml de Verseno. La esterilización y almacenaje son similares a los de la Colagenasa.

## APENDICE 6

### Preparación del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difenil tetrazolium (MTT):

El MTT se prepara disolviendo 0.005 g de MTT (Thiazolyl blue, Sigma Chemical U.S.A.), en 1 ml de PBS. Su manejo debe ser cuidadoso ya que es un compuesto tóxico, se recomienda usar guantes durante su preparación, y una vez preparado almacenarlo a baja temperatura y protegerlo de la luz.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abbas Abulk K.; Lichtman, Andrew. Cellular and molecular Immunology; Edit. W.B. Saunders; 1991,
2. Roitt Ivan. Essential Immunology, 7th Edition, Ed. Blackwell Scientific publication; 1991
3. Freshney, R. Ian. Culture of animal cells; 2nd Edition, Ed. Wiley-Liss; 1991.
4. Lerner R.A., Dixon F.J.. El linfocito humano como animal de experimentación. 1973; Sci. Ame.
5. Hayflich L., Morhead. The serial cultivation of human diploid cells strains. Exp.Cell.Res.,1961; 25:585-621
6. Eagle,H.; Nutrition needs of mamalian cells in tissue culture. Science; 122:501-504
7. Davis V., Dulbecco R.; Tratado de Microbiología, Ed. Salvat 1978; 1144-1145
8. Sato G.H. Cell culture and Phisiology. Academy Press. New York, USA, 1982. 45-52
9. Vasiliev J.M., Gelfant, I.M. Neoplastic and normal cells in culture . Cambrige Univ. Press, Gread Britain. 372 pp.
10. Clayson D.B., 1990. The prevention of cancer. Cancer letters. 50:3-9
11. Davis J.R., Aristizabal S., Way, Weiner S.A., Hicks M., Hagaman R.; 1989, DNA ploidy grade and stage in prognosis of uterine cervical cancer. Gynecol. Oncol., 32:4-7

12. De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A.; Cancer: principles and practice of Oncology. 3rd. Ed.; Edit. J.B. Lippincott Co. USA. 1989; pp:149-347
13. Fu Y.S., Reagan J.W., Richart R.M.; 1983. Precursors of cervical cancer. Cancer surv. 2:359-60
14. Fuller A. F., Elliot N., Kosloff C., Lewis J.L.; 1982. Lymph node metastases from carcinoma of the cervix, stage IB and IIA. Implications for the prognosis and treatment. Gynecol. Oncol. 13:165-174
15. Hopkins M.P., Peters III W.A., Andersen W., Morley G.M.; Invasive cancer cervical treated initially by standard hysterectomy. Gynecol. Oncol. 1990; 36:7-12
16. Krupp M.A., Chatton M.J.; Diagnostico clínico y tratamiento; 17a. Edición, Edit. El manual moderno.
17. Lee Y., Wang K., Lin M., Lin C., Lan C., Chuang J., Chen A., Wu C.; 1989. Radical hysterectomy with pelvic lymph node dissection for treatment of cervical cancer. Gynecol. Oncol. 32:135-142
18. Macnab J., Herpes simple and Human Cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancers. J. Gen. Virol., 1987; 68:2525-2532
19. Marinello Z.; Nociones y reflexiones sobre cáncer. Ed. Científico técnica; La Habana, Cuba. pp:189
20. Morrison E., Ho G., Vermund S., Goldberg G., Kadish A., Kelley K., Burk R.; Human Papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. Int. J. Cancer, 1991; 49:6-13
21. Rosenberg S.; Adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. in: De Vita, Hellman, Rosenberg; Important advances in oncology. 1986; pp:55-91
22. Rosenberg S.; A development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2. Ann. Surg., 1987; 208:121-135
23. Rosenberg S., Lotze T., et al. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. Annals of surgery; 1989; 210(4):474-485

24. Rosenberg S., Spiess P., Lafreniere R.; A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*, 1986; 223:1318-1321
25. Waldmann T., Pastan I., Gansow O., Junghans R.; The multichain interleukin-2 receptor: a target for immunotherapy. *Annals of Internal Medicine* 1992; 116:148160
26. Merlin, Sammir A., Lignon D., Ramacci C., Zeghari N., Guillemin F.; MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur. J. cancer*, 1992; 28(8/9):1452-58
27. Owen M.J., Lamb J.R.; *Immune recognition*. 1988. Ed. IRL Press, Oxford.
28. Huaiyuan J., Weiming S., Yuchiro O., Kaoru M., Tomohide T., Nagahiro S.; A new MTT assay for testing macrophage cytotoxicity to L1210 and its drug-resistant cell lines in vitro. *Cancer Immunol. Immunother.* 1992; 35:412-416
29. Topalian S.T., Rosenberg S.A.; Adoptive Cellular Therapy: Basic principles. In: De Vita, Hellman, Rosenberg; *Biologic therapy of cancer*. 1a. Ed. 1991, Edit. Lippincott Co. USA
30. Winkelstein A., Weaver D., Salva N., Machen L.; Interleukin-2-induced lymphoproliferative responses. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1990; 32:110-116
31. Estapé J., Ascunce N., et al; *Oncología Médica* (secc. 8), en: P. Farreras, C. Rozman; *Medicina Interna*. 12a. Edic. 1992, Edit, Doyma, Barcelona, Esp. pp. 112
32. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th. Ed. 1991  
Edit. Mc Graw-Hill, USA. 2(301):1594
33. Darley R., Morris A., Passas J., Bateman W.; Interactions between Interferon- $\gamma$  and retinoic acid with TGF- $\beta$  in the induction of immune recognition molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 1993, 37:112-118
34. Wogelzang P., Blooms S., Mier J., Atkins M.; Chest Roentgenographic abnormalities in IL-2 recipients. *Chest*, 1992; 101(3):746-52
35. Ferrari E., Taillan B., Gibelin P., Fuzibet J.G., Dujardin P., Baudouy M.; Les complications cardiovasculaires de l'Intérferons. *Ann. Cardiol. Angéiol.*, 1992; 41(8):437-41



36. Schechter D., Nagler A.; Recombinant IL-2 and recombinant INF- $\alpha$  immunotherapy cardiovascular toxicity. *American Heart Journal*, 1992; 123(6):1736-39
37. Foa R., Catovsky D.; T Lymphocyte colonies in normal blood, bone marrow and lymphoproliferative disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 1979; 36:488
38. Gelfand E. W., Lee J. W., Dasch H. M., Price G.B.; Human T-cell colony formation in microcultures: analysis of growth requirements and functional activities. *J. Immunol.* 1981; 126:1134
39. Jerne N. K.; The immune system. *Sci. Am.*, 1973; 229:52
40. Fauci A.S., Ballieux R.E.; Antibody production in man. Academy Press, N.Y.; 1979.
41. Boakd J.L., Cristie G.H., Ford W.L., Howard J.G.; Pathways in the development of liver macrophages. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 1968; 169: 307
42. Mieschner S., Whiteside T.L., Careel S., Fliedner V.; Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J. Immunol.*, 1986; 136:1899