

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

PRESENCIA DE LA CADENA  $\alpha$  Y  $\beta$  DEL RECEPTOR PARA INTERLEUCINA 2 (RIL-2) EN CELULAS TUMORALES DE CARCINOMA CERVICO UTERINO (CaCu) Y EL EFECTO PROLIFERADOR INDUCIDO POR INTERLEUCINA 2 (IL-2) EN ESTAS CELULAS TUMORALES; UN POSIBLE MECANISMO DE ESCAPE INMUNOLOGICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA JOSE ANTONIO ALVARADO MORENO

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

EL PRESENTE TRABAJO SI REALIZO EN EL  
LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER DE LA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, U. N. A. M.,  
BAJO LA DIRECCION DE  
LA M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA Y EL DR. BENNY WEISS STEIDER.

DURANTE LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTO CON EL  
APOYO ECONOMICO DE LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL  
PERSONAL ACADEMICO (D. G. A. P. A.), MEDIANTE EL PROGRAMA DE  
BECAS PARA TESIS DE LICENCIATURA CON EL PROYECTO IN211595.

*A Dios...*

***A mis padres:***

***Carmen y Aurón, por su apoyo, cariño y dedicación siempre presentes.***

***A mis hermanos:***

***Enrique † por la humildad que siempre mostraba, su gran entusiasmo ante la vida y su compañía, y a quien hoy dedico mi esfuerzo.***

***Ariuro, por la confianza que depositaste en mí.***

***A Antonieta, por tu cariño y comprensión.***

***A todos mis familiares y amigos con quienes disfruto la vida.***

***A Fernando....***

***Con infinito amor y respeto:***

***Gracias.***

## INDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	3
<b>Marco Teórico</b>	5
Diferenciación Celular y Cáncer	5
Carcinoma Cervico-Uterino	6
Linfocitos Infiltrantes del Tumor	7
Respuesta Inmune	7
Inmunidad Humoral	8
Inmunidad Celular	9
Linfocitos T	9
Expresión de MHC	10
Antígenos	12
Células Presentadoras de Antígenos	12
Receptores de Células T	13
Activación de Células T	13
Interleucina 2 (IL-2)	14
Interleucina 15 (IL-15)	17
Receptor de IL-2 (RIL-2)	22
Cadena $\alpha$ del RIL-2	23
Cadena $\beta$ del RIL-2	23
Cadena $\gamma$ del RIL-2	27
Endocitosis del Complejo RIL-2/IL-2	28
Efecto de IL-2 en Células TumORAles	29
RIL-2 en Células TumORAles	32
<b>Planteamiento del Problema</b>	37
<b>Justificación</b>	38
<b>Hipótesis</b>	39
<b>Objetivos</b>	40
<b>Materiales y Métodos</b>	41
<b>Resultados</b>	52
<b>Discusión de Resultados</b>	71
<b>Conclusiones</b>	82
<b>Bibliografía</b>	83
<b>Apéndice</b>	94

## RESUMEN

Los linfocitos T regulan importantes funciones en la respuesta inmune, como la producción de linfocinas que participan en la respuesta celular entre las que se incluye la Interleucina 2 (IL-2) y la expresión de su receptor (RIL-2). El RIL-2 es un complejo proteico formado por tres cadenas o subunidades:  $\alpha$ -p55,  $\beta$ -p75 y  $\gamma$ -p64, las cuales se expresan unidas no covalentemente en la superficie de linfocitos T, B, NK, macrófagos y monocitos. Recientemente ha sido reportada su presencia en células normales no hematopoyéticas, como células intestinales y células de origen nervioso lo cual demuestra que este receptor no es exclusivo de células hematopoyéticas, ya que se ha reportado la presencia en células neoplásicas tanto en líneas linfoides como en tumores sólidos humanos, entre los que se encuentran los carcinomas de cabeza y cuello, melanoma y mama.

Hasta el momento no se tiene claro el papel que juega el RIL-2 en células tumorales, en particular, nuestro grupo de trabajo propone que la expresión de este receptor puede ser un posible mecanismo de escape inmune ya que a través del RIL-2 las células tumorales pueden competir con los linfocitos por IL-2, impidiendo su proliferación o diferenciación. Con el propósito de esclarecer esta hipótesis en el presente trabajo se emplearon dos líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaCu), denominadas CALO e INBL en las cuales se determinó la presencia del RIL-2 y se evaluó el efecto de IL-2 sobre su proliferación. Se eligió este tipo de tumor por que en México, el CaCu es una de las principales causas de muerte en la mujer, a pesar de considerarse altamente inmunogénico por su asociación con una etiología viral.

Nuestros resultados muestran que ambas líneas celulares responden positivamente y de manera diferencial a bajas concentraciones de IL-2 lo cual parece estar en función directa del estadio clínico. Asimismo, se detectó la presencia de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 en las fracciones de citosol y membrana de la línea INBL, mientras que la línea CALO únicamente presenta la cadena  $\beta$  en ambas fracciones. Además, se demostró que el receptor detectado es muy importante para la proliferación celular sobre todo en INBL, ya que al bloquear los componentes del RIL-2 con anticuerpos

específicos dirigidos contra las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 la proliferación disminuye, lo cual sugiere que las células tumorales parecen volverse dependientes de la citocina sobre todo en estadios terminales. También se demostró que el efecto observado no se debe a la presencia del receptor para IL-15 que puede ser utilizado por IL-2 para inducir activación, tal como se ha reportado en linfocitos, por el hecho de compartir la cadena  $\beta$ .

Por otro lado, debemos mencionar que los datos obtenidos tanto sobre la respuesta a IL-2 como la distribución diferencial del RIL-2 en función del estadio clínico nos permite proponer un posible mecanismo de escape inmunológico de las células de CaCu para evitar ser eliminadas, como sería el competir con los Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) por IL-2 en donde las células tumorales estarían en ventaja ya que requieren una concentración 10 veces menor para proliferar que los LSP para diferenciarse en células citotóxicas. Bajo estas condiciones, en el microambiente tumoral se permitiría el crecimiento de las células cancerosas a expensas de la IL-2 sintetizada por los LSP tempranamente activados.

Finalmente debemos mencionar que los datos obtenidos en este trabajo son de gran interés ya que proporcionan información relevante sobre la biología del CaCu, la cual puede ser empleada para diseñar alternativas terapéuticas para los pacientes que sufren de este tipo de tumor.



## INTRODUCCION

La investigación desarrollada en diferentes áreas del conocimiento, como la biología molecular, ha permitido la caracterización de numerosas proteínas que participan en la proliferación y diferenciación celular. Estas proteínas forman parte de una clase de mediadores intercelulares conocidos como citocinas, que son secretadas en respuesta a estímulos específicos y actúan a través de receptores de membrana modulando el metabolismo celular. Algunas citocinas presentan características antimicrobiales, antivirales o antitumorales, sugiriendo un papel protector en la defensa del organismo contra patógenos infecciosos y enfermedades invasoras. Debido a su gran importancia biológica, algunas de estas citocinas han sido incluidas en protocolos de investigación básica y clínica, para evaluar su eficiencia en el tratamiento de algunos padecimientos como el cáncer, con el propósito de ofrecer nuevas alternativas terapéuticas a los pacientes que lo sufren. Las citocinas actúan como hormonas ya que pueden tener un efecto pleiotrópico sobre diversos tipos celulares en diferentes etapas del desarrollo, pero también tienen efecto autócrino, es decir son producidas y utilizadas por la misma célula, características que son de gran utilidad en la investigación (Kaplan, 1996). Para un mejor entendimiento las citocinas han sido divididas en clases, que incluyen a factores de crecimiento e interleucinas. Las citocinas presentan semejanza en su naturaleza polipeptídica y en su vía de activación celular, ya que al interactuar con su receptor producen cambios metabólicos, inducción de genes y alteraciones estructurales que conducen a una respuesta de proliferación o diferenciación celular (Taniguchi, 1993; Waldmann, 1993).

Por esta razón se ha evaluado el efecto positivo o negativo de ciertas citocinas sobre la proliferación *in vitro* de células tumorales, sin embargo, *in vivo* estos efectos podrían

estar relacionados con un complejo sistema de interacciones celulares, que presenten un efecto sinérgico con otras sustancias para regular la proliferación del tejido tumoral. No obstante, se han utilizado algunas citocinas como Interferón- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) y Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), en la terapia inmunológica, cuyo uso ha permitido retardar la progresión de las enfermedades malignas, en particular la IL-2 ha sido empleada para disminuir la proliferación de células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Debido a esto, es de primordial importancia desarrollar protocolos de investigación básica, con el objetivo de conocer los mecanismos de proliferación y diferenciación neoplásica y esclarecer las posibles estrategias de escape inmunológico utilizadas por las células tumorales para evadir la respuesta inmune (Yannelli, 1991).

## MARCO TEORICO

### DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

La diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula primitiva se convierte en una célula con características fisiológicas y metabólicas específicas. El proceso por el cual una célula especializada pierde sus características fisiológicas y metabólicas se le conoce como desdiferenciación. Debido a esto, se produce una reorientación de los patrones del metabolismo, originando una síntesis continua de ácidos nucleicos, proteínas mitogénicas, enzimas y otras citocinas relacionadas con la proliferación celular, que conduce al desarrollo de crecimientos tumorales originados a expensas de un grupo celular localizado en un área determinada de tejido, con un aumento en el número celular y con una multiplicación progresiva y aparentemente autónoma del control celular (Wyke, 1986).

De acuerdo a su comportamiento, las neoplasias pueden clasificarse en benignas o malignas. Estas últimas llamadas cáncer, a diferencia de las benignas, son grupos de células que crecen invadiendo las estructuras y tejidos circundantes que incluyen vasos sanguíneos y conductos nerviosos. Dado su crecimiento autónomo algunas neoplasias malignas pueden establecer nuevas colonias en distintas partes del organismo, originando un crecimiento secundario conocido como metástasis (De Vita, 1989).

## CARCINOMA CERVICO-UTERINO

El cáncer cervical es considerado en México como un problema de salud pública; ya que es una de las principales causas de muerte en las mujeres mexicanas, registrándose más de 4,000 muertes anuales por esta enfermedad. A pesar de los programas de detección implementados, la incidencia de nuevos casos es muy alta debido principalmente a que las mujeres acuden tardíamente al médico y el tumor es detectado en estadios avanzados (Lazcano, 1996).

En la actualidad se han incrementado los avances en las investigaciones en el campo epidemiológico del cáncer cervico-uterino (CaCu), lo cual ha llevado a la aparición de nuevas hipótesis acerca de su etiología. El cáncer de cérvix tiene un origen multifactorial, en el cual los más importantes factores de riesgo, propuestos o establecidos, indican que está asociado con el uso de tabaco, multiparidad, inicio de relaciones sexuales a temprana edad, higiene genital deficiente, amplio número de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales, dieta deficiente en frutas y vegetales, bajo consumo de vitamina C,  $\beta$ -carotenos y folatos. Asimismo, se ha detectado que el CaCu está asociado estrechamente con una etiología viral, en particular con el Papillomavirus, el Herpesvirus y en menor grado el Citomegalovirus. De más de 80 subtipos de Papillomavirus Humano (HPV), alrededor de 20 de ellos se asocian con infecciones genitales, encontrándose con mayor frecuencia los tipos 16 y 18 que inducen transformación de células epiteliales del cérvix a cáncer *in situ* denominadas NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) e invasor (Brinton, 1992; Pontén, 1995). Debido a su etiología, el CaCu podría ser un buen candidato para ser tratado por medio de inmunoterapia ya que debe ser muy antigénico, lo cual se apoya por el hecho de que estos tumores suelen estar altamente infiltrados por linfocitos denominados TIL.

## LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR

Los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) están presentes en la mayoría de los tumores sólidos humanos localizados de manera intratumoral y peritumoral, constituidos principalmente por linfocitos T (Von Kleist, 1987). Se ha demostrado que los TIL normalmente se encuentran infiltrando todo el tumor. Los TIL obtenidos de carcinoma de mama, renal y melanoma en presencia de IL-2 son capaces de aumentar su actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Baxevanis 1994, Parmiani 1990). La IL-2 ha sido utilizada sola o en combinación en la inmunoterapia adoptiva tanto en animales como en humanos para inducir la regresión del tumores en estudios avanzados estimulando la generación de una respuesta inmune de rechazo tumoral (Rosenberg, 1987).

## RESPUESTA INMUNE

La inmunología es el estudio de la inmunidad, de los eventos celulares y moleculares que ocurren después del encuentro del organismo con moléculas extrañas. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad y su colectiva y coordinada respuesta ante una sustancia extraña constituyen el sistema inmune.

Existen principalmente dos mecanismos inmunológicos para defender al organismo del ataque de microbios, virus, células transformadas y otros agentes extraños; el primero es conocido como inmunidad innata y el otro como inmunidad adquirida o específica. La inmunidad innata, constituye la primer línea de defensa del organismo y en ella participan células fagocitarias como macrófagos, monocitos, neutrófilos y células asesinas naturales (NK), estos tipos celulares destruyen antígenos y células tumorales de manera inespecífica mediante la lisis (citólisis), o inhibición del crecimiento (citotaxis) (Kägi, 1995).

La respuesta inmune adquirida o específica es un componente de un sistema integrado de alta defensa en la cual numerosas células como los linfocitos T y moléculas de membrana funcionan cooperativamente para lisar las células blanco. Esta respuesta utiliza algunos de los mecanismos de la inmunidad natural o innata que son necesarios para eliminar invasores externos y tiene además dos importantes propiedades adicionales:

a) Memoriza cada encuentro con microbios o antígenos externos, de tal manera que el subsecuente encuentro estimula los mecanismos de defensa altamente efectivos inducidos por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y linfocitos T del fenotipo CD45RO.

b) La respuesta inmune específica amplifica los mecanismos protectores de la inmunidad natural, directos o enfocados éstos a los sitios de entrada de los antígenos que son capaces de eliminar.

La respuesta inmune específica se divide en dos tipos la humoral y la celular, de acuerdo a las células que en ella participan (Abbas, 1994).

## **INMUNIDAD HUMORAL**

La inmunidad natural es mediada por linfocitos B, defienden al organismo contra microorganismos extracelulares como infecciones bacteriales y actúan por medio de proteínas secretadas por células B diferenciadas a células plasmáticas, conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), las cuales se encuentran en el plasma sanguíneo y son capaces de identificar y unirse a los marcadores específicos de las células blanco para que sean reconocidas y eliminadas (Abbas, 1994).

## INMUNIDAD CELULAR

El segundo tipo de respuesta inmune específica, defiende al organismo del ataque de hongos, parásitos, infecciones virales y células transformadas. En esta fase los linfocitos T son los encargados de llevar a cabo el reconocimiento y eliminación de las células blanco, mediante la secreción de citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Henkart, 1985; Abbas, 1994).

Independientemente del tipo de respuesta inmune que despierte, ésta se inicia por el reconocimiento de antígenos externos que conducen a la activación de los linfocitos hacia un antígeno específico y culmina con la eliminación del antígeno. La respuesta inmune específica también se puede dividir en fase de reconocimiento, fase de activación y fase efectora (Fig. 1).

- 1) La fase de reconocimiento, como su nombre lo dice, consiste en el reconocimiento por unión de agentes externos a receptores específicos, en linfocitos maduros.
- 2) La fase de activación es la secuencia de eventos inducidos en linfocitos como consecuencia de reconocimiento específico del antígeno, que produce la expansión clonal de linfocitos específicos dirigidos contra el antígeno.
- 3) La fase efectora de la respuesta inmune es el estado en el cual los linfocitos T han sido específicamente activados para eliminar a los antígenos que despertaron la respuesta inmune (Boehmer, 1989).

## LINFOCITOS T

Son células capaces de reconocer específicamente diferentes determinantes antigénicos; su tamaño es de 8-10 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro, con núcleo largo y

densa heterocromatina, un escaso arca de citoplasma que contiene mitocondrias, ribosomas y lisosomas sin organelos especializados. Sus precursores se originan en la médula ósea, migran y maduran en el timo, se subdividen en diferentes subpoblaciones como son; linfocitos T citotóxicos (CTLs) o CD8 y células T auxiliares (Th) o CD4. En respuesta a una estimulación antigénica, las células T auxiliares secretan proteínas hormonales (citocinas) cuya función es la de promover la proliferación y la diferenciación de las células T. B y macrófagos. Los linfocitos T citotóxicos, que son el principal mecanismo de defensa inmunológica contra virus, son importantes en la destrucción de tumores. Para que se lleve a cabo una eficiente respuesta inmune es necesaria la presentación de antígenos a través de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) presentes en la superficie de diferentes tipos celulares (Kägi, 1995).

#### **EXPRESION DE MOLECULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

Los linfocitos CD8 reconocen antígenos externos tales como polipéptidos virales cuando éstos son unidos a la molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I. La capacidad de los CTLs para lisar células infectadas con virus esta en función directa de la cantidad de moléculas de clase I expresadas. Por su parte los linfocitos CD4 reconocen antígenos unidos a moléculas del CMH clase II. La transcripción de los genes que codifican para clase I y II pueden ser modulados por citocinas como el Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y el Factor Necrótico Tumoral (TNF) quienes incrementan los niveles de expresión de estas moléculas. En general las moléculas de clase I están presentes en todas las células nucleadas, mientras que las moléculas de clase II son expresadas por células inmunes activadas y es en el contexto de estas moléculas que se pueden reconocer antígenos (Germain, 1993).



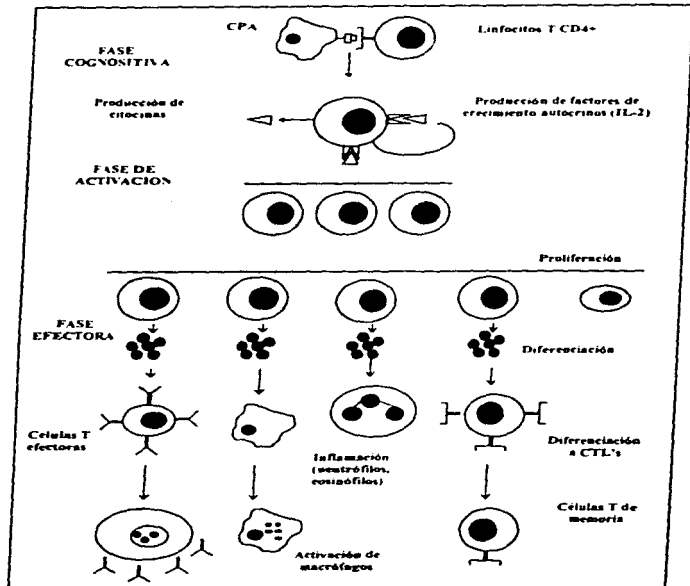


Fig. 1. Respuesta funcional de las células T. Reconocimiento de antígenos por células T (en este ejemplo, una célula blanco CD4<sup>-</sup>) conduce a la producción de citocinas (Interleucina 2), proliferación como un resultado de estimulación autocrina y funciones efectoras (estimulación de células T, activación de macrófagos y promoción de la inflamación y auxilio para la diferenciación de CTL's). Los Linfocitos T Citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL's) muestran un bajo crecimiento autocrino y su principal función efectora es la citólisis. Células Presentadoras de Antígenos (CPA) (Tomado de Abbas, 1994).

## ANTIGENOS

Los antígenos pueden ser definidos como una sustancia o molécula externa del organismo; sin embargo, algunas veces moléculas biológicas como azúcares, lípidos, hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos, complejos de fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas, incluso las propias células pueden despertar una respuesta inmune al ser considerados como antígenos extraños. Para que se lleve a cabo una adecuada respuesta inmune es necesario que los antígenos sean procesados y presentados por células específicas (Abbas, 1994).

## CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENOS

Para que una célula pueda llevar a cabo la función de presentar antígenos debe cumplir dos requisitos básicos; uno de ellos es su capacidad para procesar moléculas extrañas y la segunda es que exprese en su membrana moléculas del MHC clase I y II. Las células presentadoras de antígenos mejor conocidas incluyen fagocitos mononucleares, linfocitos B, células dendríticas, células de Langerhans de la piel y células endoteliales. Los macrófagos y granulocitos fagocitan activamente partículas grandes, derivadas de organismos infecciosos tales como bacterias y parásitos, que son degradados en péptidos más pequeños, los cuales posteriormente son presentados a linfocitos B y T.

Los antígenos presentados a células T CD8, son péptidos comúnmente derivados de proteínas antigénicas que son sintetizadas en las células presentadoras de antígenos y subsecuentemente expresadas en su superficie asociadas a moléculas de clase I, algunos ejemplos de proteínas externas procesadas endógenamente son las proteínas virales y los antígenos tumorales (Guagliardi, 1990).

## RECEPTORES DE CELULAS T

El receptor para células T es un complejo constituido por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales están asociadas no covalentemente con la molécula CD3 compuesta por las proteínas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  y un homodímero  $\zeta$  y  $\zeta$  ó heterodímero  $\zeta$  y  $\eta$ . Este complejo TcR-CD3 es el responsable del reconocimiento específico de antígenos por parte de los linfocitos T. Algunas de las proteínas del complejo regulan la unión específica a moléculas del MHC presentes en las células presentadoras de antígenos o células blanco (Abbas, 1994). Las células T además expresan otras proteínas de superficie celular las cuales son denominadas moléculas accesorias para el reconocimiento, activación y lisis.

Durante el proceso de activación, las células T entran a un programa de activación, iniciando la síntesis y secreción de citocinas entre las que se encuentra la Interleucina 2 (IL-2), asimismo se induce la expresión del Receptor para Interleucina 2 (RIL-2) (Smith, 1980; Waldmann, 1989).

## ACTIVACION DE CELULAS T

La activación de las células T involucra un aumento de su receptor en la superficie celular y la transmisión de una señal dependiente de calcio al núcleo. Esta señal activa la transcripción de varios genes iniciando la diferenciación, proliferación y secreción de citocinas. Aunque la clásica activación de las células T requiere la presencia de antígenos que participan en la inmunidad adquirida e innata, este proceso también requiere y genera citocinas. En particular, la producción de IL-2 y su receptor es muy importante en la activación de células T (Henkart, 1985; Meager, 1991).

Las células T activadas progresan automáticamente a través de varios cambios morfológicos que son detectados después de 12 hrs de la activación. La división celular ocurre entre las 24 y 48 hrs bajo cambios metabólicos y estructurales, sin embargo, los eventos moleculares aparecen durante las 2 primeras hrs y son suficientes para que se inicie la respuesta mitogénica. La entrada de las células a fase S depende de las concentraciones de IL-2 en el medio extracelular y en el número de receptores de esta citocina (Duprez, 1986). La expresión del gene de IL-2 se relaciona con la hidrólisis de fosfatidil inositol, movilización de calcio y fosforilación de proteínas citoplasmáticas y de membrana que aparecen después de 5 min de la señal de activación. Las células T normalmente requieren la activación de proteínas tirosina cinasas (PKC) para la producción de IL-2 (Taniguchi, 1995).

La síntesis de la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-2 tiene lugar aproximadamente 2 hrs después del paso de activación inicial y se incrementa a las 8 hrs, esto da como resultado que se forme un complejo de alta afinidad de los receptores de IL-2, que permiten una eficiente interacción ligando- receptor (Greene, 1986; Meager, 1991).

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

Proteína producida por linfocitos de sangre periférica normales, que induce la proliferación de linfocitos T estimulados con antígeno, además de modular *in vitro* e *in vivo* diversas funciones en células del sistema inmune, inicialmente fue denominada factor de crecimiento de células T (TCGF), factor mitogénico de timocitos (TMF), factor auxiliador de células asesinas o factor coestimulador (KHF), en la actualidad se le conoce como IL-2 (Cosman, 1984; Aggarwal, 1992).

El gene que sintetiza la IL-2 tiene 3662 bases con 3 intrones y está localizado en el cromosoma 4. La IL-2 es una de las primeras linfocinas que fueron identificadas y juega un papel primordial en la expansión clonal de linfocitos T activados, tiene un peso molecular de aproximadamente 15-18 kDa, el cual depende del grado de glicosilación, con un punto isoeléctrico de 6.8-8.2. Es sintetizada como un polipéptido de 153 residuos de amino ácidos (aa). Los primeros 20 aa representan una secuencia señal insertada para producir el factor maduro. La proteína madura contiene 3 residuos de cisteína, dos de los cuales forman una unión disulfuro que es requerida para la actividad biológica. La estructura tridimensional se determinó usando cristalografía de rayos X y se demostró que es una proteína compuesta de un centro compacto de 4 $\alpha$ -hélices paralelas conectadas por tres uniones (Fig. 2) (Mizel, 1989).

Son limitados los tipos celulares que producen IL-2, entre los se encuentran las células T CD4 (Th1) y en menores proporciones las células T CD8 (Coventry, 1996).

La IL-2 promueve la progresión de linfocitos T a través de la fase G1 del ciclo celular incrementando el pH intracelular, induce la expresión de su receptor (RIL-2), de los genes c-Myc, c-Myb, estimula la actividad citotóxica y producción de citocinas en las que se incluye el Interferón- $\gamma$ . También promueve la proliferación de Linfocitos Ganulares Largos (LGL), aumenta la actividad asesina natural NK e incrementa la proliferación de monocitos, células B activadas y células oligodendrogiales y más recientemente se le considera como inmunostimulador del cerebro (Cinacci, 1993; Nistico, 1991).

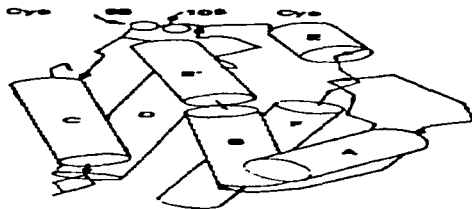


Fig. 2. Modelo esquemático de IL-2 basado en los datos obtenidos por cristalografía de rayos X. Las alfa hélices están representadas como cilindros y están marcados secuencialmente para los amino ácidos terminales (Tomado de Smith, 1988).

Se ha demostrado que la IL-2 puede actuar negativamente en la regulación del crecimiento celular programado de las células T maduras a apoptosis, lo cual sugiere que la IL-2 libera varias señales a través de su receptor en un amplio rango de tipos celulares, vía una interacción con su receptor. (Lenardo, 1991). También se ha demostrado que el efecto de la IL-2 no está limitado a poblaciones de células inmunes, ya que se ha descubierto que media la proliferación y la expresión de Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la lectina mac-2 en líneas epiteliales intestinales de ratas pequeñas, mostrando que la IL-2 producida por la mucosa intestinal incrementa la migración celular epitelial en un modelo *in vitro* y sugiere que ésta puede jugar un importante papel en la reconstitución epitelial y cicatrización *in vivo* cuando se presentan heridas intestinales, inflamaciones, infecciones y radiaciones (Dignass, 1996).

Otros de los efectos de la IL-2 es su capacidad antiviral, presenta un papel importante en el rechazo de injertos y debido a que es considerada un potente activador de células inmunocompetentes, ha sido empleada durante los últimos años en importantes protocolos de tratamientos clínicos, con el propósito de estimular y mantener la actividad de células citotóxicas en enfermedades malignas, particularmente en carcinoma renal (Rosenberg, 1989) y melanoma maligno (Rosenberg, 1987), en donde se han obtenido resultados interesantes de rechazo tumoral (Smith, 1984, 1988; Waldmann, 1984). En la actualidad se tienen reportes de otra citocina conocida como IL-15, que tiene ciertos efectos biológicos semejantes a IL-2.

#### **INTERLEUCINA 15 (IL-15)**

La Interleucina 15 (IL-15), es una citocina recién caracterizada, obtenida del medio condicionado de la línea celular epitelial de simio, llamada CV1/EBNA (Grabstein, 1994). A diferencia de la IL-2, la IL-15 es expresada por una amplia variedad de tejidos, y tipos celulares, como corazón, hígado, pulmón, placenta, músculo esquelético macrófagos activados, células musculares, queratinocitos, células epiteliales renales, células endoteliales, fibroblastos embrionarios, piel, macrófagos, linfocitos T y monocitos activados (Giri, 1994). También comparte algunas propiedades biológicas con la IL-2, ya que es capaz de sustentar el crecimiento de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2. Otra semejanza es la similitud en el tamaño de las proteínas, sin embargo, posee ciertas características específicas como el valor del punto isoeléctrico (pI), para IL-15 es de 4.5, en comparación con el de IL-2 que es de 6.5 a 8, y la secuencia de amino ácidos de 153 en IL-2 y 162 en IL-15 (Anderson, 1995a; Grabstein, 1994).

A pesar de que la IL-15 no presenta una secuencia homóloga con la IL-2, la IL-15 puede unirse a diversas líneas celulares humanas, como células T activadas, macrófagos y células NK. Induce la generación de células LAK, CTL's y sirve como un co-mitógeno para la proliferación y diferenciación de linfocitos B activados (Carson, 1994; Grabstein, 1994; Armitage, 1995). Su activación se lleva a cabo al interactuar con su receptor o a través de los componentes del RIL-2 $\beta$  y RIL-2 $\gamma$  (Kondo, 1993; Russell 1993; Noguchi, 1993).

Por otro lado, recientemente se clonó el gene para la cadena  $\alpha$  del RIL-15 humano y de ratón mostrando que dicha cadena está estructuralmente relacionada con la cadena  $\alpha$  del RIL-2 (Kay 1992), aunque el RIL-15 $\alpha$  tiene una mayor afinidad muestra una mayor constante de disociación (Kd) para la IL-15 ( $K_d = 10^{-11}$ M), mientras que Kd de la cadena  $\alpha$  del RIL-2 es de  $10^{-8}$ M. La cadena del RIL-15 $\alpha$  se expresa en Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) después de 24 hrs de haber sido estimulados al igual que la del RIL-2  $\alpha$  (Fig. 3), (Anderson, 1995b; Chae, 1996).

Datos recientes en modelos de ratón demuestran que la IL-15 derivada de macrófagos es más efectiva que la IL-2 en el mantenimiento de la respuesta linfocítica en diferentes órganos, incluyendo el pulmón (Doherty, 1996). Otros datos sugieren que la IL-15 induce la compartimentalización de células T en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Agostini, 1996; McInnes, 1996). Además existe la posibilidad de que la IL-15 puede actuar como un factor anabólico para el musculo esquelético (Quinn, 1995; Meazza, 1996). También se ha detectado que la IL-15 puede reemplazar el requerimiento de la IL-2 en la producción de IL-5 por células T, ya que estimula la transcripción del gene y la síntesis de la IL-5 humana, que induce el reclutamiento de eosinófilos en la mucosa bronquial y detiene la fase de broncoconstricción inducida por la inhalación de antígenos específicos en importantes modelos experimentales de asma (Mori, 1996).



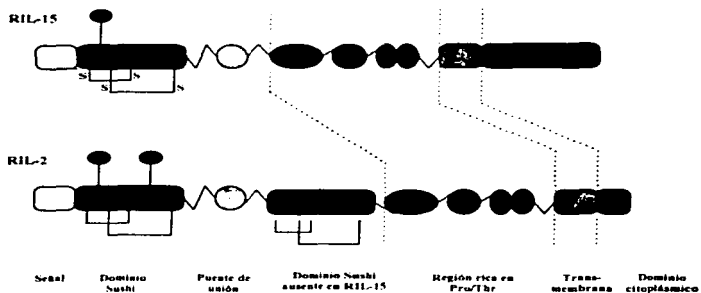


Fig. 3. Comparación estructural entre la cadena  $\alpha$  del RIL-2 y la cadena  $\alpha$  del RIL-15. Ambas proteínas contienen el consenso corto repetido (dominio "sushi"), formado por puentes disulfuro, sitios potenciales de glicosilación, las regiones conservadas ricas en prolina y treonina. El RIL-15 $\alpha$  contiene únicamente un dominio sushi, mientras que el RIL-2 $\alpha$  contiene dos (Tomado de Giri, 1995).

Por otra parte se ha examinado la capacidad de Interleucina-15 recombinante (rIL-15) para reemplazar a la Interleucina-2 recombinante (rIL-2) humanas en la iniciación de la proliferación de las células NK en el sistema estimulador de co-cultivo celular, revelando que la rIL-15 sola no puede substituir a la rIL-2, pero que la proliferación de las células NK es iniciada cuando rIL-15 es combinada con IL-10 o IL-12. Se sugiere que la fase dependiente de células T de la proliferación de las células NK puede involucrar un efecto sinérgico entre la IL-2 y citocinas derivadas de células no T tales como la IL-10, IL-12 o IL-15, particularmente cuando las concentraciones de IL-2 son limitadas, entonces, la rIL-10, rIL-12 y la rIL-15 son efectivas en concentraciones

submitogénicas de rIL-2, debido a esto se sugiere que existe un efecto sinérgico de la IL-2 y la IL-15 (Naume, 1992; Robertson, 1992; Warren, 1996).

La secreción de la IL-15 biológicamente activa ha sido detectada solamente en algunas líneas celulares tales como la línea celular CV1-EBNA, la línea celular de médula estromal IMLTH y las líneas celulares infectadas HTLV-1 (Grabstein, 1994; Bamford, 1994). Sin embargo, no existen reportes de la expresión de IL-15 en tumores sólidos humanos. Un estudio realizado en células de cáncer de pulmón (SCLC), mostró la expresión del gene de la IL-15 y la expresión de su ARN mensajero y algunas líneas celulares predominantemente realizan una transcripción alternativa (isoforma) de IL-15 la cual contiene un exón adicional en la secuencia codificadora del ARN mensajero de la IL-15 conocida. La isoforma expresada en estas células tumorales es también detectada en las células normales, aunque en éstas no es muy predominante. Una explicación a este fenómeno es que pudiera estar relacionado con el pH intracelular, el cual generalmente es más básico en durante el ciclo celular (Meaza, 1996).

La IL-15 biológicamente activa no fue detectada en estudios realizados en líneas celulares de pulmón, la secreción de IL-15 en una forma biológicamente activa ha sido reportado solamente en pocas líneas celulares transformadas por virus (Bamford, 1994; Grabstein, 1994). La distribución celular diferente de la molécula del RIL-15 $\alpha$  y del RIL-2 $\alpha$ , sugiere que la IL-15 induce una función fisiológica distinta de la conocida actividad inmunostimuladora compartida por la IL-2. Por otro lado, se ha detectado que el RIL-15 $\alpha$  tiene una constante de actividad promedio  $K_d \approx 1 \times 10^{-11}$ , que es equivalente a la afinidad generada por el complejo del RIL-2 heterotrímero para la IL-2, lo cual puede sugerir un posible papel funcional del RIL-15 $\alpha$  como mediador de la hasta ahora conocida señal intracelular inducida por la unión de la IL-15 (Giri, 1995).

El uso de anticuerpos monoclonales anti- $\beta$  y anti- $\gamma$  del RIL-2 pueden detener el efecto de la proliferación de las células NK; la activación de las células NK por parte de la IL-15 es similar a la activación obtenida por la IL-2. A una concentración de 0.10 ng/ml de IL-2 se observa incremento en la síntesis de ADN en las células, mientras que a las mismas concentraciones de IL-15 no se muestra actividad. Trabajos previos han mostrado que estas concentraciones de IL-2 dan como resultado una parcial o completa saturación del receptor de alta afinidad heterotrímérico RIL-2 $\alpha\beta\gamma$ . Una concentración de 10 ng/ml de IL-2 satura parcialmente la afinidad intermedia del RIL-2 pero también provee una completa saturación del RIL-2 de alta afinidad.

A diferencia de la IL-2, la respuesta proliferativa de las células NK por parte de la IL-15 se presenta a una concentración de 10 ng/ml. Además de que el anti-p55 no inhibe la proliferación, el anti-p75 sí muestra inhibición (Carson, 1994). De esta manera se puede comprobar que la estimulación mediada por la IL-15 en la activación de las células asesinas activadas por linfocinas y las células T requieren la expresión de la subunidad  $\beta$  del RIL-2 y no de la cadena RIL-2 $\alpha$  (Bramford, 1994; Armitage, 1995).

Al estudiar la capacidad de la IL-15 de coestimular a las células B comparando con IL-2, se ha demostrado que puede ser adicionada a la lista de factores solubles que desplazan una actividad coestimuladora en las células B activadas con anti-IgM o éster formol. Como la IL-2, la IL-15 induce la proliferación de células B activadas pero no de células B latentes, e induce la secreción de IgM, IgG e IgA (Armitage, 1993). La secreción de estos isotipos inducida por la IL-2, o por la IL-15 puede ser inhibida por la IL-4 pero incrementada por la IL-10. También se ha detectado que la cadena  $\beta$  del RIL-2 es necesaria para la transducción de las señales en las células B. La inducción de la proliferación de células B mediada por la IL-2 puede ser inhibida eficientemente

por un anti- $\alpha$ , pero sólo parcialmente por un anti- $\beta$ . Sin embargo, al utilizar IL-15 la proliferación es inhibida por un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$  pero no por un anti- $\alpha$ . De todas las citocinas utilizadas, la IL-15 puede remplazar a la IL-2 para la generación de una respuesta primaria específica *in vitro*. Además, a pesar del uso diferencial de los componentes del RIL-2, la IL-2 y la IL-15 muestran actividades biológicas comunes en las células B, tienen papeles funcionales *in vivo* que son mediados por distintos sitios anatómicos; la IL-15 requiere de la cadena  $\beta$  y  $\gamma$  del complejo RIL-2 para la transducción de la señal, no obstante, la presencia de estas subunidades no garantiza la respuesta de la IL-15, ya que es necesaria la presencia de la cadena  $\alpha$  del RIL-15 que permite la alta afinidad de unión (Armitage, 1995).

#### RECEPTOR DE IL-2 (RIL-2)

El receptor para IL-2 (RIL-2) es un complejo proteico formado por tres subunidades o cadenas  $\alpha$  (p55),  $\beta$  (p75) y  $\gamma$  (p64); las cuales se expresan unidas no covalentemente en la superficie de linfocitos T, B, NK, macrófagos y monocitos (Waldmann, 1993). Así mismo se ha detectado su presencia en células normales no hematopoyéticas como queratinocitos, células intestinales, oligodendrocitos, células de origen nervioso, células endoteliales de cordón umbilical, fibroblastos de médula ósea, fibroblastos embrionarios humanos y células pituitarias (Fig. 4), (Benevise, 1986; Arzt, 1992; Thèze, 1996).

### **CADENA $\alpha$ DEL RECEPTOR DE IL-2 (RIL-2 $\alpha$ )**

El RIL-2 $\alpha$  descrito originalmente como el antígeno Tac es una glicoproteína de 55-kDa (p55) capaz de unirse a IL-2 con baja afinidad, con una constante de disociación (Kd)  $\approx$  10 nM. Su expresión es inducida únicamente en células T activadas con mitógeno o antígeno. Está compuesta de 251 amino ácidos (aa), así como un péptido señal de 21 aa de longitud. La estructura primaria del RIL-2 $\alpha$  no muestra una secuencia homóloga importante con otras moléculas de receptores conocidos y no pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas (Cosman, 1990).

Los 219 aa terminales forman un dominio extracelular. Este dominio contiene dos sitios potenciales de glicosilación de unión N y múltiples sitios de posibles uniones a carbohidratos. Los múltiples residuos de cisteína identificados participan en la formación de enlaces disulfuro requeridos para unirse a la IL-2. Un segundo dominio contiene una simple región hidrofóbica próxima al carboxilo terminal (COOH-terminal) de 19 aa, el cual es una región transmembranal. El tercer y último dominio es una región citoplasmática muy corta de 13 aa, que contiene aa cargados positivamente de gran importancia involucrados en el anclaje de la proteína. Los sitios potenciales aceptores de fosfato (serina y treonina pero no tirosina) están presentes en el dominio intracitoplasmático. El gene que codifica para el RIL-2 $\alpha$  consiste de 8 exones y 7 intrones empalmados en una distancia mínima de 24 Kb, está localizado en el cromosoma 10 (Greene, 1985; Hatakeyama, 1985).

### **CADENA $\beta$ DEL RECEPTOR DE IL-2 (RIL-2 $\beta$ )**

Importantes observaciones han determinado que el péptido Tac p55 no es la única molécula involucrada en la unión a la IL-2 para desencadenar una respuesta

inmunológica. Ensayos de uniones de afinidad posteriores a la caracterización de la cadena  $\alpha$  identificaron bioquímicamente otro componente del RIL-2 (Sharon, 1986; Dukovich, 1987). La estructura de este componente RIL-2 $\beta$  (p75) fue confirmada a través de la expresión clonal de ADN para el RIL-2 $\beta$  humano, usando anticuerpos monoclonales contra el RIL-2 $\beta$  (Hatakeyama, 1985; Tsudo, 1989).

La cadena  $\beta$  es una proteína transmembranal que consiste de 551 aminoácidos (aa). La proteína presenta una secuencia señal seguida de 525 residuos de aminoácidos que forman la proteína madura del RIL-2 $\beta$ . En esta cadena, las regiones de 214, 25 y 286 aa en longitud constituyen la región de membrana extracelular y regiones citoplasmáticas respectivamente. La porción citoplasmática del RIL-2 $\beta$  es más grande que el RIL-2 $\alpha$ , pero ésta no contiene ninguna región de cinasas aparente (Hanks, 1988). Esta es rica en prolina (24/286) y residuos de serina (30/286), y está notablemente inclinada o torcida por los aa cargados negativamente, por lo tanto, esta región contiene 40 aa cargados negativamente (ácido glutámico y aspártico), y solamente 18 aa cargados positivamente (lisina y arginina). Esta inclinación es particularmente evidente en la porción media de esta región (345-390 residuos de aa). La región citoplasmática del RIL-2 $\beta$  puede ser dividida en tres subregiones basadas en su composición de aa. Estas subregiones han sido designadas como la "región rica en serina", "región ácida" y "región rica en prolina"; esta subunidad presenta una constante de disociación de más de 100 nM (Caligiuri, 1990; Hatakeyama, 1991).

El gene del RIL-2 $\beta$  consta de 10 exones y 9 intrones empalmados en 24 kb en el cromosoma 22q. La forma madura del RIL-2 $\beta$ , deducido por la secuencia de nucleótidos que consiste de 525 residuos de aa, pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas con un factor común de dos pares de residuos de cisteína conservados cerca de la región amino terminal y un triptófano-serina- X-triptófano-serina (WSXWS, región WS) en el dominio extracelular (Bazan 1990a). La región

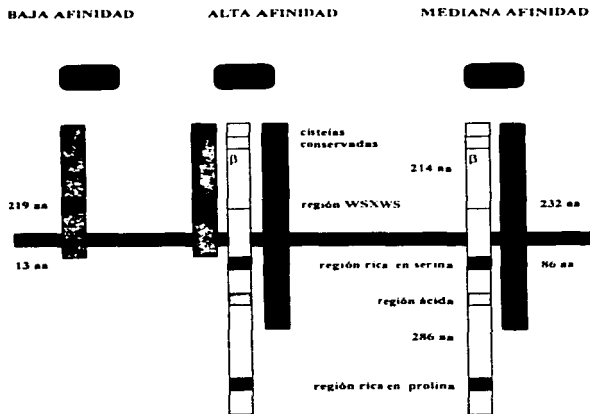


Fig. 4. Esquema de las tres clases de receptores para IL-2. Baja afinidad formado por la cadena  $\alpha$ , alta afinidad formado por las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , la afinidad intermedia formada por las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ . Las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  son miembros de la superfamilia de receptores de citocinas, con cuatro cisteínas conservadas (dos pares de barras) y una región Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). Los tamaños de los dominios de aminoácidos (aa) citoplasmáticos y extracelulares se muestran para cada cadena. En la región citoplasmática de la cadena  $\beta$  se observan las regiones ricas en serina, prolina y la región ácida, involucradas en la señal de transducción intracelular (Tomado de Warren, 1996).

WS es importante para la unión al ligando y la transducción de la señal, que a su vez son factores para la formación del RIL-2 funcional; mutaciones puntuales en el sitio de la región WS del RIL-2 $\beta$  disminuye su capacidad de unión a la IL-2 (Miyazaki, 1991). El dominio citoplasmático que consiste de 286 residuos de aa, es suficientemente largo para contribuir a la transducción de la señal intracelular. El dominio citoplasmático contiene una región que está involucrada en la transducción de la señal, tal como la región 1, rica en serina y regiones ricas en prolina. Además se demostró que la transfección de la cadena p75 en células linfoides induce la expresión de un receptor funcional de afinidad intermedia y con actividad transduccional (Bazan, 1990b; Fung, 1991).

Existen datos que indican la cadena  $\alpha$  expresada en células de ratón tiene una baja afinidad por la IL-2 pero no conduce a una respuesta proliferativa, sin embargo, en otras líneas celulares que fueron transfectadas con el gene para expresar la cadena  $\beta$  además de la  $\alpha$  se observa una afinidad intermedia con inducción a la proliferación en presencia de IL-2. Esto sugiere que el RIL-2 $\beta$  juega un papel importante en la transducción de señales mitóticas inducidas por la IL-2 en líneas celulares hematopoyéticas (Minami, 1993).

La secuencia primaria de la región rica en serina del RIL-2 $\beta$  humano tiene aproximadamente el 80% de homología con el RIL-2 $\beta$  de ratón (Kodo, 1990). Esta región también muestra gran homología con la correspondiente región en el receptor de eritropoyetina (EPO-R) (Miura, 1991). Algunas observaciones realizadas sugieren que la región rica en serina del RIL-2 $\beta$  es importante para mediar la vía de activación en la transducción de señales. El reemplazamiento de la leucina 299 en esta región por prolina induce un cambio conformacional en el RIL-2 $\beta$ , y el receptor resultante no es lo suficientemente largo para transmitir la señal mitótica por IL-2 (Mori, 1991). Los residuos de aa que rodean a la leucina también se encuentran conservados en la



cadena  $\beta$  de RIL-2 de humano, ratón y el receptor de la EPO (Dändrea, 1989; Hatakeyama, 1992).

#### CADENA $\gamma$ DEL RECEPTOR DE IL-2 (RIL-2 $\gamma$ ).

Basándose en la secuencia de aa, se aisló el clon completo de ADN que codifica una molécula de 64 kDa, demostrando que ésta es el tercer componente del RIL-2 conocido como cadena  $\gamma$  (RIL-2 $\gamma$ ), del receptor para IL-2 (Takeshita, 1992). La forma madura de la cadena, p64, consiste de 347 residuos de aa con una secuencia típica que lo incluye en la superfamilia de receptores para citocinas, tal como la cadena  $\beta$ . El dominio extracelular contiene una región de leucina como cremallera, pero no se sabe si esta región está implicada en alguna función del receptor. Este dominio citoplasmático contiene 86 residuos de aa, presenta la región conocida como SH2 la cual es homóloga a los dos subdominios de la región 2 homóloga a Src (SH2) compuesta de 5 subdominios conservados (Bazan, 1990b).

Se sugiere que este componente específico celular ahora conocido como RIL-2 $\gamma$ , puede estar involucrado en la formación de los receptores de IL-2 de alta e intermedia afinidad. El RIL-2 $\gamma$  (p64) puede ser coprecipitado con el RIL-2 $\beta$  en presencia de IL-2 en células linfoides produciendo el RIL-2 de alta afinidad. Además, la cantidad RIL-2 $\gamma$  coprecipitado con el RIL-2 $\beta$ , es proporcional a los numerosos sitios de unión de la IL-2 en dos subclones de células T, cuando la cantidad de RIL-2 $\beta$  no correlaciona con los numerosos sitios de unión que posee la IL-2. Recientemente el ADN de la cadena del RIL-2 $\gamma$  humano fue clonado, y las secuencias completas de nucleótidos fueron determinadas. De aquí se propone que la proteína posee 22 aa en el extremo anímico terminal y con 347 aa más conforma la proteína madura. En esta cadena, las regiones de 232, 29 y 86 aa constituyen la longitud extracelular que atraviesa la membrana y la

región citoplasmática respectivamente. La región citoplasmática de RIL-2 $\gamma$  es considerablemente más corta que el RIL-2 $\beta$ . El dominio extracelular del RIL-2 $\gamma$  contiene importantes regiones que se conservan en otros receptores de citocinas, indicando que el RIL-2 $\gamma$  pertenece a la superfamilia de receptores hematopoyéticos. Cuando los ADNs para RIL-2 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se introducen y se expresan en fibroblastos, se reconstituye el receptor de alta afinidad para la IL-2 (Takeshita, 1992; Voss, 1992, 1993).

#### **ENDOCITOSIS DEL COMPLEJO RIL-2/IL-2**

Uno de los primeros eventos a la unión de la IL-2 a su receptor de alta afinidad es la internalización del ligando (IL-2)/receptor (RIL-2) (Subtil, 1994). Este complejo tiene un tiempo de vida media en la superficie celular de aproximadamente 30 min. Los receptores intramembranales unidos a la IL-2 desaparecen de la superficie celular al mismo tiempo que la IL-2 es internalizada y degradada (Duprez, 1988; Saito, 1991). Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que forman el complejo de afinidad intermedia son necesarias para la endocitosis de la IL-2, la cual es internalizada (Hatakeyama 1989); mientras que la cadena  $\alpha$  sola no parece mediar la endocitosis de la IL-2 (Fuji, 1986; Nabholz, 1987).

Durante la endocitosis mediada por el receptor después de 10 min, el complejo ligando/receptor es internalizado en vesículas transportadoras que liberan estas proteínas en compartimentos endosomales en el citoplasma (Rubin, 1985; Fung, 1988; Ferrer, 1993). Por su parte el RIL-2 $\alpha$  ha sido localizado unido a la IL-2 en compartimentos recicladores pericentriolares (Mayor, 1993). Sin embargo, el RIL-2 $\beta$  ha sido localizado en compartimentos endocíticos, mostrando que los componentes

del receptor tienen diferentes tiempos de vida en la superficie. Las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  presentan un tiempo de vida media alrededor de 1 hr para la cadena  $\beta$  en presencia de IL-2 es alrededor de 55 min, mientras que para la cadena  $\gamma$  es aproximadamente de 70 min. La rápida disminución del número de receptores de superficie refleja directamente su degradación. Cuando los receptores de alta afinidad están saturados con el ligando, la vida media de éstos en la superficie celular es muy corta, con un tiempo aproximado de 15-25 min (Duprez, 1988), mientras que la cadena  $\alpha$  es más estable, con un tiempo de 48 hrs (Hemar, 1990). Por lo tanto, los componentes de este receptor multimolecular tienen diferentes fases intracelulares después de la internalización, ya que la cadena  $\alpha$  se recicla en la membrana plasmática, mientras que  $\beta$  y  $\gamma$  están destinadas a la degradación. El número de receptores de superficie celular da como resultado un balance entre las fases de síntesis, internalización y reciclamiento (Meager, 1991).

Como se mencionó antes, la cadena  $\alpha$  tiene un tiempo de vida media largo, en relación con el reciclamiento de esta subunidad después de la internalización. Además, es posible que la translocación de la IL-2 o el complejo IL-2/RIL-2 al núcleo puede regular la transcripción de varios genes, como ha sido sugerido para otros factores de crecimiento, en el que se incluye la prolactina (Duprez, 1992).

## **EFFECTO DE INTERLEUCINA 2 (IL-2) EN CELULAS TUMORALES**

Durante la década pasada se descubrió que algunas interleucinas y otras citocinas eran expresadas por una amplia variedad de células, ejerciendo efectos funcionales en diferentes poblaciones celulares y regulando importantes interacciones entre componentes celulares del sistema inmune (Dignass, 1996).

La IL-2 ha sido considerada como un producto específico de linfocitos T y líneas celulares T, inducidas por antígenos o mitógenos (Smith, 1988). Sin embargo, líneas de células B estimuladas con *stafilococcus aureus* aumentan la síntesis de IL-2 y sus transcritos, así como de moléculas semejantes a la IL-2 que han sido demostradas en células sinciciotrofoblásticas humanas (Boehm, 1989). Un epítipo semejante a la IL-2 ha sido también descrito en capas de queratinocitos granulares de piel humana. Una molécula parecida a la IL-2, producida por células nerviosas, tóxica para oligodendrocitos y asociada con la generación del sistema nervioso central también ha sido identificada (Eitan, 1992). Sin embargo, la presencia de ARNm para IL-2 y la síntesis de IL-2 ha sido determinada por ELISA en miofibroblastos humanos después de la radiación de fibrosis en pacientes con cáncer de mama (Aililèche, 1994). En células de melanoma humano, en cultivos libres de IL-2 exógena se ha detectado la presencia de IL-2 en una localización núcleo/nucleolar, sugiriendo una producción autócrina de IL-2 por estas células. En las células de melanoma G361, se ha observado que la IL-2 producida endogenamente está involucrada en la regulación del crecimiento en dos etapas; primera, en la que se observa la presencia del RIL-2 $\beta$ , segunda, disminución de la expresión de la subunidad  $\beta$  del RIL-2 y el marcaje núcleo/nucleolar de IL-2 cuando las células están en confluencia (Aililèche, 1993).

La localización núcleo/nucleolar de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del RIL-2 en las células tumorales de carcinoma de mama, pulmón, colorectal y melanoma sugiere que estas células son capaces de producir IL-2 y que la IL-2 endógena puede unirse al RIL-2 $\beta$  expresado en la superficie de las células tumorales. Así mismo se ha observado que al adicionar un anticuerpo específico que bloquea la cadena  $\beta$  del RIL-2 en estas células se observa una inhibición de la proliferación. Por esta razón se sugiere que la expresión de la cadena  $\beta$  parece ser necesaria para el crecimiento celular del tumor y que la IL-2 endógena puede estar involucrada en la regulación del crecimiento

tumoral, ya que se ha demostrado que esta IL-2 es biológicamente activa (Alilèche, 1993; McMillan, 1995).

Esta modalidad de citocinas producidas por células tumorales y su efecto sobre ellas mismas es de gran importancia, ya que durante muchos años se han realizado diferentes estudios con citocinas, sobre todos aquellas con actividades antitumorales, sin embargo, aquí se debe tener mucho cuidado ya que algunas citocinas tales como la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  pueden estimular directamente a las células tumorales y apoyan la teoría de la inmunofacilitación del crecimiento tumoral (Tsai, 1987). Sin embargo, con el descubrimiento de que las células tumorales no linfoides humanas son capaces de producir citocinas, existe la posibilidad de una estimulación autócrina del crecimiento celular del tumor, lo cual conduce a mantener en el microambiente tumoral las condiciones adecuadas para continuar con esta proliferación (Miki, 1989; Wu, 1993).

El efecto de la IL-2 en células T transformadas o células no linfoides incluye cambios en la sensibilidad de las células tumorales a otras citocinas, alteraciones en la expresión de moléculas de superficie tales como ICAM-1 o CMH-I e inhibición del crecimiento de células de carcinoma (Paciotti, 1988). Trabajos previos han descrito un efecto dual de IL-2 en la expresión de ICAM-1 el cual depende del tipo y la densidad celular (Plaisance, 1992, 1993). En líneas celulares de melanoma, se ha analizado que la IL-2 causa una baja expresión de ICAM-1, por otro lado se ha observado que en otras células de melanoma MELP, la IL-2 induce una sobre-regulación de ICAM-1 y CD44. Este comportamiento puede representar un parámetro que define la expresión de un fenotipo más maligno de melanoma en comparación con otras células de melanoma. La expresión incrementada *in vivo* en melanoma por estas dos moléculas de adhesión es considerado como un marcador de progresión metastásica. El aumento en la proliferación *in vitro* e *in vivo* en las células de melanoma puede ser debido a un efecto directo estimulador de IL-2 y una baja

secreción de una citocina antiproliferativa como la IL-6 (Han, 1996).

El RIL-2 puede ser capaz de responder a otros ligandos como la IL-2 (Kanakura, 1993; Grabstein, 1994). Recientemente se ha enfocado la atención en la posibilidad de que las células tumorales humanas no linfoides, puedan producir y responder a algunas citocinas. Ya que se ha demostrado que las interleucinas IL-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) e IL-6 estimulan la proliferación de ciertas líneas celulares de tumores sólidos humanos *in vitro*, por otro lado, existen evidencias de que las células tumorales también pueden secretar ciertas citocinas como la IL-6, la cual en células de carcinoma de riñón funciona como un factor de crecimiento autócrino (Tsai, 1987; Miki, 1989; Lahm, 1992).

Algunas células de melanoma también secretan IL-2 modificando la expresión de moléculas de superficie (ICAM-1, CD44 y HLA-DR) involucradas en el inmunoreconocimiento y progresión de melanoma (Alilèche, 1993). La adición exógena y la producción *in situ* de IL-2, así como de la síntesis de otras citocinas como la IL-3, IL-6, IL-4, IL-7 y IL-9, que pueden interactuar con el complejo del RIL-2 que es reconocido por éstas, induce la formación de otros complejos que contribuyen a generar situaciones biológicas, las cuales pueden ser favorables para el paciente pero desfavorables para la progresión del tumor, ya que se ha demostrado que la adición exógena de IL-2 a pacientes con melanoma induce la progresión del tumor hasta llegar a una metástasis (Han, 1996).

#### **RECEPTOR PARA INTERLEUCINA 2 (RIL-2) EN CELULAS TUMORALES**

El concepto inicial relacionado con la expresión restringida del RIL-2 funcional a ciertos tipos celulares, así como especificidad de los componentes del RIL-2 ha

cambiado recientemente, ya que se ha demostrado que el RIL-2 no es exclusivo de células hematopoyéticas o células normales no hematopoyéticas, como las del páncreas y fibroblastos de pulmón. Existen reportes de la presencia del RIL-2 en células neoplásicas tanto en líneas linfoides como obtenidas de tumores sólidos humanos. La expresión de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 han sido reportadas *in vitro* en fibrosarcomas humanos, fibroblastos de médula ósea, piel, carcinoma de pulmón (Heys, 1994), cáncer de mama y melanomas (Plaisance, 1993; Rimoldi, 1993; Han, 1996) y carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Weidmann, 1992; Yasumura, 1994). En el caso de las células tumorales se ha observado una abundante expresión de la cadena  $\beta$  del RIL-2 y muy baja de la cadena  $\alpha$  (Yasumura, 1994). Por su parte, la cadena  $\gamma$  del RIL-2 ha sido detectado en un 50% de líneas celulares de melanoma y en líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello (Weidmann, 1992); de igual forma se detectaron en células epiteliales intestinales (Dignass, 1996). Es interesante mencionar que en células normales como las de fibroblastos de pulmón y piel, que en cultivo suelen expresar la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2, después de algunas resiembras estas líneas ya no expresan la cadena  $\alpha$ , que parece ser un patrón de células en etapas de envejecimiento (Plaisance, 1992).

Usando anticuerpos específicos contra las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 se ha demostrado que en tumores malignos humanos de diversas histogénesis, las células neoplásicas pero no el tejido normal adyacente expresan el RIL-2 $\beta$ ; sin embargo, no se detectó la presencia del RIL-2 $\alpha$  en dichas células. Por otra parte, además de la expresión de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 en células tumorales, también se ha detectado la presencia intracelular de IL-2 en tumores de pulmón, mama, colorectal y melanoma, lo cual indica que dichos receptores son funcionales, ya que permiten la internalización de citocinas (McMillan, 1995).

El efecto de la IL-2 sobre células no hematopoyéticas parece ser diferencial, ya que altas concentraciones inhiben la proliferación en un 50% de líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello tanto *in vitro* como *in vivo*, incrementando la sensibilidad del tumor al efecto citostático de otras citocinas, este efecto es bloqueado al utilizar un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra la cadena  $\beta$  del RIL-2. En las líneas celulares de carcinoma gástrico y renal se ha observado el mismo comportamiento pero en este caso con bajas concentraciones de IL-2 y en estas células el tratamiento con esta citocina también disminuye la expresión de ICAM-1 y antígenos de MHC clase I (Weidmann, 1992, Yasumura, 1994).

Las líneas celulares de cáncer intestinal, pulmón y mama incrementan su proliferación en presencia de IL-2, mientras que en melanoma la IL-2 no tiene efecto en la proliferación, pero sí en la expresión de moléculas de superficie ICAM-1, MHC I y II, que son inhibidas aumentándose la expresión de CD44 (Okamoto, 1990; Ciacci, 1993; Katano, 1994).

En las células de melanoma que expresan tanto *in vitro* como *in vivo* las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2, en un 50% expresan bajos niveles de la cadena  $\gamma$  (Plaisance, 1993; Rimoldi, 1993), que al adicionar IL-2 estabiliza la expresión su ARNm incrementando la unión (Bosco, 1994; Han, 1996). Así mismo, previos estudios han demostrado una respuesta compleja en células endoteliales de prepucio humano (Hicks, 1991).

En los tumores sólidos que expresan el RIL-2 y que responde a IL-2 exógena, se ha observado que existen asociaciones entre las cadenas que lo constituyen. Asimismo se han determinado variaciones en su densidad que influyen en la formación de un receptor funcional o no, lo cual se ve reflejado en su respuesta biológica y aquellos tumores pueden responder directamente a IL-2 exógena que favorece la progresión



del tumor (Weidmann, 1992; Yasumura, 1994; Reinecker, 1995). La presencia de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 pueden proporcionar la formación de un pseudo-receptor de alta afinidad (Sugamura, 1995), que puede responder de una manera espontanea al estímulo de IL-2 (Fig. 5).

Alternativamente, es posible que la unión de la IL-2 a la molécula  $\beta$  del RIL-2 en carcinomas pueda estar regulada de manera diferente a la de células linfoides, esto tal vez debido a la estructura de la cadena  $\beta$ , el más prominente componente del complejo RIL-2, o a la falta de asociación de la cinasa Jak1 con la cadena  $\beta$ , que se sabe es necesaria para la activación funcional del RIL-2 (Miyazaki, 1994).

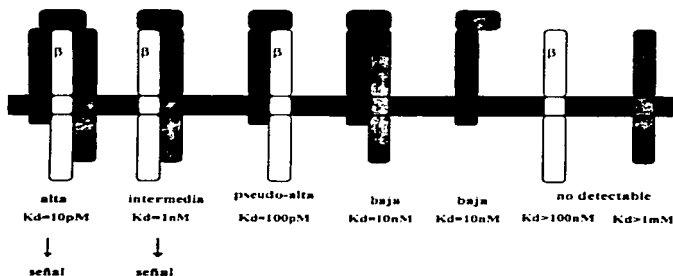


Fig. 5. Afinidades y función de varios complejos de cadenas del RIL-2. Los complejos del receptor de IL-2 constituidos en la superficie de células fibroblásticas por transfección con tres genes de las cadenas fueron examinados por su capacidad de transducción de señales mediada por la IL-2 y sus afinidades de unión a la IL-2 (Tomado de Sugamura, 1995).

Es posible que el complejo RIL-2 que se expresa en carcinomas humanos pueda formarse con las tres subunidades descritas en células linfoides, o que contienen cadenas  $\beta$  alteradas o cadenas  $\gamma$  expresadas que evitan una activación normal de proteínas que están asociadas con diferentes elementos transductores de señales. Se ha demostrado que la IL-2 y otras citocinas como la IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, usan la cadena  $\beta$  del RIL-2 que se expresa en células tumorales para inducir su proliferación. En vista de las similitudes entre la IL-2 y la IL-15, así como las evidencias de que esta citocina comparte el RIL-2 $\beta$ , no puede descartarse la idea de que la IL-15 puede utilizar las cadenas  $\beta$  o  $\gamma$  en carcinomas humanos para inducir su proliferación (Johnston, 1994).

La importancia biológica de la presencia del RIL-2 en células no hematopoyéticas aún no se esclarece, sin embargo, algunos estudios indican que la IL-2 exógena puede inhibir parcialmente el crecimiento de carcinomas como los de cabeza y cuello (Weidmann 1992). El mecanismo del efecto antiproliferativo mediado por IL-2 en células tumorales que presentan el RIL-2 no es claro (Lin, 1995).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el primer lugar dentro de las neoplasias malignas en la mujer. Su incidencia es mayor en grupos con capacidades económicamente reducidas y de áreas suburbanas. A pesar de las campañas de detección oportuna, el diagnóstico se establece con alta frecuencia en estadios avanzados, por lo cual constituye un problema de salud pública, su frecuencia ascendente revela la necesidad de ampliar la cobertura de los programas nacionales de prevención y detección oportuna (Rosenberg, 1990). La edad de las pacientes con esta neoplasia aparentemente se encuentra en descenso ya que se diagnostica cáncer de cérvix en mujeres cada vez más jóvenes aumentando su mortalidad en este grupo. Con respecto a esto se ha sugerido que las neoplasias que ocurren en el grupo de mujeres jóvenes difieren en tipo histológico y comportamiento biológico de las lesiones desarrolladas en mujeres postmenopáusicas (Lazcano, 1996). Entre los factores de riesgo para el desarrollo de CaCu se encuentran la edad que fluctúa entre 35 a 70 años, inicio de relaciones sexuales a temprana edad, promiscuidad sexual, higiene genital deficiente (incluyendo a la pareja sexual), uso de anticonceptivos orales, consumo de tabaco, deficiencias nutricionales e infecciones ginecológicas frecuentes así como una multiparidad. A pesar de todos estos factores, el CaCu es una enfermedad progresiva que se inicia con lesiones denominadas displasias, que responden al tratamiento médico de primer nivel de atención en un 85% de los casos, una vez que el cáncer inicia, (cáncer *in situ*) le toma de 10 a 20 años para convertirse en cáncer invasor. Sin embargo, no se tiene la información clara acerca de los mecanismos de escape que presenta este tipo de células (Rosenberg, 1990). Se plantea que puedan secretar factores inhibidores de la proliferación y activación de linfocitos de sangre periférica (LSP) e incluso que puedan competir por factores de crecimiento y diferenciación de células efectoras tal como la IL-2.

## JUSTIFICACION

Hasta el momento se ha empleado la IL-2 en la inmunoterapia adoptiva experimental contra el cáncer; esta estrategia culmina una búsqueda casi centenaria en pos de una vía eficaz de utilización del sistema inmune para destruir células cancerosas. Hasta ahora, pacientes con tres o más tipos de cáncer como melanomas malignos, cáncer de riñón y de colon que suelen ser muy resistentes a las terapias habituales han mejorado con la administración de la IL-2 en combinación con células NK estimuladas por IL-2. La proporción de pacientes que han mejorado significativamente con la terapia es todavía baja. Si embargo, recientemente se ha demostrado la presencia del RIL-2 en células tumorales de cabeza y cuello lo que ha permitido determinar el efecto de IL-2 exógena que actúa en este tipo de células neoplásicas inhibiendo o incrementando su proliferación (Kanakura, 1993). Por lo cual, la terapia con IL-2 no parece ser tan recomendable sin antes determinar si el tipo de tumor expresa el RIL-2. Por esta razón, en el presente trabajo se pretende determinar la presencia del RIL-2 en células neoplásicas de carcinoma de cérvix y el efecto en la proliferación de éstas en presencia de IL-2 exógena.

**HIPOTESIS**

Se ha demostrado que la Interleucina-2 (IL-2) es una citocina que participa en la activación, diferenciación y proliferación de linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK) monocitos y granulocitos, quienes expresan el receptor para IL-2, una glucoproteína compuesta por tres cadenas: la p55- $\alpha$  de baja afinidad, la p75- $\beta$  de afinidad intermedia y la cadena p64- $\gamma$  que al unirse con las cadenas  $\alpha\beta$  forman un complejo de alta afinidad. Asimismo, se ha demostrado que el receptor para IL-2 no es exclusivo de células hematopoyéticas, ya que se ha detectado en células de origen no linfóide tanto normales como neoplásicas, como es el caso de algunos carcinomas de cabeza y cuello en los cuales la presencia de este receptor al unirse con IL-2, puede inducir actividad proliferativa o antiproliferativa. Por otro lado, recientemente nuestro grupo de trabajo ha observado que las células de CaCu en presencia de IL-2 tienen una mayor proliferación después de 5 días de cultivo. Por lo cual suponemos que las células de CaCu podrían presentar el receptor para IL-2 en su membrana, y de ser así, al utilizar anticuerpos dirigidos contra las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor para IL-2 se podría inhibir la proliferación de dichas células. Suponemos que podría presentarse un probable mecanismo de escape inmunológico utilizado por estas células, ya que posiblemente puedan ser reconocidas por el sistema inmune, pero al expresar el RIL2 pueden competir por la citocina sintetizada por los linfocitos, en el microambiente tumoral, favoreciendo su proliferación desregulada.

## OBJETIVO GENERAL

Confirmar el efecto de diferentes concentraciones de IL-2 en la proliferación de células epiteliales de cérvix normal y neoplásico, así como determinar la presencia del receptor para IL-2 en células epiteliales de cérvix neoplásico.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Cultivar células de las líneas celulares tumorales CALO, INBL y epitelios normales de cérvix.
- Determinar la concentración adecuada de medio condicionado de la línea celular C63 para inducir proliferación celular en las líneas celulares tumorales CALO e INBL.
- Evaluar el efecto de IL-2 sobre la proliferación de líneas celulares CALO, INBL y epitelios normales.
- Determinar la presencia de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor para IL-2 en membrana y citosol de CALO e INBL.
- Determinar el efecto de anticuerpos monoclonales específicos contra las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 en la proliferación de las células tumorales CALO, INBL y epitelios normales estimuladas con IL-2 e IL-15.
- Determinar la competencia por IL-2 entre Linfocitos de Sangre Periférica Normal y células tumorales CALO e INBL.

## MATERIALES Y METODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consistió de líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO estadio clínico IIB e INBL estadio clínico IVB. Como fuente de IL-2 se utilizó la línea celular C63 transfectada con el gene para sintetizar IL-2. Estas células permanecen criopreservadas en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudio Superiores Zaragoza, U.N.A.M. Asimismo, se utilizaron biopsias de cérvix normal provenientes de donadoras sanas sin lesión por carcinoma de cérvix, proporcionadas por el servicio de ginecología del Hospital General de Zona Troncoso, I.M.S.S. Las muestras de sangre fueron obtenidas de donadores sanos.

Las muestras de tejido normal fueron trasladadas al laboratorio en tubos de plástico de 50 ml de capacidad (Falcon, U.S.A.) conteniendo medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. U.S.A.) (Apéndice 1), en una proporción del 90% más 10% de Suero Fetal de Bobino (SFB) (Hyclone, U.S.A.), previamente desactivado (Apéndice 2), el transporte se hizo en un recipiente con hielo.

Las células CALO, INBL y epitelios normales se cultivaron en RPMI, suplementado con 10% de SFB, los linfocitos de sangre periférica normal (LSP) fueron cultivados con medio RPMI con 20% de SFB y fitohemaglutinina (PHA), (Sigma Chemical Co. U.S.A.) ó 100 U/ml de Interleucina 2 recombinante humana (hrIL-2) (Sigma Chemical Co. U.S.A.), según el caso. Todos los cultivos fueron mantenidos en incubadora (Form Scientific, Division of Mallinrodt, Inc. U.S.A.), a una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>, temperatura de 37° C y un ambiente saturado de humedad.

La densidad y viabilidad de las células tumorales, epitelios normales (confluentes), así como los LSP en cultivo fueron contadas en cámara de Neubauer (American Optical, U.S.A.) y evaluadas por exclusión con azul de tripano (Sigma Chemical, Co. U.S.A.), (Apéndice 3), para ser utilizadas en los ensayos posteriores y el resto se conservaron en congelación por medio de la técnica de criopreservación.

### **CRIOPRESERVACION**

Con la finalidad de tener células disponibles de las muestras obtenidas de LSP, tejido epitelial y células tumorales para los subsecuentes experimentos, se utilizó la técnica de criopreservación, la cual consiste en utilizar las células en fase exponencial, sin llegar a la saturación, fueron removidas de la superficie de la caja de cultivo con solución salina de verseno (Apéndice 4) mediante pipeteo, después se procedió a lavar con medio de cultivo RPMI, finalmente el botón celular fué resuspendido en medio para congelación el cual consistió en el caso de células normales y tumorales de 10% de SFB y 10% de dimetil sulfoxido (Sigma Chemical Co. U.S.A.), en medio de cultivo; para linfocitos se utiliza 90% de SFB más 10% de dimetil sulfoxido. Las células se repartieron en pequeñas ampollitas (Cooke Laboratory Products, U.S.A) de 1 ml y se congelaron primero a -70° C durante un período de 24-72 hrs para posteriormente ser introducidas en nitrógeno líquido a -190°C para su preservación indefinida.

Para descongelar las células se sacaron las ampollitas del nitrógeno líquido y se mantuvieron a temperatura ambiente por algunos minutos para ser descongeladas y antes de estar totalmente líquidas fueron centrifugadas a 500 g por 5 min, se desechó el sobrenadante, posteriormente el botón celular se lavó dos veces con RPMI para eliminar residuos de dimetil sulfoxido. Después de esto, las células fueron cultivadas en medio de cultivo nuevo.



## DISGREGACION MECANICA Y ENZIMATICA

Antes de procesar las muestras, éstas fueron lavadas bajo condiciones de esterilidad con una solución amortiguadora de fosfatos PBS (Phosphate Buffer Solution) (Apéndice 5), durante 15 min en un baño de agua a 37°C, inmediatamente después el tejido fue cortado con tijeras en pequeños trozos de aproximadamente 1-2 mm<sup>3</sup>. Los fragmentos de tejido fueron colocados en un matraz Erlen Meyer conteniendo un agitador magnético en el que se adicionó tripsina Tipo II (Sigma Chemical Co. U.S.A.), (Apéndice 6) al 0.025%, la disgregación se realizó a una temperatura de 37°C durante 45 min con una agitación constante. Después de este tiempo las células en suspensión fueron aisladas mediante pipeteo y se lavaron 3 veces con PBS mediante centrifugación a 600g durante 5 min. Finalmente las células se resuspendieron en medio de cultivo adicionado con 10% de SFB y se distribuyeron en cajas de petri con un volumen total de 5 ml para su posterior incubación.

## OBTENCION DE LINFOCITOS

En condiciones de esterilidad se obtubieron de 10-20 ml de sangre periférica de donadores normales, mediante jeringa o tubo de Vacutainer 1000 X 16 mm (Becton Dickinson, Co. U.S.A.), conteniendo heparina 0.1 ml a 1000 U/ml (Rickercab/NCB, U.S.A.). Después la sangre fue centrifugada durante 10 min a 500 g, para luego separar el plasma del paquete celular mediante pipeteo suave.

El paquete celular fue lavado con RPMI, se adicionó un volumen de medio igual al del paquete celular, el lavado se realizó mediante centrifugación a 500 g durante 10 min para después desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular nuevamente en RPMI para obtener una mezcla homogénea; después de esto se vertieron alícuotas de 5 ml de la mezcla en tubos conteniendo 2 ml de Ficoll Hypaque

(Mierolab, México), de 1.077 de densidad, que fueron centrifugados durante 30 min a 1000 g. Transcurrido este tiempo, se separaron las bandas de células mononucleadas situadas en la interfase entre el paquete de eritrocitos y el medio de RPMI, mediante pipeteo suave. Los linfocitos se lavaron tres veces con RPMI mediante centrifugación a 60 g durante 10 min. Posteriormente estos fueron cultivados con medio RPMI suplementado con 20% de SFB y 100 U/ml de Interleucina-2 recombinante humana (hrIL-2) (Sigma Chemical, Co. U.S.A.), en cajas de petri con capacidad de 3 ml.

#### **DETERMINACION DEL PORCENTAJE ADECUADO DE MEDIO CONDICIONADO (C63)**

Para obtener el medio condicionado de la línea C63 las células fueron cultivadas durante 7 días en RPMI en presencia de 20% de SFB, una vez transcurrido este tiempo el medio condicionado fue colectado y centrifugado para eliminar células y desechos; posteriormente se concentró hasta 80 veces el volumen inicial con membrana de amicon con poro de 30 kDa, luego fue concentrada en un speed vac hasta secar completamente, el producto final fue resuspendido en PBS y dializado en membrana de diálisis con poro de 5 kDa (Spectrum Medical, U.S.A.) en PBS durante tres días con cambios cada 24 hrs; el medio condicionado dializado fue esterilizado con membrana de 0.22  $\mu$ . Posteriormente para evaluar el porcentaje adecuado de medio condicionado concentrado (MCC) a utilizar con las líneas de células y linfocitos de sangre periférica normal, se realizaron cultivos de LSP normales en presencia de 1.5%, 3% y 6% de MCC y 100 U/ml de IL-2 recombinante (control +), los cuales fueron evaluados en su proliferación a los 7 días de cultivo utilizando la técnica colorimétrica de MTT en lector de ELISA (BIOTEC ELx800) con una absorbancia de 570 nm.

#### **TECNICA COLORIMETRICA DE MTT.**

La proliferación celular de Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) y líneas celulares se realizó con la técnica de MTT. Para ello se sembraron células viables, después de 7 días de cultivo se desechó el sobrenadante y las células se incubaron durante 3 hrs con 50  $\mu$ l de bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) (Sigma Chemical, Co. U.S.A.). El reactivo MTT enzimáticamente reducido a formazán (de color amarillo) por las células vivas fué extraído con 200  $\mu$ l de isopropanol (Sigma Chemical, Co. U.S.A.), para disolver los cristales de formazan. Las placas fueron agitadas ligeramente durante 5 min, posteriormente se procedió a leer la solución obtenida a una absorbancia de 570 nm en lector de ELISA (BIOTEC ELx800).

#### **PROLIFERACION POR INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA**

Esta técnica consiste en la incorporación del nucleótido timidina (marcado con tritio -3H-) a los núcleos de las células en cultivo, de manera que cuando las células se encuentren en fase de síntesis, incorporen la timidina marcada en la molécula de ADN. Cuando se realiza este tipo de evaluación es recomendable emplear cultivos celulares sincrónicos, con la finalidad de obtener una mayor representatividad de la población celular en la fase de síntesis del ciclo celular. Se eliminó el SFB del cultivo de las células CALO e INBL para obtener células sincrónicas, posteriormente se sembraron 2,000 cél/pozo después de 5 días de cultivo y a cada pozo se adicionó 1 $\mu$ Ci de 3H-timidina por ml de medio de cultivo. Después de concluido el tiempo del cultivo se lavaron las células con PBS, y se adicionó a las células metanol (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) al 95% en PBS, durante 20 min, inmediatamente se lavaron las células nuevamente con PBS. Después se agregó a cada cultivo NaOH (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) 400 mM para lisar a las células y liberar al ADN marcado. Se colectó el

ADN marcado con timidina tritiada en filtros de fibra de vidrio a través de una cosechadora (BRANDEL, U.S.A.), la cual permite el lavado de la timidina que se encuentra en el sobrenadante. Los filtros que contienen el ADN de las células que incorporaron el isótopo fueron secados a temperatura ambiente y posteriormente colocados en viales para centelleo a los cuales se les adicionó 5 ml de trisól o líquido de centelleo (Sigma Chemical, Co. U.S.A.), con la finalidad de amplificar las lecturas del material incorporado. Los viales fueron evaluados en un contador de centelleo de emisión Beta (Beckman, U.S.A.).

#### **EVALUACION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES EN PRESENCIA DE IL-2**

Las cinéticas de proliferación se realizaron para conocer algunos parámetros celulares como el tiempo de duplicación, latencia y la respuesta ante el estímulo de IL-2 de la población celular.

Las células en fase exponencial de las líneas CALO, INBL y cérvix normal, fueron removidas del sustrato con verseno y centrifugadas a 500 g durante 5 min, posteriormente el botón celular fue resuspendido en un volumen conocido de medio de cultivo suplementado para ser evaluadas. Una vez determinado el número celular se procedió a sembrar 5000 células por pozo en placas de 96, en presencia y ausencia de 5, 10 y 100 U/ml de IL-2 (MCC), la evaluación de la proliferación celular se hizo por la técnica colorimétrica de MTT a partir de las 24 hrs de cultivo hasta 6 días, en lector de ELISA (BIOTEC ELx800) a una absorbancia de 570 nm.

## **LISIS DE CELULAS TUMORALES**

Se colectaron células en fase de confluencia (aproximadamente un 75% del sustrato ocupado por las células) de las líneas CALO e INBL, los botones celulares se colocaron en tubos de 1.5 ml con PBS y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta obtener botones con aproximadamente 80 millones de células. Posteriormente se descongelaron los botones celulares y se centrifugaron durante 5 min a 14,000 g para desechar el PBS y adicionar 20-40  $\mu\text{l/ml}$  de buffer de lisis y se dejó reposar durante 30 min. Después de este tiempo, el lisado se resuspendió 20 veces con jeringa de insulina y se centrifugó a 3,000 rpm por 7 min, el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 50,000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 45 min y de esta manera se obtuvieron fracciones de membrana (botón) y citosol (sobrenadante) para poder ser separadas mediante electroforesis.

## **ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)**

El SDS-PAGE se realizó de acuerdo al método de Laemmli, excepto que la concentración del gel concentrador utilizada fue de 4.5%. Las concentraciones finales en el gel separador fueron de 0.375 M Tris-HCl (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) (pH 8.9) y 0.1% p/v de SDS y las concentraciones de acrilamida usadas fueron 7.5% o 12.5% p/v). Los geles se polimerizaron por la adición de 0.05% p/v de persulfato de amonio (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) y tetrametileno-diamina (TEMED), (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) para el gel de resolución ó 0.1% de cada catalizador en el gel concentrador. La solución del tanque (pH 8.3) contenía 0.025 M Tris, 0.192 M de glicina. Se tomaron 15  $\mu\text{l}$  de cada una de las fracciones de membrana y citosol en fases saturantes y en confluencia de las líneas CALO e INBL y se resuspendieron en buffer de Laemmli.

Los marcadores preteñidos utilizados fueron los siguientes: cadena pesada de miosina

(200 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina (68 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), lactoglobulina (18.4 kDa) y lisozima (14.3 kDa).

Tanto a las fracciones de las células CALO e INBL, así como a los marcadores les fue adicionado 5 µl de buffer de Laemi 5X y se procedió a hervir durante 5 min. La electroforésis se realizó con voltaje constante de 100 V por 2 horas en una cámara vertical de electroforesis (Gibco, U.S.A.).

#### **WESTERN-BLOT**

Las proteínas separadas, mediante SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa según el método de Kyhse- Andersen, en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 100 mA durante 2 horas. El buffer de transferencia contenía 25 mM Tris (Sigma Chemical, Co. U.S.A.), 192 mM Glicina (Sigma Chemical, Co. U.S.A.), 20 % (v/v) metanol y 0.05% SDS a pH 8.3 (Sigma Chemical, Co. U.S.A.). La eficiencia de la transferencia se determinó mediante tinción de la membrana de nitrocelulosa con Ponceau S (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) y desteñida con agua destilada. La nitrocelulosa con las proteínas inmobilizadas se bloqueó con 5% (p/v) de leche semi-descremada en polvo en buffer TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5) (Sigma Chemical, Co. U.S.A.), durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos anti-p55 (3 µg/ml) o anti-p75 (2 µg/ml) (R&D Systems Inc. U.S.A.) en TBS-5% leche durante 2 hrs a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron cinco veces con TBS durante 10 minutos cada lavada y una vez con TBS-5% leche. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina diluido en TBS-5% leche incubándolo durante 2 hrs a temperatura ambiente. La membrana fue lavada 5 veces como se indicó anteriormente. Después la membrana se reveló en 5 ml de buffer de fosfatasa alcalina (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) conteniendo

0.82 mg de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato y 1.65 mg de azul de tetrazolio. La reacción se detuvo después de 15 min lavando con agua destilada.

#### **PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES EN PRESENCIA DE IL-15**

Las células CALO e INBL, así como de los epitelios normales en confluencia fueron separadas del sustrato con verseno, las células viables fueron sembradas en placas de 96. (5,000 cél/pozo), estimuladas con 1, 10 y 100 ng/ml de Interleucina 15 recombinante humana (hrIL-15) (R&D Systems Inc. U.S.A.) y evaluadas mediante la técnica colorimétrica de MTT a 1, 3 y 6 días en un lector de ELISA (BIOTEC ELx800) a una absorbancia de 570 nm.

Paralelamente se incubaron células viables de ambas líneas celulares y se incubaron con 2.12 µg/ml de anticuerpo monoclonal dirigido contra la cadena β del RIL-2 (R&D Systems Inc. U.S.A.), en medio de cultivo RPMI para bloquear el 50% de los receptores presentes en las células tumorales a 37°C durante 50 min. Después de este tiempo, las células fueron lavadas con RPMI y estimuladas con 1ng/ml de hrIL-15) (R&D Systems Inc. U.S.A.) y evaluadas con MTT a 1, 3 y 6 días en un lector de ELISA (BIOTEC ELx800) a una absorbancia de 570 nm.

#### **PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES EN PRESENCIA DE IL-2**

Las células en confluencia de las líneas CALO e INBL no estimuladas fueron separadas del sustrato con verseno, las células viables fueron incubadas 80 min a 37°C con RPMI y anticuerpos monoclonales anti-p55 α 3 µg/ml (Boehringer Mannheim Biochemica, U.S.A.), anti-p75 β 3.4 µg/ml (R&D Systems Inc. U.S.A.) y

una combinación de ambos anticuerpos para bloquear el 80% de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  RIL-2. Después de este tiempo las células fueron lavadas con RPMI. Posteriormente se sembraron 5,000 células por pozo en placas de 96, con medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB. Se utilizaron células no bloqueadas como control del experimento.

Por otro lado, se utilizaron células a las mismas condiciones mencionadas anteriormente y fueron estimuladas con 10 y 100 U/ml de IL-2. Se utilizaron como control células no bloqueadas estimuladas con IL-2 sin bloqueo de receptores y células no estimuladas y no bloqueadas. La evaluación de la proliferación se realizó a 1, 3 y 5 días con MTT en lector de ELISA (BIOTEC ELx800) a una absorbancia de 570 nm.

#### **CO-CULTIVOS CELULARES**

Las células tumorales CALO e INBL en fase de confluencia fueron separadas del sustrato con verseno, posteriormente se sembraron 1,000 células viables por pozo en placas de 96 con RPMI suplementado con 10 % de SFB y se incubaron durante tres días, después de tres días de cultivo, se desechó el medio y únicamente se dejaron las células adheridas en el fondo del pozo.

Por otro lado, se obtuvieron Linfocitos de Sangre Periférica normal (LSP) y se cultivaron con en medio de cultivo RPMI suplementado en 20 % de SFB y Fitohemaglutinina (PHA) en cultivos de tres días para obtener poblaciones de linfocitos activados. Después de este tiempo los LSP fueron colectados mediante pipeteo y resuspendidos en medio de cultivo RPMI para determinar el número y viabilidad utilizando azul de tripano.



Los co-cultivos celulares se realizaron sembrando células tumorales y LSP, para ello fueron sembrados 50, 000 linfocitos por pozo, en las placas que contenían las células tumorales CALO e INBL adheridas en el fondo de los pozos con una relación: 50.000 LSP : 1.000 células tumorales. Se estimuló con 10, 100 y 1000 U/ml de IL-2. La evaluación se realizó a 7 y 21 días separando los LSP del co-cultivo presentes en el sobrenadante evitando tocar las células adheridas, posteriormente los LSP fueron lavados con PBS y se evaluó la proliferación mediante la técnica de MTT y se utilizó un lector de ELISA (BIOTEC ELx800) a una absorbancia de 570 nm. Cada 7 días se realizó un cambio de medio así como un nuevo estímulo de IL-2.

Todos los ensayos realizados durante el presente trabajo se hicieron por triplicado y con tres repeticiones cada uno.

**RESULTADOS****EVALUACION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS DE CaCu ESTIMULADAS CON IL-2 POR MEDIO DE INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA**

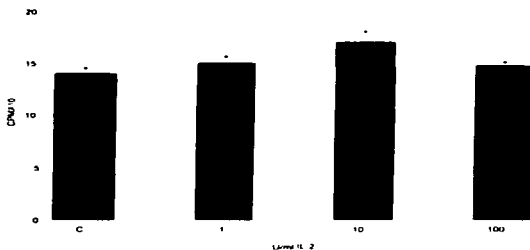
Las interleucinas fueron caracterizadas como glicoproteínas bioactivas secretadas por células linfocitares que estaban involucradas en la modulación y coordinación de diversas funciones de células inmunes (Mizel 1989). Sin embargo, recientemente se ha puesto atención a la posibilidad de que células de origen no linfocítico puedan también ser capaces de producir y responder a algunas citocinas. Mientras que células epiteliales no son capaces de responder a la acción mitogénica de la interleucina 2, se encontró que aquellas provenientes de varios tumores de tipo epitelial (tumores de cabeza y cuello de riñón y melanomas) respondían a este estímulo (Yasumura, 1994). Tomando en consideración que las células que conforman los tumores de CaCu también son de tipo epitelial se consideró interesante evaluar si estas células eran capaces de responder a la acción mitogénica de la IL-2, para ello se utilizaron dos líneas celulares (CALO e INBL) obtenidas a partir de biopsias de tumores de CaCu. La actividad mitogénica fue evaluada a través de la incorporación de timidina tritiada por estas células después de cinco días de cultivo en presencia de 1, 10 y 100 U/ml de IL-2.

En ambas líneas celulares encontramos inducción a la incorporación de timidina en presencia de IL-2 respecto a los cultivos control. Es interesante destacar que la mayor inducción se presentó cuando se utilizaron 10 U/ml y poca o nula con 100 U/ml (Figs. 1 y 2).

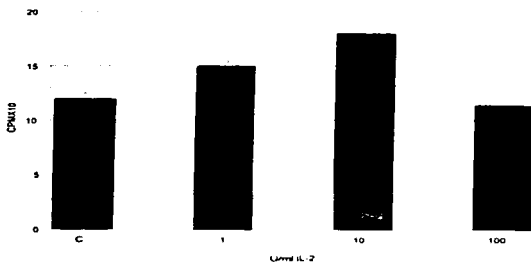
## EVALUACION DE LA PROLIFERACION DE LAS LINEAS CELULARES CALO E INBL. EN PRESENCIA DE IL-2 POR EL METODO DE MTT

Es conocido que la incorporación de timidina por una célula indica que ésta entra a la fase S del ciclo celular y por tanto se infiere que se encuentra en un proceso de división. Sin embargo no siempre la incorporación de timidina se correlaciona con proliferación celular. En consecuencia para confirmar la actividad inductora de la proliferación de la IL-2 en nuestras líneas celulares se procedió a evaluar por la técnica de MTT si el número celular aumentaba. Por otro lado se efectuó una cinética de inducción respecto al tiempo (cada 24 hrs por 6 días) para determinar el tiempo necesario para que la IL-2 induzca su efecto proliferador. En esta ocasión utilizamos 5, 10 y 100 U/ml de esta interleucina ya que mediante la incorporación de timidina detectamos que a 10 U/ml ésta era mayor que a 1 y 100 U/ml.

Nuestros resultados indican que tal y como se esperaba existe una inducción a la proliferación por la IL-2, sin embargo ésta se presenta hasta los 6 días de cultivo cuando las células no estimuladas llegan a confluencia. Consideramos que no es de extrañarse que usando la técnica de MTT se haya detectado la inducción un día después que con incorporación de timidina (Figs. 1 y 2) ya que como fue descrito anteriormente, MTT evalúa células ya divididas mientras que la otra técnica solamente la entrada a la fase S del ciclo celular. Es interesante mencionar que a la concentración de 100 U/ml las células fueron inhibidas a su proliferación desde los 4 días de cultivo. Por último mencionaremos que es de llamar la atención que durante los primeros 3 días la IL-2 fue inhibidora aun a las concentraciones de 5 y 10 U/ml presentándose la inducción hasta el sexto día (Fig. 3 y 4).



**Fig. 1.** Proliferación de células CALO. Cultivadas durante 5 días y estimuladas por 24 hrs con 1, 10 y 100 U/ml de IL-2, evaluadas por incorporación de timidina tritiada. La mayor proliferación se obtiene al utilizar 10 U/ml. (C: células sin estímulo).



**Fig. 2.** Proliferación de células INBL. Cultivadas durante 5 días y estimuladas por 24 hrs con 1, 10 y 100 U/ml de IL-2, evaluadas por incorporación de timidina tritiada. La mayor proliferación se observa con 10 U/ml. (C: células sin estímulo).

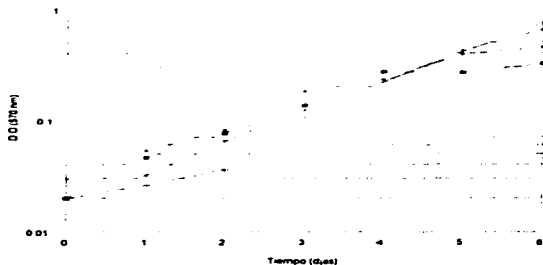


Fig. 3. Proliferación de células tumorales CALO. La evaluación se realizó cada 24 hrs, se estimularon con 5 (+), 10 (\*) y 100 (■) U/ml de IL-2. Células no estimuladas (●). La mayor proliferación se presenta con 10 U/ml.

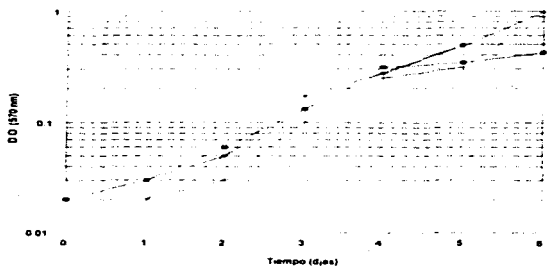


Fig. 4. Cinética de proliferación de células INBL. La evaluación se realizó cada 24 hrs, se estimularon con 5 (+), 10 (\*) y 100 (■) U/ml de IL-2. Células no estimuladas (●). La mayor proliferación se presenta con 10 U/ml de IL-2.

## **DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE LAS CADENAS $\alpha$ y $\beta$ DE LOS RECEPTORES PARA LA IL-2 (RIL-2) EN LAS CELULAS DE CALO E INBL**

Al observar que las células de las líneas CALO e INBL presentaron respuesta proliferativa ante la presencia de IL-2 y solamente cuando llegaron a confluencia, nos sugirió que era en esta fase en la que se podrían expresar los RIL-2. Con la finalidad de evaluar la posible presencia de estos receptores se procedió a utilizar anticuerpos monoclonales específicos contra las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del mismo. Para ello se cosecharon células tanto en fase exponencial como saturante y se obtuvieron las fracciones enriquecidas de membrana y citosol. Las proteínas de ambas fracciones fueron separadas mediante SDS-PAGE y reveladas por Western-Blot. Nuestros resultados indican que las células de ambas líneas expresan RIL-2. Sin embargo mientras que en ambas se encontró expresada la cadena  $\beta$ , la cadena  $\alpha$  sólo se detectó en INBL (Figs. 5a y 5b). Es interesante mencionar que aunque ambas cadenas fueron detectadas en el citosol, la cadena  $\beta$  lo fue en la membrana celular. Por último mencionaremos que tal y como se esperaba los RIL-2 solo fueron detectados cuando las células se encontraban en fase de saturación.

## **INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE LAS LINEAS CALO E INBL BLOQUEADAS CON ANTI-RIL-2 $\alpha$ y $\beta$ EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE IL-2 EXOGENA**

Una vez detectado que la cadena  $\beta$  del RIL-2 se expresaba en CALO e INBL, se procedió a cultivar las células en presencia de anticuerpos monoclonales específicos contra esta cadena para evaluar si la proliferación inherente de estas células era dependiente de la activación de este receptor, ya que se ha demostrado que algunas células tumorales de origen epitelial son capaces de producir IL-2, y que ésta pudiera

ser la razón por la cual hayan adquirido inmortalidad. Se procedió por un lado a evaluar si producían IL-2 como por el otro si la proliferación de éstas podía ser inhibida si se bloqueaba la cadena expresada. Resultados del laboratorio encontraron que en efecto las células de ambas líneas celulares son capaces de producir IL-2, sin embargo, nosotros encontramos que al bloquear *in vitro* la cadena  $\beta$  del RIL-2 con anticuerpos monoclonales específicos se inhibía la proliferación de solo las células CALO (Figs. 6 y 7).

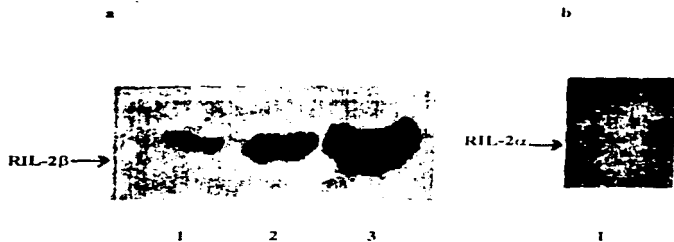


Fig. 5. Detección de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 en células tumorales de carcinoma de cérvix. Fracciones de membrana y citosol de las líneas CALO e INBL fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas mediante inmunoblot (a) la cadena  $\beta$  del RIL-2 se detectó en 1: fracción de citosol de células INBL en fase saturante, 2: fracción de citosol de células CALO en fase saturante y 3: fracción de membrana de células CALO fase saturante, y (b) la presencia de la cadena  $\alpha$  del RIL-2 únicamente fue detectada en 1: INBL fase saturante fracción de citosol.

Es de llamar la atención que aunque no pudimos detectar la presencia de la cadena  $\alpha$  del RIL-2 cuando se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$  también se presentó una inhibición semejante a la encontrada con anti- $\beta$  (Figs. 6 y 7). Es más cuando se utilizaron anticuerpos contra ambas cadenas en CALO la inhibición fue casi completa, lo cual nos hace suponer que esta última línea celular ha desarrollado una dependencia total de la IL-2 para su proliferación.

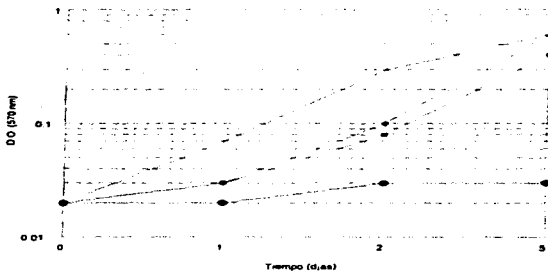


Fig. 6. Efecto de anticuerpos monoclonales sobre células CALO. Se bloqueó el 80% del RIL-2 $\alpha$  y  $\beta$ . Células no bloqueadas (\*), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\alpha$  (◆), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\beta$  (■), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\alpha$  y anti-RIL-2 $\beta$  (◐).



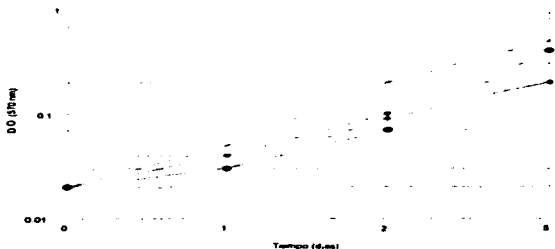


Fig. 7. Efecto de anticuerpos monoclonales sobre células INBL. Se bloqueó el 80% del RIL-2 $\alpha$  y RIL-2 $\beta$ . Células no bloqueadas ( $\blacktriangle$ ), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\beta$  ( $\blacksquare$ ), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\alpha$  ( $\bullet$ ), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\alpha$  y  $\beta$  ( $\blackstar$ ).

El hecho de haber detectado inhibición cuando se utilizó anti- $\alpha$ , nos puede indicar que sí existe el receptor de IL-2 para esta cadena, pero que el Western-Blot no lo detecta, por lo que consideramos sería recomendable evaluarlo por otra técnica más sensible.

Con la finalidad de evaluar si el efecto inhibitorio de la proliferación asociada al bloqueo de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 era reversible mediante la presencia de IL-2 exógena se cultivaron ambas líneas celulares en presencia de 100 U/ml de este factor. Nuestros resultados muestran que existe inhibición de la proliferación de ambas líneas celulares aún en presencia de ambos anticuerpos y con altas concentraciones de IL-2 (Figs. 8 y 9), al igual de lo que sucede cuando células de sangre periférica normales son utilizadas (Fig. 10). Sin embargo es interesante comentar que cuando se cultivaron las células en presencia de ambos anticuerpos la inhibición de INBL fue total (Figs. 8 y 9). Es de llamar la atención que cuando no estaba IL-2 exógena la línea celular que era inhibida completamente por la presencia de ambos anticuerpos era la CALO.

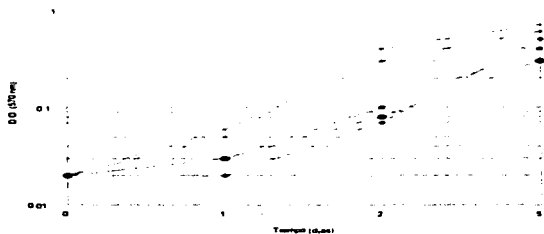


Fig. 8. Efecto de 10 U/ml de IL-2 sobre células CALO. Se bloqueó el 80% del RIL-2 $\alpha$  y RIL-2 $\beta$ . Células no bloqueadas y estimuladas (\*), células no bloqueadas y no estimuladas (•), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\alpha$  y estimuladas (◆), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\beta$  y estimuladas (■), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\alpha$  y  $\beta$  y estimuladas (◐). La mayor proliferación se observa en las células no bloqueadas y estimuladas.

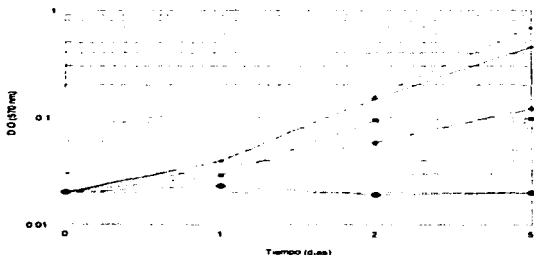
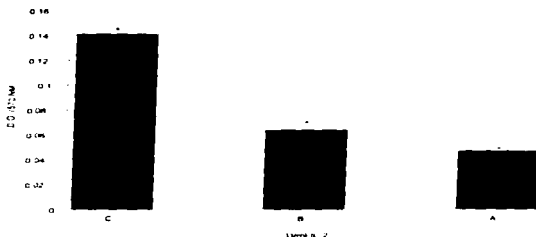


Fig. 9. Efecto de 100 U/ml de IL-2 sobre células INBL. Se bloqueó el 80% del RIL-2 $\alpha$  y RIL-2 $\beta$ . Células no bloqueadas y estimuladas (\*), células no bloqueadas y no estimuladas (•), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\alpha$  y estimuladas (◆), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\beta$  y estimuladas (■), células bloqueadas con anti-RIL-2 $\alpha$  y  $\beta$  y estimuladas (◐). Se observa que no existe proliferación en las células bloqueadas con ambos anticuerpos al estimular con 100 U/ml de IL-2.

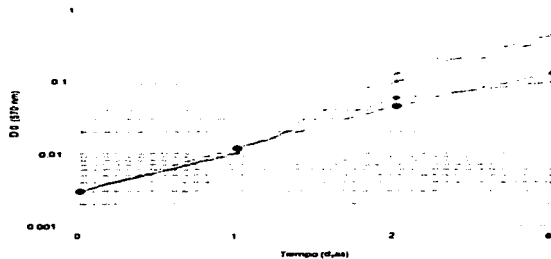


**Fig. 10** Actividad mitogénica de LSP normales bloqueados con anticuerpos monoclonales en presencia de IL-2. Los linfocitos fueron estimulados con 100 U/ml de IL-2 (C control), anti-RIL-2 $\beta$  + IL-2 (B), anti-RIL-2 $\alpha$  + IL-2 (A). Se observa una mayor activación mitogénica en el control.

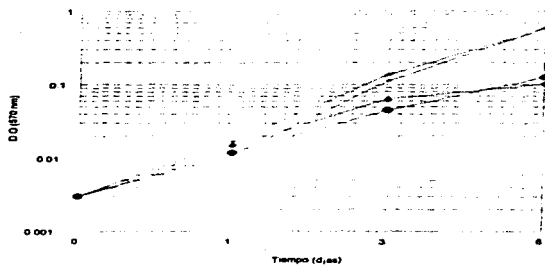
### LA CITOCINA IL-15 ES INCAPAZ DE INDUCIR LA PROLIFERACION DE LAS CELULAS CALO E INBL.

Como recientemente se ha encontrado que las cadenas  $\beta$  del RIL-2 son reconocidas por la IL-15 y además que la cadena  $\alpha$  del RIL-2 es similar a la cadena  $\alpha$  del RIL-15 se consideró interesante estimular a las células CALO e INBL con IL-15 para observar si esta citocina podría ejercer algún efecto proliferador. Con esta finalidad se realizaron cinéticas de proliferación tanto en células epiteliales normales como en células de las líneas CALO e INBL en presencia de 1, 10 y 100 ng/ml de IL-15 a 1, 3 y 6 días.

Nuestros resultados indican que en nuestras condiciones de cultivo la IL-15 no presentó actividad inductora alguna (Figs. 11a, 11b y 11c; 12a, 12b y 12c).

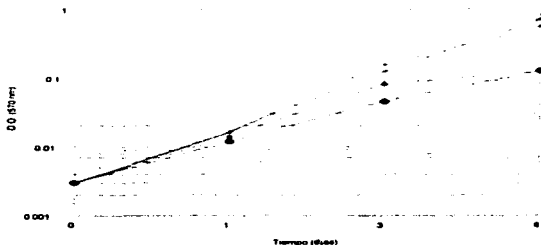


11a)



11b)

Fig. 11a y 11b. Efecto de 1 y 10 ng/ml de IL-15 en la proliferación de células CALO. Células tumorales no estimuladas (control negativo) (▲), células tumorales estimuladas (control positivo) (\*), epitelios normales estimulados (●) y células epiteliales normales no estimuladas (○). Se observa que las células tumorales estimuladas con las dos concentraciones de IL-15 no muestran una respuesta en su proliferación.



11c)

Fig. 11c. Efecto de 100 ng/ml de IL-15 en la proliferación de células CALO. Células tumorales no estimuladas (control negativo) (\*), células tumorales estimuladas (control positivo) (\*), epitelios normales estimulados (◆) y células epiteliales normales no estimuladas (●). Se observa que las células tumorales estimuladas con las dos concentraciones de IL-15 no muestran una respuesta en su proliferación.

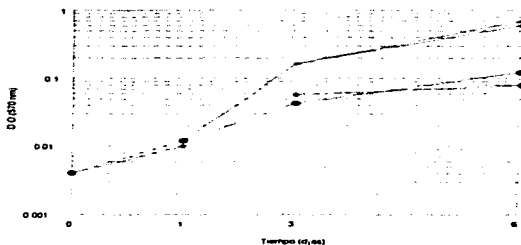
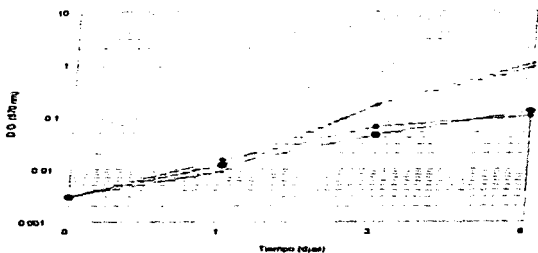
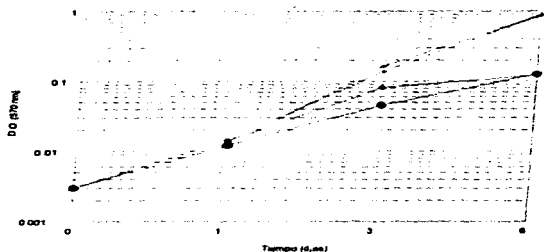


Fig. 12a. Efecto de 1 ng/ml de IL-15 en la proliferación de células INBL. Células tumorales no estimuladas (control negativo) (\*), células tumorales estimuladas (control positivo) (\*), epitelios normales estimulados (◆) y células epiteliales normales no estimuladas (●). Se observa que las células tumorales estimuladas con IL-15 no muestran una respuesta en su proliferación.



12b)



12c)

Fig. 12b y 12c. Efecto de (b) 10 y (c) 100 ng/ml de IL-15 en la proliferación de células INBL. Células tumorales no estimuladas (control negativo) (\*), células tumorales estimuladas (control positivo) (▲), epitelios normales estimulados (●) y células epiteliales normales no estimuladas (●). Se observa que las células tumorales estimuladas con las dos concentraciones de IL-15 no muestran una respuesta en su proliferación.

### EL BLOQUEO PARCIAL DE LA CADENA $\beta$ DEL RIL-2 INDUCE LA PROLIFERACION DE CALO E INBL.

Es conocido que cuando se bloquean un receptor de superficie aparte de inhibir la función asociada a este receptor se produce una señalización interna que en ocasiones activa a dicha célula a proliferar, como es el caso del anti-CD3 cuyo anticuerpo induce la proliferación de linfocitos (Azuma, 1994; Tamura, 1995). En consecuencia en este trabajo se cultivaron las células de CALO e INBL en presencia de bajas concentraciones de IL-15 y se bloqueó el 50% de la cadena  $\beta$  del RIL-2 para evaluar su posible efecto inductor. En efecto, a bajas concentraciones de anti- $\beta$  encontramos una significativa inducción a la proliferación de ambas líneas celulares (Figs. 13 y 14).

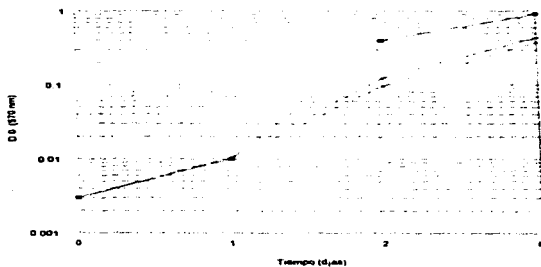


Fig. 13. Efecto de 1 ng/ml de IL-15 en la proliferación de células CALO. Se bloqueó el 50% de receptores para la cadena  $\beta$  del RIL-2. Células tumorales bloqueadas y estimuladas (●), células tumorales no bloqueadas y no estimuladas (control negativo) (\*), células tumorales no bloqueadas y estimuladas (control positivo) (○). Se observa que las células tumorales bloqueadas y estimuladas con IL-15, muestran una gran proliferación celular.

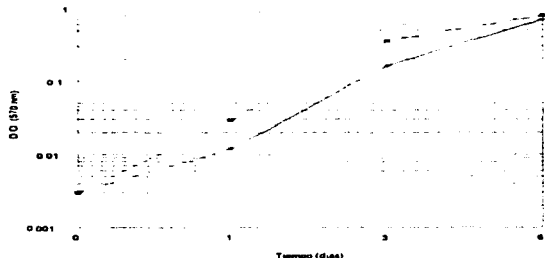


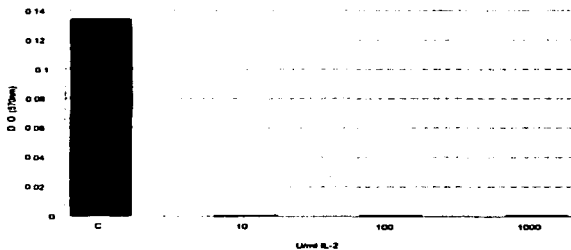
Fig. 14. Efecto de 1, ng/ml de IL-15 en la proliferación de células INBL. Se bloqueó el 50% de receptores para la cadena  $\beta$  del RIL-2. Células tumorales bloqueadas y estimuladas (■), células tumorales no bloqueadas y no estimuladas (control negativo) (\*), células tumorales no bloqueadas y estimuladas (control positivo) (\*). Se observa que las células tumorales bloqueadas y estimuladas con IL-15 muestran una gran proliferación celular.

#### CALO E INBL COMPITEN POR LA IL-2 EN CO-CULTIVOS CON LINFOCITOS CITOTÓXICOS.

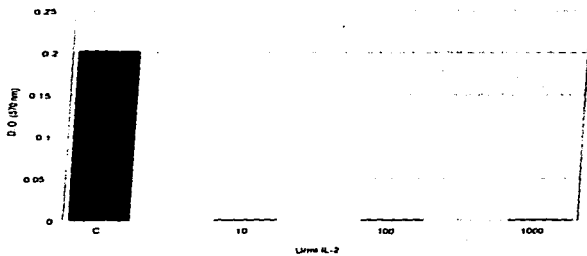
Es conocido que linfocitos de sangre periférica (LSP) estimulados con IL-2 u otros tipos de mitógenos como la fitohemaglutinina generan células asesinas naturales capaces de lisar células tumorales de manera inespecífica, por otro lado también se sabe que en cocultivo de LSP con células tumorales en presencia de IL-2 se genera una alta inducción a la proliferación de linfocitos T citotóxicos (CTL's) (Abbas, 1994). Con la finalidad de evaluar si las células de CALO e INBL a través de sus receptores para IL-2 son capaces de inhibir la proliferación y citotoxicidad de CTL's, se cultivaron LSP heterólogos de donadores normales en cocultivo con CALO e INBL en presencia de 10 y 100 U/ml de esta citocina por 21 días.



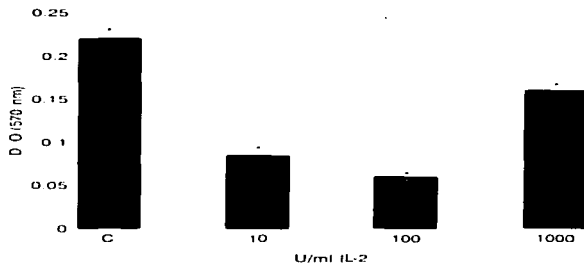
Nuestros resultados indican que aunque los LSP de donadores normales tenían en un principio la facultad de lisar totalmente las células tumorales (Figs. 15 y 16), al cabo de 21 días de cocultivo se redujo tanto la citotoxicidad de estos LSP (Figs. 17a y 18a), así como su inducción a la proliferación (Figs. 17b y 18b), lo cual indica que es probable que las células tumorales estén compitiendo por la IL-2. Por último para evaluar si esta competencia podría ser superada si se adicionaba una mayor concentración de IL-2 en nuestros cocultivos, también se realizaron ensayos con 1000 U/ml de IL-2. En efecto encontramos que a altas concentraciones del factor aumentaba un poco la citotoxicidad de estos CTL's y en gran medida la proliferación de los mismos (Figs. 17b y 18b).



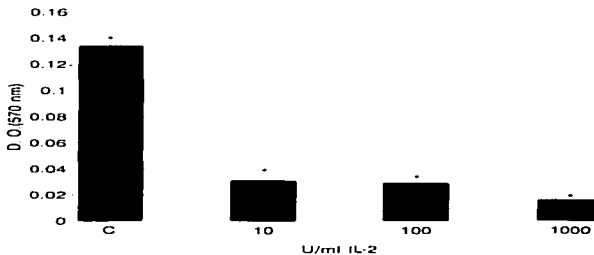
**Fig. 15.** Proliferación de CALO en co-cultivo. Los LSPN fueron co-cultivados en presencia de células tumorales durante 7 días con 10, 100 y 1000 U/ml de IL-2. (C: células tumorales con 10 U/ml de IL-2). No se observa proliferación de las células tumorales a las diferentes concentraciones de IL-2 utilizadas.



**Fig. 16.** Proliferación de INBL en co-cultivo. Las células fueron co-cultivadas con LSP normales durante 7 días con 10, 100 y 1000 U/ml de IL-2. (C: células tumorales con 10 U/ml de IL-2). No se observa proliferación de las células tumorales a las diferentes concentraciones de IL-2 utilizadas.

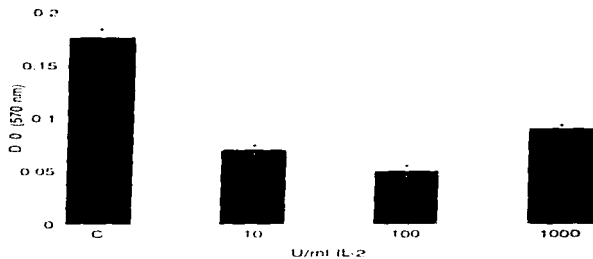


17a)

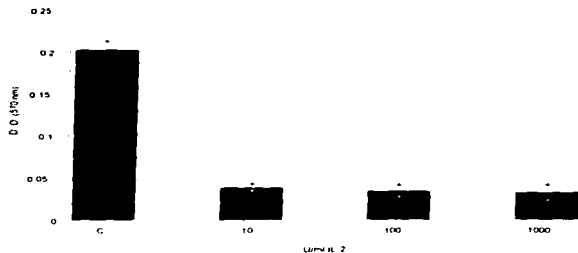


17b)

Fig. 17. Co-cultivos de células tumorales con linfocitos. (a) Actividad mitogénica de LSPN, (b), respuesta proliferativa de células CALO, evaluadas por la técnica del MTT. Los LSPN fueron co-cultivados en presencia de células tumorales en cultivos de 21 días con 10, 100 y 1000 U/ml de IL-2. (C: LSPN con 100 U/ml de IL-2; C: células tumorales con 10 U/ml de IL-2). No se observa proliferación tanto de linfocitos como de células tumorales.



18a



18b)

**Fig. 18.** Co-cultivos de células tumorales INBL con linfocitos. (a) Actividad mitogénica de LSPN; (b) respuesta proliferativa de células INBL, evaluadas por medio de la técnica de MTT. Los LSPN fueron co-cultivados en presencia de células tumorales en cultivos de 21 días con 10, 100 y 1000 U/ml de IL-2. (C: LSPN con 100 U/ml de IL-2, C: células tumorales con 10 U/ml de IL-2). No se observa proliferación de células tumorales ni de linfocitos.

## DISCUSION DE RESULTADOS

En la última década ha resurgido el interés por estudiar el problema del cáncer desde un punto de vista inmunológico con el propósito de conocer detalles de los mecanismos de escape que presentan dichas células. Estos estudios han proporcionado datos sobre las características de las células cancerosas que las distinguen de las normales y que permite que sean reconocidas por el sistema inmunológico. La investigación sobre los mecanismos de evasión inmunológica de las células tumorales y la capacidad de muchos tumores para persistir, constituye actualmente un campo de estudio en el que destaca la caracterización de antígenos tumorales, la presencia o ausencia de moléculas de adhesión, moléculas presentadoras de antígenos, así como el efecto de algunas citocinas, como las interleucinas, sobre la proliferación de células tumorales (Rosenberg, 1990). En particular, la Interleucina-2 (IL-2) es una citocina que estimula la proliferación de linfocitos T, células B, NK y monocitos (Waldmann, 1993) a través de sus receptores (RIL-2) a nivel de membrana (Taniguchi, 1993). El RIL-2 esta compuesto de tres cadenas o subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que al expresarse de manera diferencial permiten que se realicen combinaciones que dan como resultado un grado de afinidad baja, intermedia o alta con su ligando (Thezè, 1996). Recientemente se ha demostrado que este receptor no es exclusivo de células de origen hematopoyetico, ya que se ha detectado su presencia en células de origen no linfoide, como células tumorales epiteliales, en las cuales se induce o inhibe su proliferación en presencia de IL-2 exógena (Yasumura, 1994).

En los resultados aquí presentados demostramos que las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino (CaCu) CALO e INBL responden de manera diferencial a distintas concentraciones de IL-2 exógena, ya que a altas concentraciones se presenta una inhibición de la proliferación, mientras que con una concentración baja responden positivamente, los resultados obtenidos con incorporación de tritio y las cinéticas de

proliferación nos confirman esto, además indican que la respuesta a esta citocina parece estar en función del tiempo y la concentración utilizada. Las cinéticas de proliferación realizadas muestran que la línea CALO, estadio clínico IIB, parece requerir de mayor tiempo para responder a IL-2 mientras que la línea INBL estadio IVA responde casi de inmediato al estímulo de la citocina, de tal manera que el consumo de IL-2 parece estar en función del estadio clínico en donde las células en estadios iniciales consumen menos citocina que aquellas en estadios avanzados. Sin embargo, creemos conveniente repetir estos experimentos aumentando el número de muestras de líneas de CaCu en diferentes estadios clínicos para generalizar nuestros resultados. Ahora bien dado que las células normales no responden al efecto proliferativo de IL-2 y las tumorales si, podemos sugerir que durante el proceso de transformación neoplásica las células tumorales de CaCu adquieren la característica de responder al estímulo de IL-2. Por otra parte, si tomamos en cuenta que a mayor avance de la enfermedad la transformación neoplásica es mayor, entonces podemos esperar un comportamiento proliferativo diferente de acuerdo al estadio.

Por otro lado, el haber observado inducción a la proliferación con IL-2, nos sugirió que las células de CaCu deberían expresar el RIL-2, a través del cual se estaría llevando a cabo la activación a la proliferación. Sin embargo, es interesante mencionar que nuestros resultados indican que solamente la cadena  $\beta$  de este receptor se expresa en la membrana celular. También, suponemos que podría estar presente la cadena  $\alpha$ , ya que existe una adecuada respuesta proliferativa. Esta suposición se basa en los resultados con experimentos de disociación y afinidad de unión a la IL-2 en fibroblastos humanos (Sugamura, 1995), donde se observó que la expresión de la cadena  $\alpha$  sola o unida a la  $\gamma$  muestra una baja afinidad por la IL-2, y la cadena  $\beta$  o  $\gamma$  solas no poseen afinidad de unión a ella. De la misma forma ha sido demostrado que las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  forman un pseudo-receptor de alta afinidad que promueve una inadecuada transducción de señales, lo cual indica que no solamente la cadena  $\beta$  del

receptor para IL-2 es importante, sino que también la cadena  $\gamma$  se requiere para la transducción de señales intracelulares (Sugamura, 1995).

Por lo antes expuesto, las diferencias en las cinéticas de proliferación de las líneas podrían ser consecuencia de la unión de IL-2 a diferentes cadenas del RIL-2, esto explicaría porque INBL puede responder de una manera inmediata a IL-2 exógena a diferencia de CALO. Además el ensayo del Western-Blot en primer lugar, confirma que las líneas celulares expresan componentes del RIL-2 y en segundo lugar, muestra que dichos componentes tienen una distribución diferencial, aunque por el método de usado no se haya detectado la cadena  $\alpha$  en CALO, posiblemente por que la expresión de dicha proteína no es suficiente para ser detectada por esta técnica, por lo que se recomienda utilizar métodos más sensibles como el FACS o PCR para confirmar la presencia de esta cadena. Por otro lado, tanto CALO como INBL expresan la cadena  $\beta$  del receptor para IL-2, que por sí sola no es suficiente para desencadenar una respuesta proliferativa, a pesar de unirse a IL-2 (Weidmann, 1992), sin embargo, esta cadena suele estar asociada a la cadena  $\gamma$  con la cual forman el receptor de mediana afinidad que sí es capaz de inducir transducción de señales e inducir proliferación. Por tanto, debido a que la cadena  $\beta$  sola no induce activación celular, nosotros suponemos que la cadena  $\gamma$  debe estar presente, asociada a la cadena  $\beta$  detectada en ambas líneas celulares para que se pueda inducir una respuesta proliferativa como la observada.

Esta hipótesis se ve reforzada por los datos que muestran que CALO a bajas concentraciones de IL-2 prolifera, lo cual implica que debe existir cuando menos un receptor de mediana afinidad para inducir esta respuesta. Aunado a esto, la línea INBL además de la cadena  $\beta$  expresa la cadena  $\alpha$ , otro componente del RIL-2, la cual parece encontrarse en una concentración abundante que le permite ser detectada por el método de Western-Blot. En este caso dicha cadena  $\alpha$  al unirse a la cadena  $\beta$  puede

formar un pseudo receptor de alta afinidad como sucede en fibroblastos (Sugamura, 1995), que no es capaz de inducir transducción de señales adecuada, por lo tanto, la proliferación observada en nuestros ensayos, podría ser el resultado de la presencia de un receptor de alta afinidad conformado por las tres cadenas. Además, debemos considerar que esto es muy posible ya que se ha demostrado que la cadena  $\gamma$  guarda una gran asociación con la  $\beta$  ya que en los ensayos de precipitación con anticuerpos monoclonales específicos el anti- $\beta$  precipita con otra proteína de 64 kDa (cadena  $\gamma$ ) y cuando se precipita la cadena  $\gamma$  aparece una proteína de 75 kDa (cadena  $\beta$ ). Por lo cual, podemos pensar que en las células de CALO e INBL esta presente la cadena  $\gamma$  y aún cuando no se detecto con el Western-Blot, de lo contrario no podríamos observar respuesta proliferativa alguna en las células tumorales.

Por tanto, es posible que el complejo receptor de RIL-2 expresado en carcinomas humanos pueda estar constituido por tres subunidades o bien poseer cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  alteradas que impidan una adecuada transducción de señales (Lin, 1995). Por esta razón los eventos de transducción de señales mediados por el RIL-2 en las líneas celulares de carcinoma de cérvix deben ser investigados para esclarecer las vías de activación inducidas por IL-2 en este tipo de células.

Ahora bien, los resultados de expresión del RIL-2 también podrían correlacionarse con el estadio clínico del carcinoma del cual provienen las células, pensando en que las células tumorales pueden utilizar el RIL-2 para competir por el ligando con los linfocitos, lo cual impediría que se lleve a cabo la generación de CTL's. Si suponemos que en estadio IIB como en CALO las células se encuentran en fase de transformación, en camino de convertirse en un tumor metastásico, las células no requieren la presencia de un receptor de alta afinidad para poder competir con las células inmunes a diferencia de células en estadio terminal como INBL, que como consecuencia de su grado de transformación maligna expresa las dos cadenas del RIL-2 que les permite



formar el receptor de alta afinidad con el cual pueden consumir IL-2 eficientemente evadiendo el sistema inmunológico al competir por la IL-2 con los CTLs, de tal manera que las células tumorales pueden crecer a expensas de las citocinas, en particular IL-2, producidas por las células inmunocompetentes y así colonizar otros órganos.

Asimismo, pensamos que las células, en estadios avanzados expresan, en membrana, una mayor cantidad de receptores de alta afinidad que les permite transmitir señales de proliferación aún cuando la IL-2 se encuentre en baja concentración, no obstante medir la densidad de los receptores debe confirmarse en trabajos futuros. Si esto es lo que sucede durante la progresión del carcinoma de cérvix, podemos hablar de una competencia por IL-2 entre células tumorales y células inmunológicas, en donde las células tumorales tienen ventaja, ya que requieren una concentración 10 veces menor de IL-2 para proliferar a diferencia de los linfocitos, que requieren una concentración mayor. Ahora bien, si *in vitro*, las células tumorales requieren entre 5-10 U/ml de IL-2 para proliferar, estarían en ventaja sobre los LSP que en las mismas condiciones necesitan de 100 U/ml de citocina. Por tanto, a pesar de que se ha demostrado que *in vitro* los LSP de pacientes con cáncer de cérvix pueden proliferar y diferenciarse en condiciones controladas (Rangel, 1995), *in vivo* podrían estar expuestos a diferentes circunstancias como sería: 1) que no exista una concentración de citocina suficiente en el microambiente para que los linfocitos T puedan diferenciarse, ya que las células tumorales la estarían utilizando para expandirse a expensas de las citocinas secretadas durante la respuesta inmune; 2) que la población de linfocitos presentes en el infiltrado tumoral sea en su mayoría Th2 que se sabe produce citocinas como IL-10 que controla negativamente la respuesta inmune celular; 3) que las células tumorales produzcan algún factor inhibitorio que evite la activación de células inmunocompetentes, y 4) a la posible producción de factores que induzcan la apoptosis en linfocitos (Spits, 1992, Coventry, 1996).

La hipótesis de la competencia por la IL-2 entre LSP<sup>+</sup> y células de carcinoma de cérvix es de gran relevancia, ya que esto podría explicar por que, si el CaCu es un tumor capaz de despertar una respuesta inmunológica específica por su asociación a antígenos del papiloma virus humano (HPV), progresa y se convierte en un tumor metastásico (Brinton, 1992; Richart, 1993) por tanto si las células de CaCu expresan las cadenas del RIL-2, se podrían presentar diferentes asociaciones entre éstas y su ligando induciendo diferentes respuestas biológicas. Por esta razón, el carcinoma de cérvix no sería un buen candidato para someterse a un tratamiento de inmunoterapia adoptiva, ya que esta requiere de la administración de IL-2 vía sistémica para mantener la activación de las células citotóxicas, ya que se pueden tener efectos colaterales como la toxicidad de IL-2, además de favorecer la progresión del tumor a expensas de la citocina, tal como se ha reportado en pacientes con melanoma, en los cuales la administración de IL-2 produce metástasis (Han, 1996).

Por otra parte, se ha reportado que así como la IL-2, existen otras citocinas o factores de crecimiento que utilizan las cadenas  $\beta$  o  $\gamma$  del RIL-2 para generar una respuesta proliferativa o diferenciadora (Carson, 1994; Giri, 1994). Esto se ha demostrado recientemente con Interleucina-15 (IL-15), que es una citocina que tiene afinidad por las cadenas  $\beta$  o  $\gamma$  del RIL-2 y comparte algunas propiedades biológicas de esta citocina induciendo efectos similares en linfocitos (Grabstein, 1994). Debido a que IL-15 puede utilizar las cadenas  $\beta$  o  $\gamma$  del RIL-2 en células linfoides activadas pensamos que esto también podría estar ocurriendo en nuestro sistema, por lo cual se probó el efecto de IL-15 sobre la proliferación de ambas líneas celulares. Sin embargo, según nuestros resultados, la IL-15 no induce proliferación de las líneas, lo cual indica que no utiliza la cadena  $\beta$  del RIL-2 que presentan las células tumorales. Al utilizar un anticuerpo anti- $\beta$ , en presencia de IL-15, observamos una respuesta en la proliferación, lo cual nos indica que probablemente el anticuerpo este ocasionando un efecto mitogénico como el observado en linfocitos a los cuales al bloquear la molécula

CD3 con anticuerpos monoclonales específicos sobre ésta induce proliferación (Azuma, 1994; Tamura, 1995). Dicha respuesta también puede ser el resultado de alteraciones en las cadenas del RIL-2 en las células tumorales o bien a que la cadena  $\beta$  expresada en las células de CaCu induzca la activación de diferentes intermediarios de la transducción de señales en comparación a las vías activadas en linfocitos. Estas dos hipótesis se tienen que confirmar con estudios posteriores en los cuales se identifiquen los complejos moleculares que se activan por la unión de IL-2 a su receptor en células de CaCu.

Hasta el momento hemos demostrado la participación del RIL-2 en la proliferación de CALO e INBL, no obstante, observamos que este efecto puede ser disminuido o totalmente bloqueado al utilizar anticuerpos monoclonales dirigidos contra los componentes del RIL-2. El comportamiento de CALO bloqueada con anti- $\alpha$  es muy interesante, ya que durante los primeros días de cultivo en presencia de IL-2 no se observa proliferación celular, lo cual nos indica que a pesar de que no detectamos por Western-Blot la cadena  $\alpha$ , ésta es sintetizada aunque en una concentración tan baja que la técnica no la puede detectar. En este caso la cantidad de anticuerpo usado es suficiente para bloquear totalmente la respuesta inducida por este componente del receptor, impidiendo la proliferación celular, sin embargo, este efecto no se mantiene a lo largo del ensayo ya que se detecta proliferación celular a partir del día 2, lo cual sugiere que la cadena  $\alpha$  también puede ser inducida como respuesta a IL-2 internalizada por el receptor de mediana afinidad que se forma con la cadena  $\beta$ . Esta suposición se basa en reportes que indican que en linfocitos la cadena  $\alpha$  es sintetizada en las primeras dos hrs después de su activación, por lo cual no podemos descartar la posibilidad de que el mismo proceso se lleve a cabo en esta línea celular (Duprez, 1992; Ferrer, 1993).

Por su parte, los resultados obtenidos con INBL al bloquear la cadena  $\alpha$  fueron los esperados ya que si eliminamos uno de los componentes del receptor de alta afinidad la proliferación debe disminuir puesto existe una deficiencia para que IL-2 se una eficientemente a su receptor. En este punto no debemos olvidar que existe un 20% de receptor  $\alpha$  libre que puede formar con la cadena  $\beta$  (no bloqueada) el receptor de alta afinidad dando como resultado la proliferación observada. Independientemente del posible papel que parece tener la cadena  $\alpha$  libre sobre la proliferación de las células, debemos destacar la importancia de la cadena  $\beta$  en este proceso ya que se observa una mayor proliferación en ambas líneas celulares al bloquear la cadena  $\beta$ , este fenómeno apoya nuestra hipótesis de la presencia de la cadena  $\alpha$  y asociada a la  $\beta$  que puede formar un receptor de alta afinidad en estas células, en donde la cadena  $\beta$  realiza la transducción de la señal activando la proliferación a bajas concentraciones de IL-2 (Fung, 1991; Takeshita, 1992).

Por otro lado, al bloquear en ambas líneas la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  observamos que CALO no muestra diferencias en las cinéticas de proliferación obtenidas al utilizar cada uno de los anticuerpos por separado en presencia de IL-2, no obstante, sin la presencia de ésta no existe respuesta, con lo cual se confirma que la capacidad de estas células para responder a IL-2 es menor que la de INBL, que detiene su proliferación en presencia de ésta, lo cual sugiere que las células tumorales durante su transformación maligna pueden volverse dependientes de IL-2. En este momento podemos plantear que INBL expresa de manera constitutiva la cadena  $\beta$  e induce la expresión de la cadena  $\alpha$  y por eso responde a la citocina (Waldmann, 1993).

Las diferencias en la proliferación de las células bloqueadas con anti- $\alpha$  lo podríamos explicar en función de la densidad de receptores para ambas cadenas en este tipo celular, ya que al no ser detectada la cadena  $\alpha$ , nos indica que se expresa a un bajo porcentaje, no obstante es importante para la proliferación celular en ambas líneas.

Pensando que la cantidad de anticuerpos utilizados fue suficiente para bloquear los receptores de tal manera que la citocina no pudo actuar, sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con IL-2, bajo las mismas condiciones no se observó este efecto, por lo cual estamos en un punto en el que no encontramos otra posible explicación a este comportamiento, por lo que en trabajos futuros debemos realizar ensayos en los cuales se determine si es necesario que las células se encuentren previamente activadas o en fase exponencial para responder a IL-2 (Armitage, 1995; Warren, 1996).

Aunado a esto también debemos mencionar que las células de CaCu parecen estar sintetizando IL-2 de manera endógena (datos no mostrados) ya que en sobrenadantes de ambas líneas celulares se observó la presencia de IL-2, aunque no se ha mostrado la concentración ni su actividad biológica, lo cual será parte de una futura investigación. La producción activa por parte de las células de CaCu no sería raro, ya que se ha demostrado que células de melanoma que presentan el RIL-2 también sintetizan IL-2 biológicamente activa (Rimoldi, 1993; Aliléche, 1993).

Es conocido que el papel principal de IL-2 y otras citocinas es la activación y diferenciación de células inmunes como la células T, que llevan a cabo importantes funciones efectoras en infecciones virales, rechazo de órganos y tumores. Asimismo, se sabe que la mayoría de los tumores suelen estar infiltrados por células T activadas conocidos como linfocitos infiltrantes del tumor (TIL), los cuales deberían llevar a cabo la lisis de las células tumorales lo cual no sucede debido a que en muchas ocasiones no se encuentran activados (Coventry, 1996). Entre las explicaciones que se han dado a este fenómeno se encuentran: la desregulación de moléculas presentadoras de antígenos (MHC) en las células tumorales; inducción de células supresoras; síntesis de factores inhibidores por parte de las células tumorales; fallas en la expresión de IL-2 por las células CD4 Th2 o Th1; producción de supresores de IL-2

(Miescher, 1986; Spits, 1990; Coventry, 1996). Pero hasta el momento no se contaba con datos que demostraran que las células tumorales pudieran competir con los linfocitos T citotóxicos por citocinas necesarias para despertar y mantener su respuesta efectora. No obstante, estudios realizados hace algunos años con células tumorales de carcinoma de cérvix en co-cultivo autólogo con Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) no indicaban que no era posible proliferar o generar células citotóxicas específicas y en este tiempo se pensaba que las células tumorales podrían estar secretando al medio algún factor inhibidor de la proliferación de los linfocitos (Monroy, 1988; Rangel, 1992). Sin embargo, después de los resultados mostrados en este trabajo surge una nueva hipótesis sobre la competencia por IL-2 entre células tumorales y linfocitos.

Para confirmar esta hipótesis se realizaron nuevamente co-cultivos con LSP y células CALO e INBL y los resultados obtenidos indican que en un primer contacto durante 7 días entre células tumorales vivas con LSP se puede generar una gran respuesta citotóxica de los LSP contra las células tumorales, esto es debido a un reconocimiento inespecífico por células NK, macrófagos y monocitos que realizan una actividad lítica sobre las células reconocidas como extrañas (Abbas, 1994).

Contrario a lo esperado, la evaluación de LSP a 21 días muestra una disminución de la población en casi un 50 %, y las células tumorales siguen presentes en el co-cultivo, lo cual nos hace reforzar nuestra hipótesis de competencia, en donde las células tumorales crecen a expensas de la IL-2, mientras que las células citotóxicas específicas generadas no cuentan con suficiente IL-2 para mantener su proliferación. Es evidente que se requiere confirmar el consumo de IL-2 en los co-cultivos en particular en el primer tiempo en el que detectamos que las células tumorales comienzan a proliferar.

Evidentemente la información descrita en este trabajo es de gran interés ya que proporciona información acerca de los posibles mecanismos que las células de carcinoma de cérvix utilizan para crecer a expensas del huésped y escapar del reconocimiento inmunológico, por medio de un consumo de IL-2 endógena (producida por los LSP activados), que impide la diferenciación de precursores de células citotóxicas encargadas de la eliminación de células alteradas. Dado que las células tumorales en estadios tempranos parecen expresar solo cadenas del RIL-2 de baja o mediana afinidad, las células podrían presentar un crecimiento casi normal y al mismo tiempo permitir que dichas células induzcan una respuesta inmune generando CTLs los cuales controlarían la progresión tumoral. Si esta idea se confirma daríamos una posible respuesta a por qué este tipo de tumor requiere de 5-10 años para convertirse en un cáncer invasor, además de proporcionar información sobre los mecanismos de escape inmunológico del carcinoma de cérvix.

## CONCLUSIONES

- Las células tumorales CALO presentan la cadena  $\beta$  del RIL-2. Las células tumorales INBL expresan la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2, con los cuales pueden formar un pseudoreceptor de alta afinidad.
- Los receptores expresados en las células CALO e INBL son funcionales debido a la respuesta observada en la proliferación ante el estímulo de IL-2.
- La presencia de anticuerpos monoclonales específicos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RIL-2 inhiben la proliferación de las células CALO e INBL, se sugiere dependencia de estas células por IL-2.
- Las células CALO e INBL no proliferan ante el estímulo de IL-15.
- Existe competencia por IL-2 entre las células tumorales CALO e INBL y Linfocitos de Sangre Periférica Normal.



## BIBLIOGRAFIA

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. 1994. Cellular and molecular immunology. Edit. W. B. U.S.A. pp. 145-157.
- Aggarwal B. B., Gutterman J. U. 1992. Human cytokines: Handbook for basic and clinical research. Blackwell Scientific Publications., U.S.A., pp. 1-441.
- Agostini C., Trent L., Faccio M., Sancetta R., Cerutti A., Tassinari C., Cimarosto L., Adami F., Cipriani A., Zambello R., Semenzato, G. 1996. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 157: 910.
- Alilèche A., Plaisance S., Han D. S., Rubinstein E., Mingari C., Bellomo R., Jasmin C., Azzarone B. 1993. Human melanoma cell line M14 secretes functional interleukin 2. *Oncogene* 8: 1791.
- Alilèche A., Plaisance S., Assier E., Sahrnoui Y., Clemenceau C., Metivier D., Brouty-Boyer D., Jasmin C., Azzarone B. 1994. IL-2 production by myofibroblasts from post-radiation fibrosis in breast cancer patients. *Internat. Immunol.* 6: 1585.
- Anderson D. M., Kumaki S., Ahdieh M., Bertles J., Tometsko M., Loomis A., Giri J., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Valentine V., Shapiro D. N., Morris S. W., Park L. S., Cosman D. 1995a. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor  $\alpha$  chain and close linkage of IL-15RA and IL-2RA genes. *J. Biol. Chem.* 270: 29862.
- Anderson D. M., Johnson L., Glaccum B. M., Copeland G. N., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Valentine V., Kirstein M. N., Shapiro D. N., Morris S. W., Grabstein K., Cosman, D. 1995b. Chromosomal Assignment and genomic structure of IL-15. *Genomics* 25: 701.
- Armitage J. R., Macduff B. M., Eisenman J., Paxton R., Grabstein H. K. 1995. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J. of Immunol.* 154: 483.
- Armitage R. J., Macduff B. M., Spriggs M. K., Fanslow W. C., 1993. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J. Immunol.* 150: 3671.
- Arzt E., Steizer U., Renner M., Lange O., Muller A., Stalla G.K., 1992. Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. *J. Clin. Invest.* 90:1944.

- Azuma A., Yagita H., Okumura K., Kudo S., Nijitani H. 1994. Potentiation of long-term-cultured lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against small-cell lung carcinoma by anti-CD3 x anti-(tumor -associated antigen) bispecific antibody. *Cancer Immunol. Immunother.* 38:294.
- Bamford R., Grant J., Burton C., Peters G., Kurys C., Goldman J., Brennan E., Roessler., Waldmann T. 1994. The interleukin (IL-) 2 receptor  $\beta$  chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4940.
- Baxevanis C. N., Dedoussis G.V., Papodopoulos N.G., Missitzis Y.. 1994. Tumor specific cytotoxicity by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer* 74:1275.
- Bazan J. F. 1990a. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today* 11: 350.
- Bazan J. F. 1990b. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptors superfamily. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 87:6934.
- Benveniste E. N., Merrill J. E. 1986. Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by interleukin-2. *Nature* 321: 610.
- Boehm K. D., Kelley M. F., Ilan J. 1989. The interleukin-2 gene is expressed in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 656.
- Bosco M. C., Espinoza D., Schwabe M., Russell S.M., Leonard W.L., Longo D.L., Varesio L. 1994. The  $\gamma$  subunit of the interleukin-2 receptor is expressed in human monocytes and modulated by interleukin-2, interferon- $\gamma$ , and transforming growth factor  $\beta$ 1. *Blood*. 83: 3462.
- Brinton L.A. 1992. Epidemiology of cervical cancer-overview. In: N. Muñoz, F.X. Bosch, K. V. Shah, A. Meheus (eds.), *The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer*, pp. 3-22. Oxford University Press, Oxford.
- Caligiuri M. A., Zmuidzinis A., Manley T.J., Smith K.A., Ritz J.. 1990. Functional consequences of interleukin-2 receptor expression on resting human lymphocytes: identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* 171: 1509.
- Carson W. E., Eisenmann J., Grabstein K., Linett M.L., Ahdieh M., Anderson D.M., Eisenmann J., Grabstein K., Caligiuri M.A. 1994. Interleukin (IL) 15 a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 180: 1395.

- Ciacci C., Dignass M. A., Koizumi M., Podolsky D. K. 1993. Functional interleukin 2 receptors on intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 92:527.
- Cosman D., Ceretti D.P., Larsen A., Prk L., March C., Dower S., Gills S., Urdall D. 1984. Cloning, sequencing and expression of human interleukin-2 receptor. *Nature* 312: 768.
- Cosman D., Lyman S. D., Idzerda R. L., Beckmann M. P., Park L. S., Goodwin R. G., March C. J. 1990. A new cytokine receptor superfamily. *TIBS* 15: 265.
- Coventry B. J., Weeks S. C., Heckford S.E., Sykes P. J., Bradley J., Skinner J. M. 1996. Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma. 156:3486.
- Chae D. W., Nosaka Y., Strom B. T., Maslinski Włodzimirz. 1996. Distribution of IL-15 receptor  $\alpha$ -chains on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor Expression. 157: 2813.
- D'Andrea A. D., Lodish H. F., Wong G. G. 1989. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57: 277.
- De Vita V. T., Helman S., Rosenberg S. 1989. Cancer: principles and practice of oncology. 3a. de. J.B. Lippincott Co. U.S.A. PP:149-347.
- Dignass A. U., Podolsky D. K. 1996. Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 225: 422.
- Doherty T. M., Seder R. A., Sher A. 1996. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J. Immunol.* 156: 735.
- Dukovich M., Wano Y., Thuy J. B., Katz P., Cullen B. R., Kehr J. H., Greene W. C. 1987. A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors. *Nature* 327:518.
- Duprez V., Ferrer M., Dautry-Varsat, D. 1992. High-affinity interleukin 2 receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chains are internalized and remain associated inside the cells after interleukin 2 endocytosis. *J. Biol. Chem.* 267: 18639.
- Duprez V., Cornet V., Dautry-Varsat A. 1988. Down regulation of high-affinity interleukin 2 receptors in a human tumor T cell line: IL-2 increases the rate of surface receptor decay. *J. Biol. Chem.* 263: 12860.
- Duprez V., Dautry-Varsat A. 1986. Receptor mediated endocytosis of interleukin 2 in a human tumor T cell line: degradation of interleukin 2 and evidence for the absence of recycling of interleukin 2 receptors. *J. Biol. Chem.* 261:15450.

- Eitan S., Zisling R., Cohen A., Belkin M., Hirschberg D. L., Lotan M. y Schartz M. 1992. Identification of an interleukin-2-like substance as a factor cytotoxic to oligodendrocytes and associated with central nervous system regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:5442.
- Ferrer M., Hémar V., Duprez A., Hellio R., Dautry-Varsat A. 1993. Both the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of high-affinity interleukin 2 receptors are located in intracellular vesicles when their ligand is endocytosed. *Eur. J. Cell. Biol.* 60: 276.
- Fujii M., Sugamura K., Sano M., Nakai K., Sugita H. 1986. High-affinity receptor-mediated internalization and degradation of IL-2 in human T cells. *J. Exp. Med.* 163: 550.
- Fung M. R., Ju G., Greene W. C. 1988. Co-internalization of the p55 and p70 subunits of the high-affinity human interleukin 2 receptor. *J. Exp. Med.* 168: 1923.
- Fung M. R., Seearce R. M., Hoffman J. A., Peffer N. J., Hammes S. R., Hosking J. B., Schmandt R., Kuziel, Greene W. C. 1991. A tyrosine kinase physically associates with the  $\beta$ -subunit of the human IL-2 receptor. *J. Immunol.* 147: 1253.
- Germain R. N., Margulies D. H. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 403.
- Giri J. G., Kumaki S., Ahdieh M., Friend D. J., Loomis A., Shanebeck K., DuBoise R., Cosman D., Park L. S., Anderson D. M. 1995. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 14: 3654.
- Giri J. G., Ahdieh J., Eisenman K., Shanebeck K., Grabstein S., Kumaki A., Namen L., Park S., Cosman D., Anderson D. 1994. Utilization of the  $\beta$  and  $\gamma$  chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 13: 2822.
- Grabstein K. H., Eisenman J., Shanebeck K., Rauch C., Srinivasan S., Fung V., Beers C., Richardson J., Schoenborn M. A., Ahdieh M., Johnson L., Alderson M. R., Watson J. D., Anderson D. M., Giri J. G. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the  $\beta$  chain of the interleukin 2 receptor. *Science (Wash. DC).* 264: 965.
- Greene W. C., Leonard W. J. 1986. The human interleukin-2 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 69.
- Greene W. C., Robb R. J., Svetlik P. B., Rusk G. M., Depper J. M., Leonard W. J. 1985. Stable expression of cDNA encoding the human interleukin-2 receptor in eukaryotic cells. *J. Exp. Med.* 162:363.

- Guagliardi L. E., Koppelman B., Blum J. S., Marks M. S., Cresswell P., Brodsky F. M. 1990. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature*. 343: 133.
- Han D. S., Pottin-Clemenceau C., Imro M. A., Scudeletti M., Doucet C., Puppo F., Brouty Boyé D., Vedrenne J., Sahraoui Y., Brailly H., Poggi A., Jasmin C., Azzarone B., Indiveri F. 1996. IL-2 triggers a tumor progression process in a melanoma cell line MELP, derived from a patient whose metastasis increased in size during IL-2/INF- $\alpha$  biotherapy. *Oncogene* 12: 1015.
- Hanks S. K., Quinn A. M., Hunter T. 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42.
- Hatakeyama M., Kawahara A., Mori H., Taniguchi T. 1992. c-fos gene induction by interleukin 2 receptor: Identification of the critical cytoplasmic regions within the interleukin 2 receptor  $\beta$  chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 2022.
- Hatakeyama M., Kono T., Kobayashi N., Kawahara A., Levin S. D., Perlmutter R. M., Taniguchi T. 1991. Interaction of the IL-2 receptor with the *src*-family kinase p56. Identification of novel intermolecular association. *Science* 252: 1523.
- Hatakeyama M., M. Tsudo, S. Minamoto, T. Kono, T. Doi, Miyata M., Miyasaka, T. Taniguchi. 1989. Interleukin-2 receptor  $\beta$  chain gene: generation of *trc* receptor forms by cloned human  $\alpha$  and  $\beta$  chain cDNA's. *Science (Wash. DC)*. 244: 551.
- Hatakeyama M., Minamoto S., Uchiyama T., Hardy R. R., Yamada G., Taniguchi T. 1985. Reconstitution of functional receptor for human interleukin-2 in mouse cells. *Nature* 318:467.
- Hemar A., Dautry-Varsat A. 1990. Cyclosporin A inhibits the interleukin 2 receptor  $\alpha$  chain gene transcription but not its cell surface expression: the  $\alpha$  chain stability can explain this discrepancy. *Eur. J. Immunol.* 20: 2629.
- Henkart P. A. 1985. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 31.
- Heys S. D., Kernohan NM., Murray JB., Walker F., Eremi O. 1994. Expression of the intermediate affinity interleukin 2 receptor by a human solid tumour cell line: evidence for functional activity. *Internat. J. Oncol.* 5:931.
- Hicks C., Cooley M. A., Penney R. 1991. Investigation of interleukin 2 receptor on human endothelial cells. *Growth Factors*. 5: 201.

Johnston J. A., Kawamura M., Kirken R. A., Chen Y. Q., Blake T. B., Shibuya K., Ortaldo J. R., McVicar W. D., O'Shea J. J. 1994. Phosphorylation and activation of the Jak-3 janus kinase in response to interleukin 2. *Nature (Lond.)*. 370:151.

Kägi D., Ledermann B., Bürki K., Zinkernagel R. M., Hengartner Hans. 1995. Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: mechanisms and significance. *Immunol. Rev.* 146: 95.

Kanakura Y., Sugahara H., Mitsui H., Ikeda H., Furitsu T., Yagura H., Kitayama H., Kanayama Y., Matuzawa Y. 1993. Functional expression of interleukin 2 receptor in a human factor-dependent megakaryoblastic leukemia cell line: evidence that granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits interleukin 2 binding to its receptor. *Cancer Res.* 53: 675.

Kaplan D. 1996. Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines. *Immunol. Today.* 17:303.

Katano M., Matsuo T., Morisaki T., Naito K., Nagumo F., Kubota E., Nakamura M., Hisatsugu T., Tadano J. 1994. Increased proliferation of a human breast carcinoma cell line by recombinant interleukin-2. *Cancer Immunol. Immunother.* 39: 161.

Kay A. B. 1992. "Helper" (CD4+) T cells and eosinophils in allergy and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 522.

Kondo M., Takeshita T., Ishii N., Nakamura Y., Arai K. Y., Sugamura K. 1993. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science.* 262: 1874.

Kodo T., Doi T., Yamada G., Hatakeyama M., Minamoto S., Tsudo M., Miyasaka M., Miyata T., Taniguchi T. 1990. Murine interleukin 2 receptor  $\beta$  chain: Dysregulated gene expression in lymphoma line EL-4 caused by a promoter insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1806-1810.

Lahm H., Petral-Malec D., Yilmaz-Ceyhan A., Fischer J. R., Lorenzoni M., Givel J. C., Odartchenko N. 1992. Growth stimulation of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin-1 and 6 and antagonistic effects of transforming growth factor  $\beta_1$ . *Europ. J. Cancer.* 28A:1899.

Lazcano E. C., Nájera A. P., Alonso R. P., Buiatti E., Hernández A. M. 1996. Programa de detección oportuna de cáncer cervical en México. Diagnóstico situacional. *Rev. Inst. Nal. Cancerología.* 42: 123.

Lenardo M. J. 1991. Interleukin-2 programs mouse  $\alpha\beta$  T Lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353:858.

- Lin W. C., Yasumura S., Suminami Y., Sung M. W., Nagashima S., Stanson J., Whiteside T. 1995. Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells, expression of receptor, and tumor cell growth. *Journal of Immunology*. 155: 4805.
- Mayor S., Presley J. F., Maxfield F. R. 1993. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell Biol.* 121: 1257.
- Meager A. 1991. Cytokines. Prentice Hall Advanced reference Series. U.S.A. pp.29-78
- McInnes Y. B., Al-Mughales A., Field M., Leung B. P., Huang F., Dixon R., Sturrock R. D., Wilkinson P. C., Liew F. Y. 1996. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nature Med.* 2: 175.
- McMillan D. N., Kernohan N. M., Flett M. E., Heys S. D., Deehan D. J., Sewell H. F., Walker F., Eremin O. 1995. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localisation in human solid tumour cells *in situ* and *in vitro*: evidence for a direct role in the regulation of tumour cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 60: 776.
- Meazza R., Verdiani S., Biassoni R., Coppolecchia M., Gaggero A., Oregio A., Colombo M., Azzarone B., Ferrini S. 1996. Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene*. 12: 2187.
- Miescher S., Whiteside T. L., Carrel S., Flidner V., 1986. 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.* 136:1899.
- Miki S., Masayuki Y., Miki Y., Yamanoto M., Tang B., Yokokawa K., Sonada T., Hirano T., Kishimoto T. 1989. Interleukin-6 (IL-6) functions as an *in vitro* autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett.* 250: 607.
- Minami Y., Kono T., Miyazaki T., Taniguchi T. 1993. The IL-2receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11:245.
- Miura O., D'Andrea A., Kabat D., Ihle J. N. 1991. Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4895.
- Miyazaki T., Kawahara A., Fujii H., Nakagawa Y., Minami Y., Liu Z. L., Oishi L., Silvennoinen O., Withuhn B. A., Ihle J. N., Taniguchi T. 1994. Functional activation of Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*. 266: 1045.

Miyazaki T., Maruyama M., Yamada G., Hatakeyama M., Taniguchi T. 1991. The integrity of the conserved "WS motif" common to IL-2 and other cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction. *EMBO J.* 10: 3191.

Mizel S. B. 1989. The interleukins. *FASEB J.* 3: 2379.

Monroy G. 1988. Activación a la proliferación y conjugación de linfocitos por medio del co-cultivo de leucocitos de sangre periférica humana con estirpes celulares provenientes de diferentes tumores y el efecto de interleucina-2 en este proceso. Tesis de licenciatura. U.N.A.M.

Mori A., Suko M., Tsuruoka N., Kaminuma O., Ohmura T., Nishizaki Y., Okudaira H. 1995. Allergen-specific human T cell clones produce IL-5 upon stimulation with Th1 cytokine, IL-2. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 220.

Mori A., Suko M., Kaminuma O., Inoue S., Ohura T., Nishizaki Y., Nagahori T., Asakura Y., Hoshino A., Okumura Y., Sato G., Ito K. y Okudaira H. 1996. IL-15 promotes cytokine production of human T helper cells. *J. Immunol.* 156: 2400.

Mori H., Barsoumian E. L., Hatakeyama M., Taniguchi T. 1991. Signal transduction by interleukin 2 receptor  $\beta$  chain: importance of the structural integrity as revealed by site-directed mutagenesis and generation of chimeric receptors. *Int. Immunol.* 3: 149.

Nabholz M., Combe M. C., Corhesy P., Lowenthal J., Gabathuler R., 1987. Interleukin 2 receptor traffic in a murine cytolytic T cell line. *Eur. J. Immunol.* 17: 783.

Naume B., Gately M., Espevik T., 1992. A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-12, and IL-7- induced effects on immunomagnetically purified CD56+ NK cells. *J. Immunol.* 148: 2429.

Nistico G., De Sarro G. 1991. Is interleukin 2 a neuromodulator in de brain? *Trends Neurosci.* 14:146.

Noguchi M., Nakamura Y., Russel S. M., Ziegler S. F., Tsang M., Cao C., Leonard W. J. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the IL-7 receptor. *Science.* 262: 1877.

Okatomo Y., Minamoto S., Shimizu K., Mogami H., Taniguchi T. 1990. Interleukin 2 receptor  $\beta$  chain expressed in an oligodendrogloma line binds interleukin 2 and delivers growth signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6584.

Paciotti G. F., Tamarkin L. 1988. Interleukin-2 differentially affects the proliferation of a hormone-dependent and a hormone-independent human breast cancer cell line *in vitro* an *in vivo*. *Anticancer Res.* 8: 1233.



- Parmiani G. 1990. An explanation of the variable clinical response to interleukin 2 and LAK cells. *Immunol. Today*. 11:113.
- Plaisance S., Rubinstein E., Alilèche A., Benoit P., Jasmin C., Azzarone B. 1993. The IL-2 receptor present on human embryonic fibroblasts is functional in the absence of p64/IL-2R $\gamma$  chain. *Int. Immunol.* 5: 843.
- Plaisance S., Rubinstein E., Alilèche A., Sahraoui Y., Krief P., Augery-Bourget Y., Jasmin C., Suarez H., Azzarone B. 1992. Expression of interleukin-2 receptor on human fibroblasts and its biological significance. *Int. Immunol.* 4: 739.
- Pontén J., Adami H. O., Bergström R., Dillner J., Friberg L. G., Gustafsson L., Miller A. B., Parkin D. M., Sparén P., Trichopoulos, D. 1995. Strategies for global control of cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 60: 1.
- Quinn L. S., Haugk K. L., Grabstein K. H. 1995. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology.* 136: 3669.
- Rangel C., Monroy G., Rocha Z., Trejo B., Ramírez G., Méndez M., Weiss S. 1992. Proliferación de leucocitos de sangre periférica en presencia de sueros de pacientes con cáncer cervicouterino e interleucina-2 recombinante. *Cancerología.* 38:1547.
- Rangel R., Rocha L., Ramírez J.L., Ibarra M.J., Solorza G., Monroy A., Ramírez A., M. Herrera A., Weiss-Steider B. 1995. Generation of memory CD4+, CD8+, CD45RO+ and CD16- lymphocytes activated with IL-2, INF- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  with specific cytotoxicity against autologous cervical cancer cells in a mixed leukocyte-tumour cell culture. *Eur. Cytokine Netw.* 6:195.
- Reinecker H.C. y Podolsky DK. 1995. Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common  $\gamma$  chain of the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8353.
- Richart R.M., Wright T.C. 1993. Controversies in the management of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 71:1413.
- Rimoldi D., Salvi S., Hartmann F., Schreyer M., Blum S., Zofragos L., Plaisance S., Azzarone B., Carrel S. 1993. Expression of IL-2 receptors in human melanoma cells. *Anticancer Res.* 13: 555.
- Robertson M. J., Soiffer R. J., Wolf S. F., Manley T. J., Donahue C., Young D. D., Herrmann S. H., Ritz J. 1992. Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferatin of NK cell are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med.* 175: 779.

- Rosenberg S. A., Lotze M. T., Muul L. M., Chang A. E., Avis F. P., Leitman S., Linehan W. M., Robertson C. N., Lee R. E., Rubin J.T., Seipp C. A., Simpson C. G., White D. E. 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin 2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316: 889.
- Rosenberg S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C., Aebersold, P.M., Linehan, W.M., Seipp, C.A., White, D.E. 1989. Experience with the use of high-dose of interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Annu. Surg.* 210:474
- Rosenberg S.A., 1990. Inmunoterapia del cáncer. *Inv. y Ciencia* 26:34
- Rubin L. A., Kutman C. C., Fritz M. E., Biddison W. E., Boutin B., Yarchoan R., Nelson D. L. 1985. Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells *in vitro*. *J. Immunol.* 135: 3172.
- Russel S. M., Keegan Y., Harada N., Nakamura Y., Noguchi M., Leland P., Friedmann M. C., Miyajima A., Puri P. K., Paul W. E., Leonard W. J., 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the IL-4 receptor. *Science* 262: 1880.
- Saito Y., Tada H., Sabe H., Honjo T. 1991. Biochemical evidence for a third chain of the interleukin-2 receptor. *J. Biol. Chem.* 266:22186.
- Sharon M., Klausner R. D., Cullen B. R., Chizzonite R., Leonard W. J. 1986. Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions. *Science* 234:859-863.
- Smith K.A. 1980. T-cell growth factor. *Immunol. Rev.* 51:337.
- Smith K. A. 1984. Interleukin -2. *Annu. Rev. Immunol.* 2:319.
- Smith K. A. 1988. Interleukin -2: Inception, impact and implications. *Science* 240: 1169.
- Smith K. A. 1989. The interleukin 2 receptor. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 5: 397.
- Spits H., R. de Waal Malefyt. 1992. Functional characterisation of human IL-10. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 99:8.
- Subtil A., Hémar A., Dautry-Varsat A. 1994. Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *J. Cell Sci.* 107: 3468.
- Sugamura K. 1995. Common  $\gamma$ -chain for multiple cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 227.

- Takeshita T., Asao H., Ohtani K., Ishii N., Kumaki S., Tanaka, N., Munakata H., Nakamura M., Sugamura K. 1992. Cloning of the  $\gamma$  chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257:379.
- Takeshita T., Asao H., Suzuki J., Sugamura K. 1990. An associated molecule, p64, with high affinity interleukin 2 receptor. *Int. Immunol.* 2: 477.
- Takeshita T., Ohtani K., Asao H., Kumaki S., Nakamura M., Sugamura K. 1992. An associate molecule, p64, with IL-2 receptor  $\beta$  chain: its possible involvement in the formation of the functional intermediate-affinity IL-2 receptor complex. *J. Immunol.* 148: 2154.
- Tamura T., Nakano H., Nagase H., Morokata T., Igarashi O., Oshimi Y., Miyazaki S., Nariuchi H. 1995. Early activation signal transduction pathways of Th1 and Th2 cell clones Stimulated with anti-CD3. *J. Immunol.* 155:4692.
- Taniguchi T., Minami Y. 1993. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. (Review) *Cell.* 73:5.
- Taniguchi T. 1995. Cytokine signaling through receptor protein tyrosine kinases. *Science.* 268: 251.
- Thèze J., Alzari P. M., Bertoglio J. 1996. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today.* 17: 481-486.
- Tsai S. C. y Gaffney E. V. 1987. Modulation of cell proliferation by human recombinant interleukin 1 and interferon. *J. Nat. Cancer Inst.* 79: 77.
- Tsuda M., Kitamura F., Miyasaka M. 1989. Characterization of the interleukin-2 receptor  $\beta$  chain using three distinct monoclonal antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:1982.
- Von Boehmer, H. Editor 1989. Lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology.* 4: 164.
- Von Kleist S., J. Berling, W. Bohle, y C. Witt and. 1987. Immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations infiltrating breast carcinomas and benign lesions. *Int. J. Cancer* 40:18.
- Voss S. D., Leary T. P., Sondel P M. y Robb R. J. 1993. Identification of a direct interaction between interleukin-2 and the p64 interleukin -2 receptor gamma chain . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2428.

- Voss S. D., P. M. Sondel y R. J. Robb. 1992. Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated *in vivo* by IL-2: association of the p64  $\gamma$  chain with the IL-2R $\beta$  chain in functional intermediate-affinity IL-2R. *J. Exp. Med.* 176: 531.
- Waldmann T. A. 1993. The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Review Immunol. Today* 14:264
- Waldmann T. A. 1986. The Structure, Function and Expression of Interleukin-2 Receptors on Normal and Malignant Lymphocytes. *Science* 242: 727.
- Waldmann T. A. 1989. The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 1989. 58:875.
- Waldmann, T. A. 1991. The Interleukin-2 receptor. *Biol. Chem.* 266: 2684.
- Waldmann, T. A., Goldman, C. K., Robb, R. J., Goldman, W. C. 1984. Expression of interleukin-2 receptors on activated human B cells. *J. Exp. Med.* 160: 1450.
- Warren H. S., Kinnear F. B., Kastelein R. L., Lippman L. L. 1996. Analysis of the coestimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56 dim) Human NK cells. *J. Immunol.* 156: 3254.
- Warren J., Leonard M.D. 1996. The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Med.* 47: 229.
- Weidmann M. E., Sacchi M., Plaisance S., Hebbada P., Yasumura S., Lin W C., Johnson J L., Herberman R. B., Azzarone B., Weidmann T. L. 1992. Receptors for interleukin 2 on human squamous cell carcinomas and cell lines and tumor *in situ* *Cancer Res.* 52:5963.
- Wu S., Boyer C.M., Whitaker R.S., Berchuck A., Jenson J.R., Weinberg J.B., Bast R.C. 1993. Tumor necrosis factor  $\alpha$  as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor  $\alpha$  expression. *Cancer Res.*, 53:1939.
- Wyke J. A. 1986. Viruses and cancer. In: Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Franks, L. M., Feich, Editors. Oxford, U. K. pp:3-20.
- Yannelli J. R. 1991. The preparation of effector cells for use in the adoptive cellular immunotherapy of human cancer. *Journal of Immunological Methods.* 139:1.
- Yasumura S., Lin W C., Weidmann E., Hebbada P., Weidmann T L. 1994 Expression of interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin 2. *Int. J. Cancer* 59:225.

**APENDICE****1) PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO**

Se mide aproximadamente el 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 a 20°C. Bajo agitación lenta y constante se adiciona el RPMI-1640 (RPMI-1640 Medium Sigma Chem. USA) 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 este que hubiera quedado adherido y se adiciona al recipiente.

A la solución obtenida se le adicionan 2.0g de Bicarbonato de Sodio o 26.8ml 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 celular requiere de una mayor concentración del mismo. Por tal motivo, en esta etapa de la preparación se adiciona L-glutamina (Sigma, Chem. USA) en una concentración 2 mM. Para mantener condiciones de asepsia el medio es suplementado con 1000 U/ml de penicilina (Farmacéuticos Lakeside) y 1 mg/ml estreptomicina (Farmacéuticos Lakeside). La agitación es útil para la total disolución de estos compuestos.

Se ajusta la solución a pH de 7.2-7.4 a 20°C usando para este fin 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 0.22µ.

Composición 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-isoleucinas	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 Benzoico	0.001
Acudo-D-Pantoténico	0.00025
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B-12	0.000005

**Otros**

D-Glucosa	2.0
Glutation reducido	0.001
HEPES	5.958

## 2) DESACTIVACION DE SUERO

Se toma una botella de Suero Fetal de Bovino (Hyclone, U.S.A.) y se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para que sea descongelado, posteriormente se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 min. Con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular como son las proteínas del complemento, que pueden interferir al inhibir la proliferación celular de los cultivos. Posteriormente es transvasado en alieotas de 50 ml par su mejor manejo.

## 3) PREPARACION DEL COLORANTE AZUL DE TRIPANO

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

## 4) SOLUCION SALINA DE VERSENO

Esta solución se emplea para despegar células tumorales adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se pesan las siguientes sustancias:

Tris base	3.04g
Cloruro de sodio	8.00g
Cloruro de potasio	0.40g
Etílen-diamin-tetra-acético (EDTA)	0.40g



Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 10 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 minutos.

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

Se usa para mantener las células en condiciones fisiológicas estables durante períodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato, los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de magnesio	0.1g
Cloruro de calcio	0.1g
Cloruro de sodio	8.0g
Cloruro de potasio	0.2g
Fosfato monoácido de sodio	2.16g
Fosfato diácido de potasio	0.2g

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800ml de agua bidestilada y después se adiciona los 100ml que contiene el cloruro de magnesio y el de calcio. Se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4 utilizando HCl 8N y se afora a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con un diámetro de poro de 22  $\mu$ , la solución se almacena a temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

## 6) TRIPSINA

La enzima tripsina es utilizada para remover los epitelios normales adheridos de la caja de cultivo.

Para su preparación se pesan 0.05g de tripsina y se diluyen en 100 ml de verseno estéril. La solución se conserva en refrigeración hasta el momento de su uso.

## 7) DETERMINACION DE LAS CINÉTICAS DE PROLIFERACION

La cinética de proliferación de las células tumorales, epitelios normales y linfocitos fueron evaluadas mediante una regresión exponencial o semilogarítmica, aplicando en la fase de proliferación exponencial. En esta fase de crecimiento se propone la siguiente ecuación:

$$y = c dx$$

Como sugiere el nombre exponencial, la variable independiente  $x$  aparece en el exponente, transformandose a la siguiente ecuación.

$$\log y = \log c + x \log d$$

si:

$$\log c = a \quad \text{y} \quad \log d = b$$

entonces sustituyendo en la ecuación queda:

$$\log y = a + bx$$

Esta es la ecuación lineal en  $\log y$  y en  $\log x$ , la cual es una función semilogarítmica, de manera que si se llevan dos puntos a papel semilogarítmico se obtiene una recta.

Para la determinación del tiempo de doblaje, se toman 2 puntos de la línea recta obtenida en papel semilogarítmico, en donde el segundo punto corresponde al doble de la densidad celular del primero, y se determinan los tiempos correspondientes, los cuales se restan, obteniéndose con ello el tiempo de doblaje.

### **8) ANALISIS ESTADISTICO**

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales fueron sometidos a dos pruebas estadísticas, una denominada ANDEVA o análisis de varianza, que establece un valor medio denominado Gran Media, con una distribución de los datos de una manera normal y nos dice que tan alejados están los valores promedios de las muestras de nuestros ensayos con respecto a la Gran Media, lo que determina si la muestra presenta un comportamiento de distribución normal o no; la segunda prueba denominada Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher, se realiza cuando el análisis de varianza indica que existe diferencia entre las medias de dos o más poblaciones, indicándonos entre que pares de medias existe esta diferencia. La DSM se define como la diferencia mínima que puede existir entre dos medias de muestras significativamente diferentes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Desco agradecer a la M. en C. Rosalva Rangel Corona y al Dr. Benny Weiss Steider por su excelente asesoría y por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

De manera similar agradezco a la Dra. Isabel Soto Cruz, a la Biol. Cristina Alvarado D. y al M. en C. Raúl Zavala C. Por la revisión de esta tesis, sus acertadas observaciones y por sus invaluable consejos.

También agradezco al Dr. Jorge F. Mendoza y al M. en I.B.S.H. Alberto Monroy G. por sus consejos y comentarios.

A Antonieta Chavez G. por proporcionarme las biopsias de tejido normal.

Asimismo agradezco a los Srs. José Chavarría y Ranulfo Pedraza por su valiosa asistencia técnica.

De igual forma quiero agradecer a todos los compañeros y amigos del Laboratorio por su gran apoyo.