



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Modelo singénico para evaluar agentes con  
posible actividad anti-metastásica**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**GUSTAVO ULISES MARTÍNEZ RUIZ**

MÉXICO, D. F.

2006



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Rafael Rion Arreola.
Vocal	Profa. Marina Gavilanes Ruiz
Secretario	Prof. Marco Antonio Velasco Velázquez
1er. Suplente	Profa. Gloria Gutierrez Venegas
2º. Suplente	Profa. Ruth Bustamante García

Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina. U.N.A.M.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos PAPIIT IN230202 (DGAPA-UNAM) y PAPIIT IN3806 (DGAPA-UNAM).

**Asesor de tema:**

Dr. Marco Antonio Velasco Velásquez

**Supervisor técnico**

Q.F.B. Nohemí Salinas Jazmín

**Sustentante:**

Gustavo Ulises Martínez Ruíz

Agradecimientos:

*Micaela Ruiz R. "Eres la persona mas noble de mi mundo, te amo".*

*Juan I. Martínez M. "Podrán pasar muchas cosas pero siempre te estaré agradecido por todo, gracias".*

*Guadalupe Martínez y Miguel Ángel Martínez "El amor que sienten por mi, siempre lo tengo presente"*

*Marco Velasco "Admiro tu sinceridad para conmigo y agradezco tu ayuda".*

*A ustedes los conocí a lo largo de la carrera y los considero mis amigos, y a algunos más que eso. De alguna manera les dedico este trabajo.*

*Erick Valadez Cedillo.*

*Georgina Victoria A. (Inolvidable)*

*Israel Becerra G. (Incondicional cuando te necesito)*

*Francisco Sánchez G. (Es un placer conocerte)*

*Karina Mendoza M.*

*Mauricio Pérez M.*

*Hithadavi Mejía M.*

*Guadalupe Montúfar, Claudia Ortiz, Fernando Rosas, Violeta Rayón, Roberto Padilla, Nohemí Salinas,*

*Natlleli Carreño, Víctor García, Daniela (Guau), Paola,*

# Índice

Contenido.

Resumen.....	7
Abreviaturas.....	9
I. Introducción.....	10
1. Cáncer.....	10
1.1. El cáncer: un problema de salud pública.....	10
1.2. Biología del cáncer.....	10
1.3. Carcinogénesis.....	11
1.4. Melanoma.....	12
2. Metástasis.....	15
3. Inmunología del cáncer.....	18
3.1. Cambios en la función del sistema inmune están relacionados con la progresión del tumor.....	23
3.2. OPN es una citocina clave en la respuesta inmune celular.....	25
3.3. OPN estimula la formación de metástasis.....	27
3.4. Relación entre OPN y el fenotipo maligno.....	29
4. Factor de transferencia.....	30
4.1. Especificidad del factor de transferencia.....	31
4.2. Mecanismo de acción del Extracto dializado de leucocitos (DLE).....	33
4.3. Aplicaciones del DLE.....	34

PÁGINAS

II. Objetivos .....	36
III. Hipótesis.....	36
IV. Material y Métodos .....	37
V. Resultados .....	41
VI. Discusión .....	46
VII. Conclusiones .....	50
VIII. Bibliografía .....	51

PÁGINAS

## Resumen:

La formación de metástasis es un proceso en donde las células cancerosas se diseminan a otros tejidos distintos del sitio donde se origina el tumor primario. Las metástasis son responsables de una gran proporción de muertes por cáncer debido a que no existe un tratamiento eficaz. El extracto dializable de leucocitos (DLE) es una mezcla compleja de moléculas que provienen de la ruptura de células linfoides y de la posterior diálisis, en donde se obtiene la fracción por debajo de 12 KDa. Aunque no se han definido los mecanismos moleculares de acción de DLE, en general ha demostrado ser efectivo en aquellas enfermedades en las que la respuesta inmune celular juega un papel importante en la protección y control, como en algunos tipos de cáncer. Además, el DLE modifica la expresión de algunas citocinas, en particular se han reportado efectos sobre la expresión de osteopontina (OPN). OPN, que está involucrada en respuestas inmunes e inflamatorias, participa en la formación de metástasis. En células cancerosas, la sobreexpresión de OPN resulta en un incremento del fenotipo maligno, pues incrementa la movilidad, la adhesión, la migración y la invasión. Se piensa que los efectos prometastásicos de OPN se deben a su capacidad de interactuar con integrinas y el receptor CD44, los cuales regulan diversos eventos de señalización que guían a la progresión del tumor. Utilizando un modelo murino de melanoma, en este estudio analizamos el efecto del DLE en: *i*) la formación de metástasis experimentales, y *ii*) la concentración plasmática de OPN. Adicionalmente, empleando la línea celular de melanoma B16-F10, estudiamos el efecto *in vitro* del DLE sobre la viabilidad celular y sobre la expresión de OPN en células cancerosas.

**Experimentos *in vivo*.** Se evaluaron dos diferentes DLEs: “DLE-H37Rv” y “DLE-C57”. El “DLE-C57” se preparó lisando y dializando bazo de ratones BALB/c sanos. El “DLE-H37Rv” fue obtenido de bazo de ratones que previamente habían sido inoculados con la cepa virulenta H37Rv de M. tuberculosis. Para estudiar el efecto de estos extractos en la formación de metástasis experimentales, se administró DLE por vía esofágica durante 7 días consecutivos a los siguientes grupos de ratones C57BL6, en la dosis indicada: (*i*) 1 unidad/día de DLE-H37Rv, (*ii*) 0.1 unidad/día de DLE-H37Rv, (*iii*) 1 unidad/día de DLE-C57, (*iv*) 0.1 unidad/día de DEL-C57 y (*v*) control. Al octavo día se obtuvieron muestras de plasma y posteriormente se inyectó a cada ratón  $1 \times 10^6$  células B16-F10 (células cancerosas) en la vena de la cola. Al día 28 se sacrificaron los roedores, se extirparon los pulmones y se cuantificaron los nódulos metastásicos macroscópicos. En los grupos tratados con cualquiera de los DLEs, el número de nódulos metastásicos es por lo menos 4 veces inferior al del control. Para analizar la expresión de OPN en los ratones, medimos su concentración en las muestras de plasma posterior al tratamiento con DLE-C57 durante 7 días consecutivos. Para esta determinación se ocupó un estuche comercial de cuantificación de OPN de ratón siguiendo las instrucciones del fabricante (Assay Designs). Las determinaciones indicaron que no existe variación significativa entre los ratones tratados con DLEs y los controles.

**Experimentos *in vitro*.** El efecto de los DLEs sobre la viabilidad de células cancerosas se estudió en cultivos de células B16-F10. Las células se expusieron a diferentes concentraciones de cualquiera de los DLEs en placas de 96 pozos. Tras 24 horas o 48 h de exposición, se estimó la viabilidad utilizando la metodología de reducción del MTT. No encontramos diferencias significativas entre las células tratadas y las células control. Dado que la OPN puede ser secretada por células cancerosas y tener efectos autócrinos, medimos la concentración de OPN en el sobrenadante de cultivos de células B16-F10

tratadas con 10 mU/mL de DLE. Utilizando el estuche comercial descrito antes, no encontramos diferencias en la expresión de OPN.

Estos resultados muestran que los dos diferentes DLEs disminuyen la formación de metástasis experimentales; sin embargo, los tratamientos con DLE no alteran la expresión de OPN en ratones o en cultivos de células B16-F10, ni tienen efecto citotóxico sobre las células cancerosas. Esto indica que otros mecanismos, diferentes de cambios en la expresión de OPN, participan en la disminución nódulos metastásicos en pulmón.

**Abreviaturas:**

APC = Célula presentadora de antígeno.

DLE = Extracto dializable de leucocitos.

DLEs = Extractos dializables de leucocitos.

Da = Dalton

e.e.m. = Error estandar de la media.

HLA = Antígeno leucocitario humano.

INF- $\gamma$  = Interferón gamma.

IL = Interleucina.

MHC = Complejo principal de histocompatibilidad.

MMPs = Metaloproteasas.

PI 3'cinasa = Fosfoinositido 3-cinasa.

TIMP = Inhibidores de metaloproteasas.

uPA = Activador de plasminogeno tipo urocinasa.

VEGF = Factor de crecimiento del epitelio vascular.

## **I. Introducción.**

### **1. Cáncer**

#### **1.1 El cáncer: un problema de salud pública.**

En el 2002 los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en México causando 58 mil 599 decesos. Las defunciones por tumores malignos representaron el 11.2 % del total de fallecimientos en los varones y 14.7% en las mujeres (INEGI, 2002). En las poblaciones de 25 a 34 años y de 35 a 44 años, que son las económicamente más activas, los tumores malignos representan la tercera causa de muerte (INEGI, 2002).

Según el informe anual de la OMS del 2002, en el mundo más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer cada año. Adicionalmente, el número de muertes por cáncer asciende a 6 millones anuales. Se estima que estas cifras se incrementarán en un 50% en los próximos 20 años (Ferlay, 2002)

#### **1.2. Biología del cáncer.**

El cáncer en términos de biología celular y molecular representa un número pequeño de enfermedades causadas por defectos moleculares similares en la función celular. El cáncer es una enfermedad de expresión genética anormal que ocurre por distintos mecanismos, incluyendo alteraciones directas al DNA (como son mutaciones en genes, translocaciones o amplificaciones) y/o transcripción anormal de genes (Ruddon, 1995).

El cáncer es la presencia de células que crecen descontroladamente. Estas células, llamadas malignas, difieren de las normales pues no responden a los mecanismos que controlan el crecimiento. El crecimiento descontrolado de células malignas origina tumores. Los tumores se pueden clasificar en tres: (1) Tumores benignos. Pueden originarse en cualquier tejido y causan daño por presión local u obstrucción, pero las células malignas no se diseminan a sitios distantes.

(2) Tumores “in situ”. Se desarrollan usualmente en el epitelio y son pequeños; no invaden la membrana basal y se reconocen como un estado de displasia (irregularidad epitelial).

(3) Tumores malignos. Son cánceres totalmente desarrollados con la capacidad de invadir y destruir órganos distintos al de origen. Las células del tumor principal pueden ser llevadas a través de vasos sanguíneos y linfáticos hacia órganos distantes, en donde se originan tumores secundarios (Franks, 1998).

### **1.2.1 Carcinogénesis.**

La carcinogénesis es el proceso por medio del cual las células normales sufren alteraciones genéticas dando origen a células tumorales. Las células transformadas pueden existir en un estado latente para posteriormente crecer descontroladamente dando origen a tumores detectables. El proceso de inducción de la transformación de células normales a malignas, el crecimiento y evolución de las mismas son llamados procesos de iniciación, promoción y progresión.

**Proceso de iniciación.** Es la transformación de la célula normal a maligna por medio de cambios en la expresión de genes, ocasionada por un agente carcinógeno. Estos cambios son permanentes y heredables. El agente carcinógeno puede reaccionar directamente con el DNA o indirectamente por eventos epigenéticos, modulando la expresión genética sin directamente reaccionar con la secuencia de DNA (Ruddon, 1995). Los agentes iniciadores actúan interaccionando con el DNA para inducir mutaciones, rearrreglos génicos o amplificaciones genéticas que producen una célula con alteraciones en su material genético. El mecanismo por el cual estos agentes dañan el DNA es por unión covalente entre la forma electrofílica del carcinógeno y los sitios nucleofílicos en proteínas y ácidos nucleicos.

**Proceso de promoción del tumor.** Es la fase de proliferación de células iniciadas y la expansión clonal inducida por estímulos mitogénicos. Las células iniciadas pueden no crecer o crecer lentamente. Los agentes promotores

pueden inducir la división celular de células iniciadas aunque éstas pueden ser sensibles a factores inhibitorios de crecimiento, pero el resultado final depende del balance entre los factores y la magnitud de los cambios de las células iniciadas (Franks, 1998). Sólo una o un número pequeño de estas clonas iniciadas progresan a cáncer maligno.

**La fase de progresión.** Es la evolución gradual de células alteradas genéticamente y fenotípicamente. Este proceso guía al desarrollo de una heterogeneidad celular con respecto a sus características metastásicas e invasivas, especificidad antigénica, y respuesta a hormonas, fármacos o agentes inmuno-moduladores. Hay un proceso de selección que favorece el crecimiento de un solo tipo de célula sobre las demás. Esto puede ser debido a que cierto tipo de célula desarrolla una ventaja en el crecimiento en el tejido hospedero sobre sus iguales. Otra alternativa es que el sistema inmune reconozca mejor algunos tipos celulares sobre otros, impidiendo su proliferación (Ruddon, 1995).

## **1.4 Melanoma.**

En Estados Unidos 1 de 82 mujeres y 1 de 58 hombres desarrolla melanoma, por lo que es uno de los cánceres más comunes y una de las principales causas de muerte entre individuos de 20 a 35 años (Houghton, 2002). El melanoma tiene su origen en los melanocitos, que son células normales pigmentadas, localizadas en la membrana basal de la superficie epitelial. La principal función de los melanocitos es la síntesis, almacenamiento y transferencia de pigmentos de melanina a las células epiteliales circundantes. La melanina es sintetizada en vesículas endocíticas especiales llamadas melanosomas. Las células de melanoma primario generalmente retienen estas funciones de almacenamiento y la síntesis de pigmentos en los melanosomas (Houghton, 2002).

El melanoma es una enfermedad predominante de poblaciones de raza blanca (caucásicos), con una incidencia de 5 a 20 veces más alta que en poblaciones con color de piel oscura. En caucásicos la incidencia de melanoma es influida por la proximidad al ecuador, sugiriendo una relación con la exposición solar (Houghton, 2002). Muchos melanomas surgen en la piel, particularmente en sitios expuestos al sol como es en la cara y los miembros. Sin embargo, en personas con piel oscura, los melanomas surgen con mucha frecuencia en sitios no expuestos como membranas de mucosas, palmas, pies, etc. Hay evidencia de que la excesiva exposición al sol durante la etapa de niñez se asocia con un alto riesgo de padecer melanoma (Franks, 1995). No está claro el espectro de la luz implicado en la incidencia melanoma, pero hay argumentos que indican que la radiación UV-B podría ser un mutágeno y la radiación UV-A tener efectos en la activación de melanocitos. La luz UV-B induce dímeros de pirimidinas ciclobutano, principalmente dinucleótidos de timidina. Lesiones no reparadas por escisión de nucleótidos puede originar transiciones GC→AT con consecuencias mutagénicas. La radiación UV induce supresión inmune en la piel, teóricamente interfiriendo con mecanismos de vigilancia inmune del cáncer (Houghton, 2002).

Se han identificado algunas de las alteraciones genéticas que comúnmente ocurren en melanomas; por ejemplo, se han detectado alteraciones en los cromosomas 1, 6, 7, y 10, pero éstas se adquieren durante la progresión del tumor (Houghton, 2002). Específicamente ocurren deleciones de 11q y 1p (Franks, 1998). Otras alteraciones genéticas implican la vía Rb para la regulación del ciclo celular. Es frecuente la deleción en la región 9p21 en lesiones de melanoma primario, lo cual en líneas celulares condujo a la identificación de p16INK4A como un gen candidato supresor de tumor. p16INK4A inhibe la transición de G1-S por bloqueo de la actividad de cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 que regulan la fosforilación de la proteína Rb. Mutaciones somáticas en p16INK4A son relativamente raras en melanomas esporádicos. Inactivaciones epigenéticas de p16INK4A vía metilación de la región promotor ha sido observada en algunos casos (Houghton, 2002).

La progresión de la transformación de melanocitos normales a melanomas metastásicos provee un excelente modelo para estudiar la transformación, invasión y metástasis maligna. El melanoma primario progresa generalmente a través de dos fases (Figura 1):

- (1) Fase de crecimiento radial, caracterizada por la diseminación horizontal de células melanocíticas transformadas dentro de la epidermis. Estas células invasivas son limitadas por la parte superior de la epidermis y no se diseminan.
- (2) Fase de crecimiento vertical caracterizada por invasión de células de melanoma dentro de la dermis profunda y tejido subcutáneo. Generalmente solo lesiones en la fase de crecimiento vertical es asociada con metástasis (Houghton, 2002).

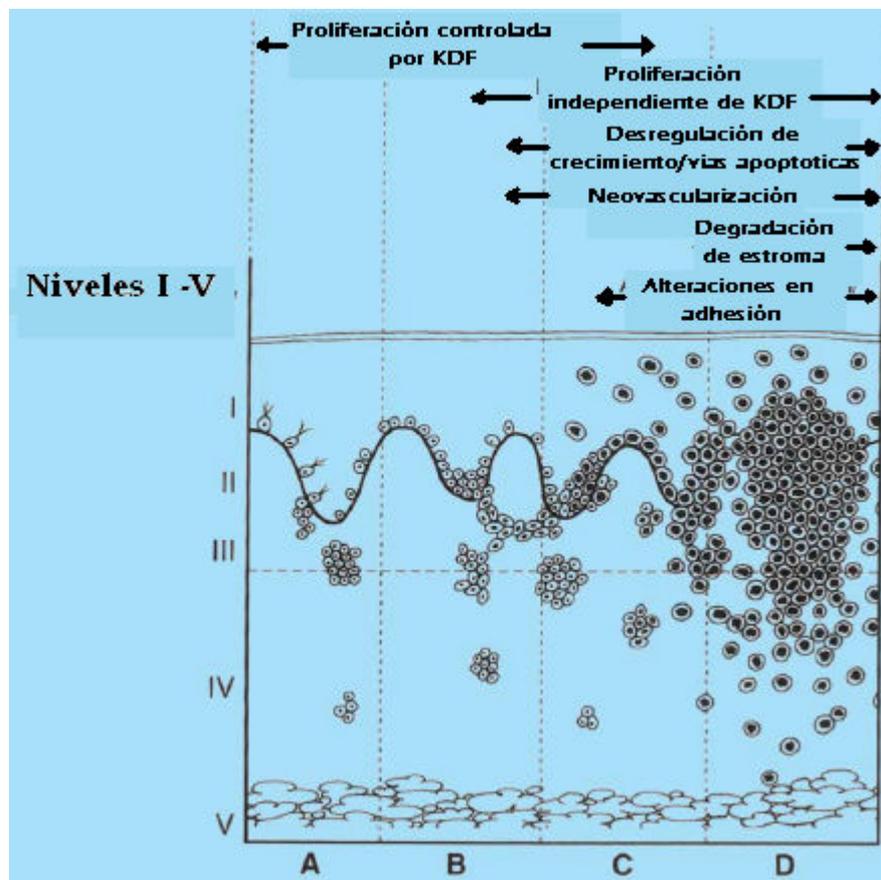


Figura 1. Se muestra un modelo de progresión de melanoma con cambios biológicos correspondientes a los distintos estados de progresión. La imagen es una sección vertical, incluyendo epidermis (nivel I al margen izquierdo), dermis (niveles II – IV) y tejido subcutáneo (nivel V). En la columna A se muestra melanocitos individuales en la región epidérmica-dermal o en pequeños grupos de nevus benigno. B, Proliferación atípica de melanocitos, características de atípica nevus. C, Un melanoma primario en fase de crecimiento radial. D, Un melanoma avanzado, invasivo en crecimiento vertical. Abreviaciones: KDF, Factor derivado de queratinocito (modificado de Houghton, 2002).

## **2. Metástasis.**

La formación de metástasis es un proceso en donde las células cancerosas pueden diseminarse a otros órganos, tejidos o cavidades distintos del sitio donde se originó el tumor primario para formar focos de crecimiento secundarios. Este proceso complejo depende del resultado de numerosas interacciones entre las células tumorales y las normales. La diseminación de células cancerosas es responsable de una gran proporción de muertes por cáncer debido a que no hay aparentemente un tratamiento eficaz que la detenga, por lo tanto la formación de metástasis es el principal factor de daño de una enfermedad neoplásica (Franks, 1998).

**Diseminación del cáncer.** Existen dos principales rutas por la cuales las células metastásicas son diseminadas: (1) vía vasos linfáticos y (2) vía vasos sanguíneos, sin embargo estos dos sistemas de circulación están altamente interconectados y no pueden ser considerados como independientes (Tannock, 1998). El proceso de progresión del tumor involucra la adquisición de nuevas características de las células transformadas, ocasionando un fenotipo más agresivo y la capacidad de invadir y metastatizar. Los pasos envueltos en la formación de metástasis son: (1) angiogénesis, (2) invasión y liberación de células neoplásicas, (3) supervivencia de las células neoplásicas en circulación sanguínea, (4) retención de células neoplásicas en capilares de órganos distantes y (5) formación de tumor secundario (Figura 2).

**Angiogénesis.** Los vasos sanguíneos se originaron durante la evolución para llevar oxígeno a distintos órganos. Estos vasos son cruciales para el crecimiento de un órgano en el embrión y para reparar tejido de un órgano dañado en el adulto. Pero un desequilibrio en el crecimiento de estos vasos contribuye a numerosas patologías, como el cáncer (Carmeliet, 2005). Un tumor sólido de aproximadamente 2 mm de diámetro necesita nutrientes que no pueden difundir; por lo tanto, se induce la formación de nuevos capilares de vasos sanguíneos a partir de capilares o venas existentes. (Franks, 1998). El proceso de angiogénesis involucra varias etapas: (i) motilidad de células

endoteliales hacia el estímulo angiogénico para el alineamiento del endotelio; (ii) proteólisis de la matriz extracelular para la penetración de las células endoteliales; y (iii) proliferación de células endoteliales para formar nuevos capilares que proveerán de nutrientes al tumor (Ruddon, 1998). Agentes antiangiogénicos como la clase de inhibidores de VEGF son nuevos medicamentos para el tratamiento del cáncer. (Carmeliet, 2005)

**Invasión.** Las células tumorales sufren metástasis a distintos órganos por medio de vasos sanguíneos o canales linfáticos. La penetración de células malignas a estos vasos se denomina invasión. La liberación de células individuales, o en pequeños grupos, hacia la circulación se debe a la pérdida de la capacidad de estar juntas. Esto se debe a la reducción de la cohesividad tumoral entre las células y está relacionada con la regulación negativa de moléculas de adhesión celular (CAMs). Por ejemplo la E-caderina es un molécula de adhesión dependiente de calcio, ha mostrado ser expresada en forma reducida en algunos tumores menos diferenciados y más agresivos (Franks, 1998). En general los mecanismos involucrados en la invasión del tumor son:

(1) Aumento en la presión mecánica. La rápida proliferación de células neoplásicas ocasiona oclusión de los vasos sanguíneos locales provocando aumento de la presión. Esto ocasiona la muerte del tejido y una reducción de la resistencia mecánica del vaso.

(2) Liberación de enzimas líticas. Las células tumorales pueden secretar diversas enzimas proteolíticas, como proteasas y colagenasas. La función de estas enzimas es la destrucción de células que circundan el tumor, así como la degradación de barreras de tejido. Las células tumorales no solo producen enzimas proteolíticas, como algunos miembros de la familia de las metaloproteasas, sino que también producen inhibidores de estas moléculas, llamadas inhibidores de metaloproteasas derivados de tejido (TIMPs). Estas glicoproteínas se unen a las enzimas activas y latentes para inactivarlas. La actividad destructiva de las células tumorales depende del balance entre estas actividades opuestas (Franks, 1998). Las principales enzimas que degradan la matriz extracelular (ECM) son: (1) Metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs); (2) las proteasas de membrana relacionadas con adamalislina; (3) La

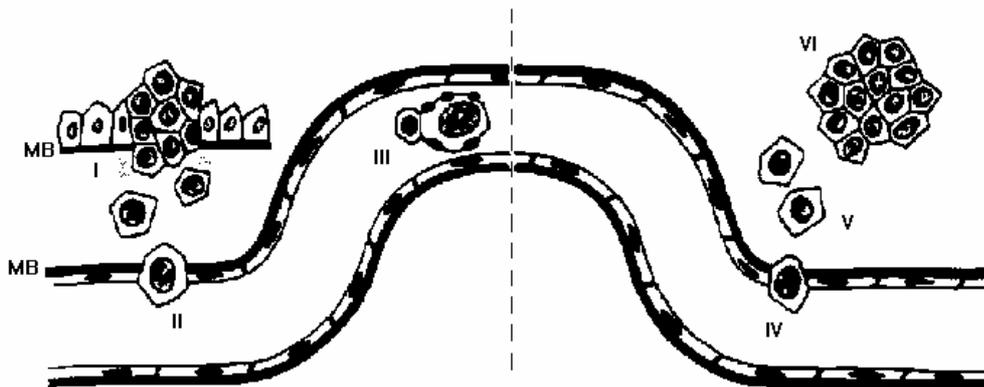
metaloproteasas tipo 1; (4) activador de plasminógeno de tejido, urocinasa, trombina y plasmina. Las enzimas más estudiadas en los procesos de invasión y metástasis son el activador de plasminógeno tipo tejido (tPA), plasmina, catepsina-D, -B, -L y -G, activador plasminógeno urocinasa (uPA) y MMP's. (Riku et al, 2005).

(3) Incremento en la motilidad de células tumorales. Se ha establecido que las células tumorales se mueven a través de los tejidos por medio de locomoción activa hacia factores quimiotácticos. Uno de estos factores es el factor de motilidad autocrina (AMF) aislado de una línea celular de melanoma de humano. Otras moléculas que están implicadas en la regulación del movimiento de células neoplásicas son el factor estimulante de migración (MSF) y el factor de crecimiento de hepatocito (HGF). (Franks, 1998).

**Supervivencia de las células neoplásicas en circulación.** Para algunos tipos de tumor, la presencia de células tumorales en sangre no es indicativo de la formación de metástasis distantes (Ruddon, 1998). Muchas de las células liberadas a la circulación mueren, pues el ambiente en la circulación es generalmente hostil para células cancerosas. Sin embargo, las células tumorales pueden sobrevivir debido a varias interacciones con plaquetas, linfocitos y neutrófilos. Esto ocasiona la formación de un trombo que previene el daño de células tumorales que se encuentran en el centro (Franks, 1998).

**Detención de células cancerosas en capilares de órganos distantes.** La adherencia de células cancerosas al capilar del endotelio necesita la formación de una matriz de fibrina que favorece la sobrevivencia de estas células. Esta adherencia al endotelio daña las paredes de los vasos y ocasiona acumulación de neutrófilos que penetran entre los espacios de las células endoteliales. Entre los espacios abiertos pueden penetrar células tumorales. Existe también un agregado de plaquetas que libera mediadores al sitio del trombo. Uno de estos mediadores, la histamina, promueve la permeabilidad capilar, permitiendo la migración de células tumorales a través del endotelio. Los factores liberados por las plaquetas tienen un efecto mitogénico en las células cancerosas (Franks, 1998).

**Formación de tumor secundario.** Finalmente, tras la extravasación, las células tumorales deben encontrar un microambiente favorable para su proliferación y formar así un tumor secundario.



**Figura 2.** Etapas del proceso de metástasis. I) Crecimiento tumoral y separación de células neoplásicas a partir del tumor primario. II) Migración hacia la vasculatura. III) Interacciones con plaquetas y leucocitos en la luz vascular. IV) Adhesión de la célula tumoral al endotelio vascular. V) Migración hacia el tejido blanco. VI) Crecimiento tumoral en el sitio de metástasis. MB: Membrana basal.

### 3. Inmunología del cáncer.

La posibilidad de que el cáncer pueda ser erradicado por la respuesta inmune ha sido defendida por muchos inmunólogos. El concepto de vigilancia inmune fue propuesto por Macfarlane Burnet en 1950 y establece que, en condiciones fisiológicas, el sistema inmune es capaz de reconocer y destruir clonas de células transformadas. El estudio de la respuesta inmune contra un tumor tiene los siguientes principios básicos: (1) El sistema inmune es, algunas veces, una barrera significativa al crecimiento tumoral; (2) los tumores expresan antígenos que son reconocidos como extraños por el sistema inmune del hospedero; (3) el sistema inmune puede ser manipulado para la completa erradicación del tumor (Song, 1998).

Una de las razones en las que el tumor puede ser atacado por el sistema inmune es porque las células cancerosas expresan nuevos antígenos. El origen de los antígenos tumorales puede ser:

- (1) La expresión de oncoproteínas. Esto ocurre por mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones cromosómicas o inserciones de genes virales en proto-oncogenes o genes supresores de tumor para formar oncogenes.
- (2) La expresión de proteínas celulares provenientes de genes mutados. Estos productos no tienen relación con el fenotipo maligno, pero pueden estar asociadas con el efecto de ciertos carcinógenos químicos.
- (3) La expresión aberrante de proteínas celulares normales. En el melanoma, clonas de linfocitos T citotóxicos CD8 y células T CD4 reconocen como antígeno a la tirosinasa, una enzima involucrada en la biosíntesis de melanina.
- (4) La expresión en células cancerosas en y durante el desarrollo fetal de proteínas que normalmente no son expresadas en tejido adulto.
- (5) La expresión anormal de glicoproteínas y glicolípidos en la superficie celular (Abbas, 2000).

La vigilancia inmune representa sólo una dimensión de la compleja relación entre el sistema inmune y el cáncer. Se ha demostrado que el sistema inmune puede promover el surgimiento de tumores primarios con reducida inmunogenicidad que son capaces de escapar al reconocimiento del sistema inmune y consecuentemente, a su destrucción (Dunn, 2004). Las interacciones entre las células cancerosas y el sistema inmune son dinámicas y se pueden dividir en tres fases: (1) Eliminación. Representa el clásico concepto de vigilancia inmune. (2) Equilibrio. Es el periodo de latencia inmune después de la destrucción incompleta del tumor en la fase de eliminación. (3) Escape. Se refiere al crecimiento de tumores que han dejado atrás la represión inmune de la fase de equilibrio.

**Fase de eliminación.** Es un proceso que previene el crecimiento de tumores primarios. Datos acumulados indican que la base molecular de vigilancia inmune contra el cáncer son respuestas inmunes de tipo innata y adaptativa. Los linfocitos juegan un papel importante en respuestas de tipo inmunidad

celular. La presentación y procesamiento de antígenos tumorales puede llevarse a cabo de dos maneras vía inmunidad celular:

(A) Los productos de los oncogenes y genes supresores de tumor son sintetizados en el citoplasma de las células tumorales. La proteína puede ser degradada en el citoplasma y transportada al retículo endoplásmico donde se une al MHC clase I. Este antígeno es reconocido por los linfocitos CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) se unen a la célula tumoral por el uso del receptor antígeno específico y moléculas accesorias (como CD8 y la integrina LFA-1). De esta manera, las células blanco (tumorales) deben expresar proteínas procesadas y asociadas a moléculas MHC clase I. Este complejo sirve como ligando al receptor de células T (TCR) y al co-receptor CD8. Además las células blanco deben expresar moléculas de adhesión intracelular-I que es el principal ligando para LFA-I. Este reconocimiento genera señales bioquímicas que activan al CTL. Además los coestimuladores y citocinas son requeridos para diferenciar a los pre-CTLs a CTL activados. El principal mecanismo de la citólisis mediada por CTL es la liberación de proteínas granulares citotóxicas a la célula tumoral. Las dos principales proteínas granulares son perforina y granzimas. La perforina es una proteína formadora de poros que está presente como un monómero en gránulos de CTLs. El monómero de perforina entra en contacto con altas concentraciones de calcio y sufre polimerización. Esto ocurre principalmente en la bicapa lipídica de la membrana de la célula blanco y aquí la perforina polimerizada forma un gran canal acuoso. Altas concentraciones de calcio entran a la célula y esto activa la apoptosis. Por otro lado las granzimas son proteasas de serinas. Por ejemplo, la granzima B activa proteolíticamente a enzimas celulares llamadas caspasas, las cuales degradan varios sustratos e induce la apoptosis celular. Un mecanismo adicional de citólisis es mediante interacciones de moléculas de membrana entre los CTLs y células tumorales. CTLs expresan una proteína en la membrana llamada ligando Fas (FasL), que se une a su proteína blanco Fas. Esta interacción resulta en la activación de la vía de las caspasas y por ende en apoptosis (Abbas, 2000).

(B) Los antígenos tumorales que son endocitados por células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, migran hacia los nódulos linfoides, aquí la APC especializada es llamada célula dendrítica madura. Las APC presentan péptidos procesados en moléculas MHC clase II a linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las APC expresan altos niveles de coestimuladores como B7-1 y B7-2 en el momento de la presentación del antígeno, ya que sin coestimulación, los linfocitos mueren por apoptosis o entran en un estado llamado anergia en el que no responden. Las APC expresan el factor de crecimiento autócrino, interleucina-2 (IL-2), responsable de la expansión clonal de células reactivas contra el antígeno tumoral y que induce a la diferenciación de células T. IL-12 es la principal citocina responsable de la inducción de respuesta inmune celular. Después de la presentación del antígeno por APCs, los linfocitos rápidamente expresan una proteína llamada ligando CD40, la cual se une a CD40 de macrófagos, células dendríticas, y estimula la secreción de IL-12. Esta interleucina actúa en células T CD4<sup>+</sup> estimuladas por antígeno e induce la diferenciación de estos linfocitos a respuestas T<sub>H</sub>1 a través de la vía dependiente STAT4. Las células efectoras T<sub>H</sub>1 producen interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que actúa en macrófagos no sólo para estimular funciones microbicidas, sino también para incrementar la producción de IL-12. (Abbas, 2000).

En trabajos recientes se sugiere que las células T  $\gamma\delta$  son una importante fuente de IFN- $\gamma$  durante el desarrollo de respuestas protectoras antitumorales (Gao, 2003). El IFN- $\gamma$  es una proteína homodimérica producida por células asesinas naturales (células NK), células efectoras T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>. Las células NK secretan IFN- $\gamma$  en respuesta al reconocimiento de antígenos tumorales o en respuesta a IL-12. El IFN- $\gamma$  tiene distintas funciones como son: (1) El IFN- $\gamma$  es la principal citocina activadora de macrófagos para destruir antígenos extraños fagocitados. El IFN- $\gamma$  estimula la síntesis de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico por activación de transcripción y/o ensamble de enzimas requeridas para producir estas sustancias. (2) La expresión de MHC clase I y II, así como coestimuladores en APCs es estimulada por el IFN- $\gamma$ . Esta citocina estimula la producción de muchas moléculas envueltas en el procesamiento de antígeno, incluyendo los

transportadores asociados con el procesamiento de antígeno (TAP), componentes de proteosoma LMP-2, LMP-7 y el antígeno leucocitario humano. (3) Promueve la diferenciación de células CD4<sup>+</sup> vírgenes a células T<sub>H</sub>1 e inhibe la proliferación de células T<sub>H</sub>2. (4) El IFN- $\gamma$  activa neutrófilos y estimula la actividad citolítica de células NK (Abbas, 2000).

**Fase de equilibrio.** La fase de eliminación puede erradicar un porcentaje significativo de células transformadas. Sin embargo, existen algunos tumores que pueden resistir al arsenal inmunológico. La fase de equilibrio está comprendida entre el término de la fase de eliminación y el inicio de la fase de escape. Aunque muchas de las células tumorales originales son destruidas, nuevas variantes en el microambiente originan que las células acumulen más mutaciones y así se incrementa la resistencia al ataque del sistema inmune. Al final, en la fase de equilibrio se producen nuevas poblaciones de células tumorales capaz de sobrevivir en un hospedero inmunocompetente. Esto es debido a la enorme inestabilidad genética de las células cancerosas. Cuando un tumor ha entrado en la fase de equilibrio existen tres posibles escenarios: (1) eventual eliminación por el sistema inmune, (2) mantenimiento permanente de la fase de equilibrio, o (3) escape de la presión inmune y tránsito a la fase de escape (Dunn, 2004).

**Fase de escape.** Las células tumorales que escapan de la fase de equilibrio crecen sin restricción del sistema inmune. En esta fase es cuando se detectan clínicamente tumores en hospederos inmunocompetentes. Muchos estudios han documentado que la fase de escape puede ser consecuencia directa o indirecta de alteraciones ocurridas en blancos tumorales. Por ejemplo, algunas células tumorales desarrollan lesiones directas o indirectas en la vía del procesamiento de antígeno o en la vía de presentación del antígeno, lo cual facilita evasión del reconocimiento de respuesta inmune adaptativa. Muchas células cancerosas exhiben pérdida de proteínas HLA clase I (Antígeno leucocitario humano clase I). En líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humano se ha encontrado que no responden a INF- $\gamma$  debido a la ausencia o función anormal de componentes de la vía de señalización del

receptor INF- $\gamma$ . En otro escenario se ha demostrado que la inhibición de las funciones protectoras del sistema inmune puede facilitar la fase de escape. Esto es, que variantes de células tumorales pueden sobre-producir citocinas inmunosupresoras, como es TGF- $\beta$  o IL-10 (Dunn, 2004).

### **3.1 Cambios en la función del sistema inmune están relacionados con la progresión del cáncer.**

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que comparten un alto grado de homología estructural y tienen, entre otras capacidades la de atraer tipos específicos de leucocitos en concentraciones picomolares. Muchas citocinas pueden inducir programas de activación en leucocitos blanco (Tabla 1) (Rollins, 2006). Sin embargo, cambios en la expresión de varias citocinas han sido asociados con la carcinogénesis y la progresión del cáncer. Diferentes interleucinas pro-inflamatorias, entre las que se incluyen IL-1, IL-6, IL8 y IL-18, han sido involucradas en diferentes pasos en el proceso de carcinogénesis (Tabla 2). Por ejemplo, la secreción de IL-1 $\alpha$  promueve crecimiento de carcinoma cervical. De manera similar, la producción autócrina de interleucina IL-1 $\beta$  promueve el crecimiento y confiere quimioresistencia en líneas celulares de carcinoma pancreático. IL-6 actúa como factor de crecimiento parácrino para mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer colorectal y carcinoma celular renal. Otra importante citocina pro-inflamatoria, la IL-8, promueve el crecimiento y la metástasis de una amplia variedad de tumores. La expresión de IL-8 por células de melanoma humano correlaciona con el potencial metastásico (Bharat, 2006).

Las quimiocinas son una familia de proteínas que tienen efectos biológicos pleiotrópicos. Las quimiocinas pueden modificar varias etapas de la progresión del cáncer, como es angiogénesis, inflamación, migración celular. Las quimiocinas promueven el desarrollo del tumor por la estimulación de la angiogénesis y crecimiento tumoral debido al efecto directo o indirecto en el reclutamiento de macrófagos asociados al tumor. Las quimiocinas ocasionan el reclutamiento de células dendríticas inmaduras dentro del tumor y debido a los

factores producidos por el ambiente tumoral puede conducir a la inducción de tolerancia inmune (Bharat, 2006). Se ha descrito que las quimiocinas y sus receptores controlan la migración de leucocitos (Rossi, 2000). Las células tumorales expresan ciertos receptores para quimiocinas. Esta observación sugiere que las quimiocinas y sus receptores pueden potencialmente jugar un papel en la migración directa de células tumorales “in vivo” (Zlotnik, 2004).

Las quimiocinas representan un grupo grande de pequeñas proteínas quimioattractoras, las cuales se clasifican en cuatro clases, basándose en la posición clave de residuos de cisteína cerca del fragmento N-terminal: C, CC, CXC y CX3C. Las familias de quimiocinas CC y CXC son las más numerosas, con alrededor de 50 miembros. Las quimiocinas interactúan con receptores de superficie, los cuales son miembros de una gran superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Kakinuma, 2006). Al menos se han descrito 18 receptores diferentes para quimiocinas (Zlotnik, 2000). Las quimiocinas también participan en la regulación de la progresión del cáncer. Por ejemplo, existe evidencia en modelos murinos y tumores humanos que sugieren que quimiocinas CC son las principales determinantes de infiltración de macrófagos y linfocitos en melanoma (Bharat, 2006). Adicionalmente, se ha observado que la expresión de receptores para quimiocinas en células cancerosas de mama no es un evento aleatorio; sólo algunos receptores, como son CXCR4 y CCR7, son expresados en estas células. El ligando para CXCR4, CXCL12, está fuertemente expresado en pulmón, hígado, medula ósea, nódulos linfáticos y en menor proporción en cerebro. Este patrón de expresión sugiere que CXCL12 puede ser responsable de metástasis en los órganos antes mencionados. De manera similar, CCL21, que es el ligando para CCR7, es expresado en mayor proporción en nódulos linfáticos que en otro sitio. Este patrón de expresión de CCR7/CCL21 correlaciona con metástasis expresadas en nódulos linfáticos (Zlotnik, 2004). Todo esto indica que las quimiocinas y sus receptores tienen un papel importante en la determinación del destino metastásico de células tumorales (Müller, 2001).

<i>Citocina</i>	<i>Fuente celular</i>	<i>Principal función en inmunidad celular.</i>
<b>IL-12</b>	Macrófagos, células dendríticas (APC profesionales)	Diferenciación de células vírgenes T CD4 <sup>+</sup> a células efectoras T <sub>H</sub> 1. Incremento de producción de INF- $\gamma$ por células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .
<b>IL-2</b>	Células T	Factor de crecimiento autócrino para células T
<b>TNF</b>	Macrófagos, células T	Reclutamiento de leucocitos
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Células T, células NK	Activación de macrófagos.
<b>IL-4, IL-13, IL-10</b>	Células T <sub>H</sub> 2. (IL-10 es producida por muchos tipos celulares)	Inhibición de activación de macrófagos. Reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado.

**Tabla 1:** Algunas citoquinas en la inmunidad celular. Abreviaciones: INF- $\gamma$ , interferon; IL-2, interleucina-12; NK, natural killer; TNF, factor de necrosis tumoral; OPN, osteopontina.

<b>Cáncer</b>	<b>Citoquinas</b>	<b>Mecanismo(s)</b>
Carcinoma cervical	IL-1a y TNF	Crecimiento
Carcinoma pancreático	IL-1a	Metástasis
Carcinoma de pulmón	IL-1a	Angiogénesis
NHL	IL-2, IL-6, TNF	Crecimiento autócrino
Cáncer de vejiga	IL-6	Transformación
Melanoma	IL-8	Crecimiento tumoral
Cáncer de próstata	Polimorfismo IL-8	Angiogénesis
Glioblastoma	IL-8	Infiltración linfoide
Tumor	IL-8	Crecimiento y angiogénesis
Melanoma	IL-18	Metástasis

**Tabla 2:** Papel de algunas citocinas en la carcinogénesis. Abreviaciones: IL, interleucina; NHL, Linfoma no-Hodgkin's.

### 3.2 Osteopontina es una citocina clave en respuestas de inmunidad celular.

La osteopontina (OPN) es una citocina que afecta diversos procesos celulares. La OPN es expresada por una variedad de células inmunes y no inmunes y está envuelta en respuestas inmunes e inflamatorias. Las fuentes

celulares inmunes que expresan OPN incluyen células B, células NK, células T activadas, macrófagos (incluyendo células derivadas de macrófagos como son osteoclastos o células de Kupffer). En células no inmunes, se ha detectado la expresión de OPN en músculo liso, células epiteliales, células endoteliales y en algunos tipos de células tumorales (Regan, 2003).

Cuando es secretada por células T activadas, OPN estimula a diferentes células del sistema inmune, particularmente macrófagos, a migrar hacia el sitio de inflamación, ya que OPN actúa como mediador de quimiotaxis a través de interacción con CD44 (Das, 2005). Adicionalmente, OPN en macrófagos induce supresión de interleucina-10 (IL-10) a través su interacción con CD44 y promueve la secreción de interleucina-12 (IL-12) al unirse a la integrina  $\alpha\nu\beta3$  (Das, 2005). En células dendríticas OPN aumenta la expresión de HLA-DR, moléculas de adhesión y promueve su diferenciación hacia fenotipo de respuesta  $T_H1$ .

El gen de OPN está localizado en el cromosoma humano 4q13. OPN de humano contiene 314 aminoácidos con un peso molecular estimado de 32 kDa, pero sufre de modificaciones pos-traduccionales como fosforilaciones y glicosilaciones. Esto resulta en una proteína con movilidad electroforética entre 44 y 75 kDa (Regan, 2003). OPN es una proteína rica en ácido siálico, cargada negativamente e hidrofílica. Estructuralmente, la OPN tiene un sitio hipersensible a proteasa que separa dos dominios de unión, uno a integrinas y otro a CD44 (Figura 3). En este sitio de separación por trombina tiene una región de secuencia conservada por muchas especies (RSK). Así, la separación por trombina de la OPN secretada, libera los dos dominios de unión a receptores distintos. (1) El fragmento N-terminal que contiene secuencia RGD (arginina-glicina-aspartato) necesita fosforilarse para unirse eficientemente al receptor de integrina (Rangaswami, 2006). El sitio RGD se une a integrinas, algunas de la clase  $\alpha\nu$  ( $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta1$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha8\beta1$  y  $\alpha5\beta1$ ) (Regan, 2003). Sin embargo, OPN tiene un segundo motivo de unión a integrinas adicional al RGD: SVVYGLR (serina-valina-valina-tirosina-glicina-leucina-arginina) (Regan, 2003). (2) El otro fragmento generado por la hidrólisis, C terminal, se une directamente a CD44v6 (Kundu, 2006).

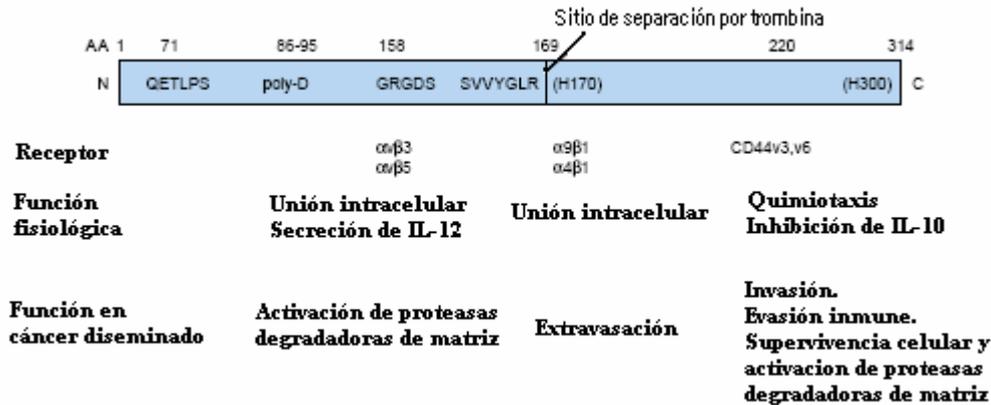


Figura 3: Representación esquemática de la estructura de osteopontina (OPN). La estructura puede ser dividida en múltiples dominios, los cuales son regulados extensivamente a nivel pos-traduccional. El sitio de separación por trombina tiene una secuencia conservada RSK. La secuencia GRGDS en la región N-terminal juega un papel crucial en ligación de OPN a integrinas como es  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 5$  de manera dependiente de fosforilación. El fragmento C-terminal se une a CD44 y regula varios eventos independientemente de modificación postraduccional (Modificada de Rangaswami, 2006).

### 3.3 La OPN estimula la formación de metástasis.

Como ya se mencionó, el primer paso en la progresión del melanoma es que los melanocitos deben adquirir la habilidad a invadir y sobrevivir en la capa dérmica. En condiciones fisiológicas, los melanocitos son restringidos a la capa basal de la epidermis porque el colágeno dérmico induce su apoptosis (Geissinger, 2002). Sin embargo, la exposición de melanocitos al factor básico de crecimiento de fibroblasto (bFGF), les permite sobrevivir en la dermis. bFGF induce la expresión de OPN (Alanko, 1999), la cual a su vez inhibe la apoptosis de melanocitos por su unión a la integrina  $\alpha\beta 3$  (Denhardt, 2005).

En células cancerosas, la sobre-expresión de OPN resulta en un incremento del fenotipo maligno pues afecta la movilidad, la adhesión, la migración y la invasión. Se piensa que ejerce efectos pro-metastásicos por su interacción con integrinas y el receptor CD44, los cuales regulan eventos de señalización que guían a la progresión del tumor (Rangaswami, 2006). Las integrinas son proteínas diméricas transmembranales, que pueden reconocer una amplia variedad de ligandos (Furger, 2001). La unión de OPN con integrina  $\alpha\beta 3$  previene muerte celular programada (apoptosis) a través de la activación del factor nuclear  $\kappa B$  (NF-  $\kappa B$ ) p65 y p50 y esto es dependiente de la activación

de Src y Ras en células endoteliales (Figura 4). La familia CD44 incluye múltiples isoformas de proteínas codificadas por un solo gen y generadas por “splicing” alternativo. Se ha identificado que varias de las isoformas se sobre-expresan en diferentes tipos de cáncer, por lo que se cree que las células cancerosas tienen una mayor capacidad para responder a osteopontina (Furger, 2001). Como consecuencia de la activación de sus receptores, OPN induce múltiples vías de transducción de señales para promover migración celular e invasión. Se ha descrito que tirosina cinasa, PLC/PKC, MAPK y PI 3'-cinasa (fosfoinositido 3-cinasa) regulan la migración celular e invasión inducida por OPN. PI 3'-cinasa es clave en la señalización de células cancerosas. La migración celular requerida durante la formación de metástasis y frecuentemente se asocia con la activación de PI 3'-cinasa. OPN induce activación de PI 3'-cinasa y activación de NF $\kappa$ B dependiente de PI 3'-cinasa, eventos que controlan la expresión de uPA así como la migración celular (Figura 4) (Das, 2005).

Adicionalmente, OPN es un miembro de la pequeña familia de genes glicoproteína enlazada-N ligando de unión a integrina (SIBLING) que tienen la capacidad de unir y modular la actividad de metaloproteinasas (MMPs). Los mecanismos moleculares de activación de MMPs por proteínas SIBLING incluyen activación enzimática de pro-MMPs y la reactivación de MMPs inhibidas por TIMP (Rangaswami, 2006). Como ya se mencionó antes, la activación de MMPs contribuye al fenotipo maligno pues facilita la migración e invasión de células cancerosas entre la matriz extracelular (ECM) (Furger, 2001).

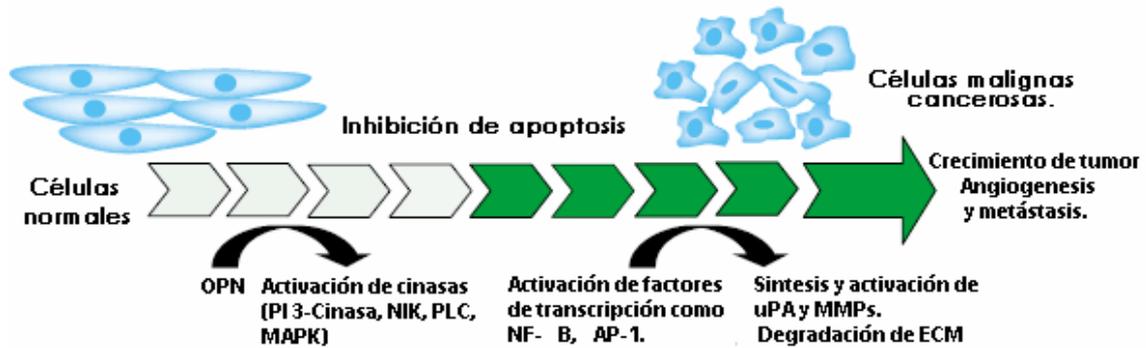


Figura 4: En este modelo se muestra el papel de OPN en la progresión tumoral. OPN induce varios eventos de señalización ya sea por su unión a integrinas o CD44. Estos eventos incluyen fosforilación y activación de cinasas (fosfoinositido 3-cinasa, NIK, PLC, MAPK) induciendo unión al DNA y transactivación de varios factores de transcripción, incluyendo NFκB y AP-1. OPN contribuye al progreso del tumor a través de inhibición de apoptosis y activación de varias proteasas que degradan la matriz extracelular, como el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y diversas metaloproteasas (MMPs) ( Rangaswami, 2006).

### 3.4 Relación entre la expresión de OPN y el fenotipo maligno.

Muchos investigadores han establecido una correlación entre los niveles altos de expresión de la proteína OPN y el fenotipo maligno de distintos tipos de neoplasias. La sobre expresión de OPN está asociada con invasión tumoral, progresión o metástasis de cánceres de mama (Tuck, 1999), estómago (Ue, 1998; Wai, 2004), pulmón (O'Regan, 2003), hígado (Pan et al, 2003) y colon (Yeatman, 2003).

Para el caso de melanoma se ha encontrado que OPN participa tanto en la carcinogénesis como en la formación de metástasis. Como ya se mencionó, el primer paso en la progresión del melanoma es que los melanocitos deben adquirir la habilidad a invadir y sobrevivir en la capa dérmica. En condiciones fisiológicas, los melanocitos son restringidos a la capa basal de la epidermis porque el colágeno dérmico induce su apoptosis (Geissinger, 2002). Sin embargo, la exposición de melanocitos al factor básico de crecimiento de fibroblasto (bFGF) les permite sobrevivir en la dermis. bFGF induce la expresión de OPN (Alanko et al, 1999), la cual a su vez inhibe la apoptosis de melanocitos por su unión a la integrina  $\alpha v \beta 3$  (Denhardt, 2005). Congruentemente, el bloqueo de la expresión de OPN por RNA de

interferencia, reduce el número de células de melanoma (Zhou, 2005). La prolongación de la supervivencia de células tumorales es uno de los mecanismos por los que OPN promueve la formación de metástasis.

Adicionalmente, se ha encontrado que en el melanoma, que es uno de los cánceres más agresivos, OPN es uno de los genes más frecuentemente sobre-expresados cuando las células cancerosas adquieren habilidades invasivas y metastásicas (Denhardt, 2005). Usando diferentes modelos experimentales se ha demostrado que cambios en la expresión de OPN, correlacionan con la formación de metástasis. Por ejemplo, células B16-F10 con una baja expresión de OPN muestran una menor capacidad para formar metástasis a pulmón (Nemoto, 2001). De manera similar, células B16-F10 tratadas con OPN purificada de humanos desarrollan más tumores en ratones que sus contrapartes no tratadas con OPN. Este efecto correlaciona con una mayor activación de NF- $\kappa$ B y una mayor expresión de pro-MMP-2 y MMP-2 activa (Philip, 2001). En otro experimento en el que se utilizaron ratones “knock out” para OPN, los ratones deficientes de OPN desarrollaron 5 veces menos tumores secundarios que los controles, tras una inyección de células B16-F10 dentro de las cavidades de la médula ósea (Denhardt, 2005).

#### **4. Factor de transferencia**

En 1949 Lawrence demostró que la transferencia de inmunidad celular era posible en humanos. Inicialmente utilizó linfocitos viables intactos de un individuo normal con una intradermorreacción (i.d.) positiva a la tuberculina y los inyectó a un individuo con una i.d. negativa a la tuberculina, provocando que este segundo individuo, al ser posteriormente retado con tuberculina, presentara una respuesta intradérmica positiva. Estas observaciones no causaron un gran impacto dentro de la comunidad científica de la época, debido en gran parte a que al linfocito no se le reconocía aún como una célula del sistema inmunológico, sino que era estudiado únicamente desde el punto de vista hematológico (Kirkpatrick, 2002). En 1955 Lawrence y col. demostraron que la hipersensibilidad cutánea tardía ó DTH (de las siglas en inglés de delayed type hypersensitivity) podía ser transferida utilizando

extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 mL de sangre total. Al componente activo de estos extractos celulares se le llamó “factor de transferencia” (FT). En estos experimentos Lawrence utilizó lisados de leucocitos de donadores que presentaban i.d. positivas a antígenos tales como coccidioidina, toxoide diftérico, proteína M del estreptococo y PPD (derivado proteico purificado). En todos los casos los receptores eran individuos con i.d. negativas a estos antígenos; 24 horas después de haber recibido el FT, los receptores eran capaces de presentar i.d. positivas a los antígenos que eran reconocidos por los donadores y el efecto parecía ser antígeno específico (Lawrence, 1955). Las investigaciones de Lawrence y col. indicaron que el FT podía pasar a través de una membrana de diálisis sin perder su actividad biológica. En 1955 dializaron con un corte molecular de 20 kDa y en 1963 con uno de 10 kDa. El empleo de membranas con este corte molecular eliminaba la posibilidad de que el efecto fuese causado por Abs (ya que el más pequeño pesa alrededor de 150 kDa). Este fenómeno complicó el entendimiento de los mecanismos inmunológicos involucrados en la transferencia, ya que los investigadores no entendían cómo moléculas tan pequeñas eran capaces de transferir la RIC de manera antígeno específica. Lawrence creyó que estos dializados contenían solo una especie molecular (Lawrence, 1955), pero hoy en día sabemos que la preparación que originalmente se llamó FT, es en realidad un conjunto de moléculas, llamadas extractos dializables leucocitarios o DLE, de sus siglas en inglés *dialyzable leukocyte extracts*. En los inicios de los 70's, Levin demostró que ciertos síndromes de inmunodeficiencias podían tratarse utilizando DLE y que éste, además de transferir la RIC, inducía la producción de citoquinas en respuesta a antígenos específicos (Levin, 1970).

#### **4.1 Especificidad del Factor de Transferencia.**

En 1981 Petersen y col. desarrollaron un modelo murino para el estudio de la transferencia de DTH, en el cual utilizaron preparaciones idénticas de DLE a partir de esplenocitos de animales no sensibilizados y sensibilizados con PPD, ferritina, citocromo C, peroxidasa de rábano o un antígeno particulado de cándida. Las preparaciones se aplicaron a ratones vírgenes y, 24 h horas después, los animales fueron retados con los diferentes antígenos empleados,

sólo reaccionando a los antígenos con los que el donador había sido previamente inmunizado. Los controles utilizados en estos experimentos fueron ratones que recibieron DLE proveniente de animales no inmunes, estos animales no presentaron DTH con ninguno de los antígenos analizados (Kirkpatrick, 2000).

El extracto dializable de leucocitos (DLE) proviene del rompimiento del paquete de leucocitos (por ejemplo del “buffy coat” de una unidad de sangre para donación) ó de células linfoides obtenidas del bazo, seguida de un proceso de diálisis donde se obtiene la fracción de bajo peso molecular que dializa. El término factor de transferencia (FT) quedará reservado únicamente a los componentes del DLE que transfieren la respuesta de linfocitos T de una manera antígeno específica y que tienen un peso molecular comprendido entre 3,500 y 6,000 Da. El consenso general es que los FT's se encuentran dentro de los componentes del DLE. Si en realidad existe un FT único para cada antígeno, entonces es posible que los factores de transferencia varíen estructuralmente de una manera muy similar a como lo hacen las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones hipervariables de las inmunoglobulinas (Ig's) o del receptor de la célula T (TCR). Entonces, se ha dividido a los componentes de los DLE's en dos fracciones principales:

A) La fracción **antígeno específica o antígeno dependiente** que corresponde a moléculas de naturaleza peptídica con un PM de 3500 a 6000 Dalton. En ella encontramos los FT, los cuales han sido identificados químicamente como péptidos pequeños con capacidad de transferir DTH. Esta fracción contiene teóricamente una multitud de diferentes FTs que corresponden a la suma de las experiencias inmunes del individuo de donde se ha obtenido el extracto. Algunas moléculas comprendidas en este fracción ya han sido analizadas y secuenciadas parcialmente en algunas especies (Kirkpatrick, 2000).

B) La fracción **antígeno inespecífica o antígeno independiente**, comprendida por moléculas por debajo de 3,500 y por arriba de 6000 Da, en la cual encontramos moléculas como prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, hipoxantina, serotonina, factores de diferenciación de linfocitos

(timosina), quimioatrayentes para monocitos y factores inmobilizadores de neutrófilo (Wilson, 1983). La fracción por debajo de los 3,500 Da fue definida por Gottlieb (1995) como IMREG, esta fracción fue estudiada como inmunomoduladora en diversos ensayos *in vitro* y se identificó dentro de ella una molécula inmunosupresora de 1000 Da denominada LSF (de sus siglas en inglés *lymphocytic supresor factor*) (Rosso, 1996).

#### **4.2 Mecanismo de acción del DLE.**

La investigación realizada a lo largo de los años ha permitido proponer varias hipótesis en cuanto al mecanismo de acción de los DLEs, a continuación mencionamos algunas de ellas:

- (1) El FT contenido dentro de los DLEs, forme parte del TCR, si esto es cierto entonces el FT sería necesario para la activación de los linfocitos, ya que ésta se efectúa al unirse el Ag a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras de antígeno (APC). Esto se apoya en que el FT específico para PPD se une exclusivamente a PPD (Kirkpatrick, 1993).
- (2) Se propone que la porción ribonucleotídica del FT se une por complementariedad al DNA que se encuentra presente en la superficie de la célula (demostrado por Cech en 1987) y una vez unidos son internalizados por medio de un receptor de DNA.
- (3) Otra alternativa sería que el FT pudiera ser cortado, de manera que una porción del péptido permaneciera en la superficie celular y de esta manera formara parte del receptor de T (Kirkpatrick, 1993).
- (4) Lawrence propuso desde 1969 que el FT podría desbloquear o desreprimir poblaciones de linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, y por lo tanto modular la misma.
- (5) En 1995, Kirkpatrick y colaboradores propusieron que la polarización hacia las respuestas tipo TH1 que se observan en las células tratadas con DLEs o en modelos "*in vivo*" se debe a la inhibición o supresión de las respuestas tipo TH2.

Ninguna hipótesis ha sido comprobada, haciendo falta realizarse más experimentos, para aceptarlas o descartarlas, ya que ninguna de ellas puede explicar todos los efectos que, en conjunto presenta la administración de DLEs.

### 4.3 Aplicaciones del DLE.

Desde finales de la década de los 70's Spitler ya reportaba el empleo exitoso de los DLEs como adyuvante en el tratamiento de diversos padecimientos, principalmente en inmunodeficiencias primarias, enfermedades infecciosas y algunas neoplasias. Los usos clínicos que se le han dado a los DLEs han sido muy variados, utilizándose recientemente en pacientes con VIH con resultados alentadores (Gottlieb, 1995). En la Tabla 3 se muestra algunos de esas aplicaciones.

Es importante dejar claro que los efectos clínicos que provoca la administración de DLEs varían de acuerdo al padecimiento en el que se emplean, además, todos los protocolos clínicos que se han realizado han utilizado los extractos completos, por lo que muchos de los efectos que se observan probablemente sean consecuencia de la mezcla compleja de moléculas del DLE.

Cabe mencionar que los DLE pueden ser utilizados inter-especie. Esto se ha establecido tratando *in vitro* células humanas con DLEs obtenidos de diferentes especies (Lawrence 1981). Adicionalmente se han administrado DLEs de cerdo, ratón, rata, pato o ganso a humanos (Tsugi 1964, Boucheix 1977, Zhan 1989), todos ellos sin pérdida de potencia o efectos adversos (Fudenberg 1993).

I.- Inmunodeficiencias severas	IV Cáncer (principalmente cuando tiene etiología viral) o para evitar metástasis específicas.
--------------------------------	---

<p>A.- Defectos congénitos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Wiskott-Aldrich</li> <li>• Ataxia telangiectasia</li> <li>• Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada</li> <li>• Síndrome parcial de Di George</li> <li>• Disgamaglobulinemia con defectos en inmunidad celular</li> <li>• Síndrome de Behcet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Melanoma</li> <li>• Cáncer de estómago</li> <li>• Cáncer de próstata</li> <li>• Cáncer de pulmón</li> <li>• Cáncer de colon</li> <li>• Osteosarcoma</li> <li>• Hipernefroma</li> <li>• Cáncer de mama</li> <li>• Carcinoma nasofaríngeo</li> </ul>
<p>II.- Enfermedades Infecciosas producidas por</p>	<p>V Hipersensibilidad</p>
<p>A.- Hongos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Candidiasis mucocutánea crónica</li> <li>• Histoplasmosis diseminada</li> <li>• Coccidioidomicosis diseminada</li> </ul> <p>B.- Virus</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Citomegalovirus</li> <li>• Herpes zoster</li> <li>• Sarampión</li> <li>• Varicela</li> <li>• Hepatitis</li> </ul> <p>C.- Bacterias</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tuberculosis</li> <li>• Lepra</li> <li>• Micobacteriosis por <i>avium</i></li> <li>• Brucelosis</li> <li>• Gram positivas</li> <li>• Gram negativas</li> </ul> <p>D.- Protozoarios</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leishmaniasis cutánea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asma bronquial</li> <li>• Dermatitis atópica</li> <li>• Síndrome de Hiper IgE</li> <li>• Alergias</li> </ul>
<p>III.- Enfermedades autoinmunes</p>	<p>VI Otros</p>

**TABLA 3.** Padecimientos en los se emplean exitosamente los DLEs

## **II. Objetivo:**

El presente trabajo pretende analizar el efecto de DLEs sobre:

- (1) La formación de metástasis experimentales, utilizando un modelo singénico de melanoma.
- (2) La expresión de osteopontina (OPN) plasmática.
- (3) La viabilidad de la línea celular de melanoma de murino B16-F10.
- (4) La expresión de OPN soluble en cultivos de células B16-F10.

## **III. Hipótesis:**

En el modelo de ratón singénico utilizado para evaluar la formación de metástasis experimentales, la administración del DLE reducirá la expresión de OPN, lo cual correlacionará con una disminución de nódulos metastásicos en pulmón.

## **IV. MATERIAL Y METODOS.**

### **1. Material biológico.**

#### **1.1 Línea celular.**

Se utilizó la línea celular B16-F10 de melanoma murino. La línea celular fue cultivada rutinariamente en medio RPMI 1640 suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Gibco), y una mezcla de antibióticos (penicilina 5 mg/mL, estreptomycin 10 mg/mL y neomicina 10 mg/mL, Gibco). Los cultivos se mantuvieron incubados en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, a una temperatura constante de 37 °C. Se utilizaron botellas de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> de área (Nunc), en un volumen de 10 mL, hasta obtener una monocapa confluyente. Las células se cosecharon con una solución de tripsina/EDTA (0.05%/ 0.5 mM, Gibco) y se contaron con un hematocitómetro evaluando simultáneamente la viabilidad por exclusión de azul tripan. En todos los casos se utilizaron cultivos con viabilidad igual o mayor al 95%.

#### **1.2. Extractos dializados de leucocitos (DLEs).**

Utilizamos dos diferentes DLEs: 1) DLE-H37Rv y 2) DLE-C57. Ambos fueron producidos y proporcionados por la Mtra. Mayra Pérez Tapia, investigadora de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. El procedimiento para la obtención del DLE “DLE-H37Rv” consistió en administrar  $2.5 \times 10^5$  células de M. tuberculosis de la cepa virulenta H37Rv, resuspendidas en 100 µL de PBS, en la tráquea de un ratón BALB/c. Después de 21 días de infección, los ratones fueron sacrificados, sus bazos removidos asépticamente y lisados con 10 ciclos de calor y enfriamiento (78 °C y 37°C). Los lisados fueron dializados contra agua según el procedimiento de Fabre (Fabre, 2004). El DLE es el producto de la diálisis. Se considera una unidad de DLE como el dializado obtenido de  $1 \times 10^6$  de células de bazo de ratón. Para DLE “DLE-C57” se utilizaron ratones C57BL6 a los que no se les administró M. tuberculosis. El resto del procedimiento de obtención fue el mismo que para “DLE-H37Rv”

### **2. Estudios *in vivo*.**

#### **2.1 Efecto de DLEs en la formación de metástasis experimentales.**

La formación de metástasis experimentales se define como la generación de tumores en distintos órganos debido a la administración intravenosa de células cancerosas a un roedor singénico. Las células B16-F10 tienen la capacidad de extravasar y formar tumores en distintos órganos, pero con mayor preferencia en el pulmón. Se utilizaron dos diferentes DLEs: “DLE-H37Rv” y “DLE-C57”. Durante 7 días consecutivos se les administró por vía esofágica el correspondiente DLE a cada grupo de ratones (Tabla 4). Al grupo control solo se administró agua debido a que éste fue el medio de disolución de los DLEs. Al día 8 fueron administradas por vía intravenosa  $1 \times 10^6$  células B16-F10 en la cola de ratones machos C57BL/6 (7-9 semanas de edad). Estas células B16-F10 fueron previamente cultivadas como ya se describió anteriormente, cosechadas y resuspendidas en solución salina balanceada de Hank. Tres semanas después de la administración intravenosa de células B16-F10, los roedores fueron sacrificados por dislocación cervical y se extirparon los pulmones. Los nódulos metastásicos fueron cuantificados bajo disección en microscopio estereoscópico. Los datos experimentales fueron almacenados en un programa computacional de análisis estadístico (GraphPad Prism version 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California). Se utilizó la prueba de Bonferroni para las comparaciones estadísticas. Las diferencias con probabilidad menor a 0.05 son consideradas estadísticamente significativas, comparándolas contra el grupo control.

<b>Grupo de ratones</b>	<b>Dosis administrada por ratón durante 7 días</b>
DLE-H37Rv	1 U de DLE/ratón (4 ratones)
	0.1 U de DLE/ratón (5 ratones)
DLE-C57	1 U de DLE/ratón (6 ratones)
	0.1 U de DLE/ratón (6 ratones)
Control	Agua en volumen equivalente al del DLE (6 ratones)

**Tabla 4. Esquema de administración del DLE a grupos de ratones, así como la dosis administrada.**

## **2.2 Efecto del DLE en la expresión de OPN de plasma de roedores.**

A un grupo de 3 ratones C57BL/6 se les administró durante 7 días el extracto de leucocitos dializados DLE-C57 a la dosis de 1 U/ratón/día por vía esofágica. A los 3 ratones controles sólo se les administró agua por ser el medio de disolución para el factor de transferencia. Al día 8 se les extrajo sangre del plexo retro-orbital utilizando un capilar. La sangre se mezcló con anticoagulante EDTA a la concentración de final de concentración final 1,5 mg/dl. Posteriormente se procedió a realizar las determinaciones de OPN mediante ELISA. Se utilizó un estuche comercial que determina cuantitativamente OPN de ratón en fluidos biológicos (Assay Designs, Ann Arbor, Michigan). Se siguieron instrucciones del fabricante. Básicamente las muestras se incubaron en una placa de 96 pozos que tenía inmovilizado un anticuerpo policlonal anti-OPN. Posteriormente, se realizaron lavados y se incubó con otro anticuerpo anti-osteopontina, el cual estaba conjugado con una enzima peroxidasa. Se lavó la placa para quitar el exceso de anticuerpo y se procedió a la adición del sustrato. Por último, se leyó la placa a absorbancia de 450 nm con corrección a 570 nm. A la par de las muestras se corrieron estándares de OPN de concentración conocida que fungieron como datos para una curva patrón. Los datos experimentales fueron almacenados en un programa computacional de análisis estadístico (GraphPad Prism version 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California). Se utilizó la prueba de Student. Diferencias de  $p < 0.05$  fueron consideradas como significativamente diferentes comparándolas contra el grupo control.

## **3. Estudios *in vitro*.**

### **3.1 Evaluación del efecto citotóxico del DLE.**

Utilizando placas de 96 pozos estériles (Nunc) se sembraron células de la línea B16-F10 a una densidad de 10 000 células por pozo, contenidas en 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Tras dejar que las células se adhirieran toda la noche, se cambió el medio de cultivo por medio fresco con la correspondiente concentración del DLE-H37Rv o DLE-C57. El intervalo de concentraciones varió en progresión logarítmica base 10 entre 1  $\mu$ U/mL y 0.1 U/mL. Las células control fueron expuestas a medio de cultivo solamente, debido a que éste fue

utilizado como disolvente para el factor de transferencia. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Después de 24 h, se evaluó la viabilidad de las células tratadas, mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT (Mosmann, 1983). Este ensayo se basa en la capacidad mitocondrial de las células vivas de reducir el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil tetrazolio), soluble en agua y de color amarillo, a formazán de MTT (1-[4,5-dimetil tiazol-2-il]3-3,5-difenilformazan) insoluble en agua y de color púrpura. Para realizar esta prueba se adicionaron 20  $\mu$ L de la solución de MTT al 0.5% (P/V) a 100  $\mu$ L de medio existentes en cada pozo. Las células se incubaron por 90 min a 37°C y posteriormente se retiró el medio que contenía el MTT no reducido. Enseguida se adicionaron 200  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales formados de formazán de MTT. Se leyó la absorbancia de las soluciones formadas en un lector de microplacas (Biotek EL311) a una longitud de onda de 570 nm. El mismo procedimiento se realizó para 48 horas de exposición de células B16-F10 con factor de transferencia.

### **3.2 Efecto del DLE sobre la secreción de OPN soluble en células B16-F10.**

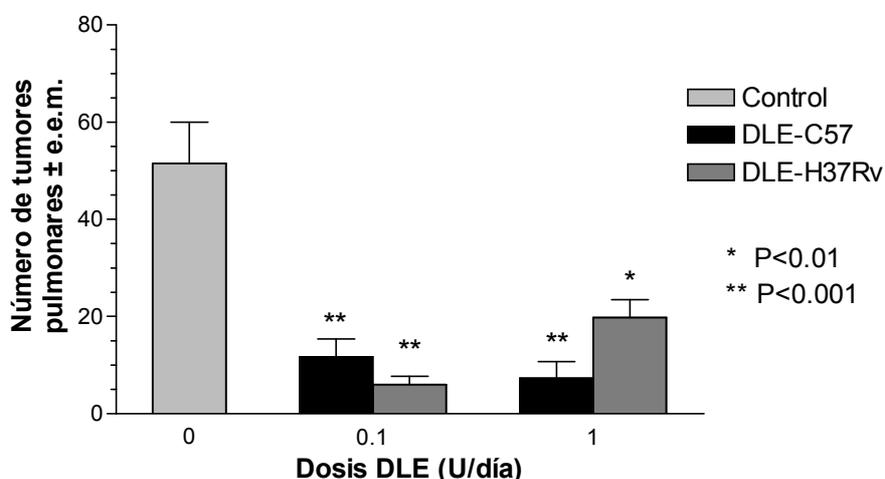
Utilizando cajas petri estériles de 10 cm de diámetro, se sembraron  $1 \times 10^6$  células B16-F10 por caja. Tras dejar que las células se adhieran durante toda la noche, se cambió el medio de cultivo por medio fresco conteniendo 10 mU/mL de DLE-C57. Posteriormente las células se incubaron a dos diferentes tiempos de exposición: 24 y 48 h junto con sus respectivos controles. Los tratamientos de las células así como sus controles se realizaron por duplicado. Al término del tiempo de exposición, se recolectó el medio de cultivo y se congeló a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Las determinaciones de OPN en el sobrenadante de los cultivos se realizó por medio del estuche comercial de cuantificación de OPN de ratón (Assay Designs, Ann Arbor, Michigan) como ya se indicó en el apartado 2.2 de la presente sección.

## V. Resultados.

### Estudios “*in vivo*”.

#### 5.1 Efecto de los DLEs en la formación de metástasis experimentales.

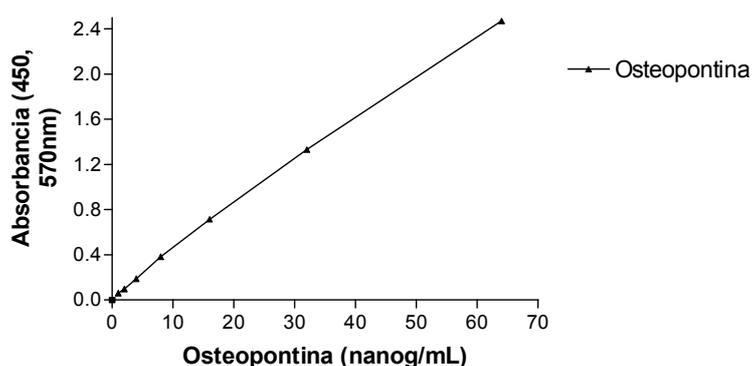
En los modelos de metástasis experimentales, la formación de tumores en distintos órganos se debe a la administración intravenosa de células cancerosas a animales singénicos. En nuestro modelo, se administraron células B16-F10 por vía intravenosa a ratones C57BL/6; estas células tienen la capacidad de extravasar y formar tumores secundarios en pulmón. El tratamiento de los ratones con los DLEs (DLE-H37Rv y DLE-C57) durante los 7 días previos a la administración de células cancerosas modificó el número de metástasis experimentales desarrolladas en los roedores. El tratamiento de los roedores con cualquiera de los factores de transferencia, previo a la administración de células B16-F10, disminuyó el número de nódulos metastásicos comparando contra el control (Figura 5).



**Figura 5.** Efecto de DLEs en la formación de metástasis experimentales. *Durante los primeros 7 días se administró por vía esofágica el correspondiente DLE (DLE-H37Rv y DLE-C57). Al día 8 se administró por vía i.v. células B16-F10 y tres semanas después se sacrificaron los roedores y se cuantificaron los nódulos metastásicos pulmonares, los cuales se representan en las gráficas. Se detectaron diferencias significativas comparándolas contra el control utilizando la prueba estadística comparación múltiple de Bonferroni.*

## 5.2 Efecto de DLEs en la expresión de OPN de plasma de roedores.

Para estudiar la participación OPN en el efecto de los DLEs sobre la formación de metástasis, analizamos la concentración de OPN en muestras de plasma. A un grupo de roedores se les administró el DLE-C57 a la dosis de 1 U/ratón durante 7 días consecutivos y al grupo control se le administró agua en volumen equivalente al del DLE. Al día 8 se les extrajo sangre de plexo retro-orbital, la cual se mezcló con EDTA para evitar su coagulación y obtener plasma. La cuantificación de OPN se realizó por medio de un estuche comercial (ver "Material y Métodos"). Dentro de las determinaciones hechas se corrieron estándares de concentración conocida de OPN, con los cuales se construyó una curva patrón (Figura 6)



**Figura 6. Curva patrón de Osteopontina (OPN).** Cada punto de la curva corresponde al promedio de dos determinaciones +/- e.e.m.

Las determinaciones realizadas de las muestras de plasma de roedores se observan en la Tabla 5. Utilizando la prueba "t Student" se determinó que no hay diferencias significativas en los niveles de OPN entre el grupo de ratones tratados con DLE-C57 y el grupo control.

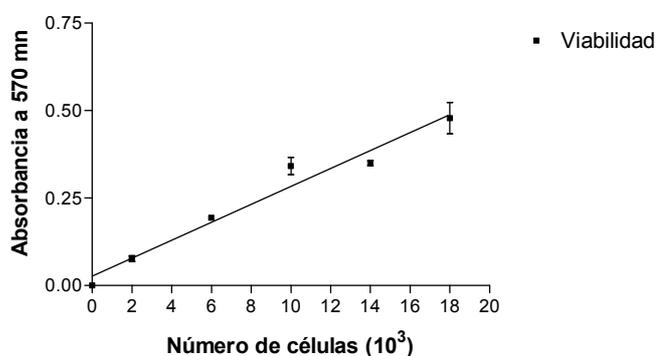
**Tabla 5. Efecto del DLE C57 sobre la expresión de OPN en plasma de roedores.**

	Número de ratones	OPN [ $\mu\text{g/mL}$ ] (promedio +/- e.e.m.)
<b>DLE C57</b>	<b>3</b>	<b>4.93 +/- 2.12</b>
<b>Control</b>	<b>3</b>	<b>3.44 +/- 1.16</b>

## Estudios “in vitro”

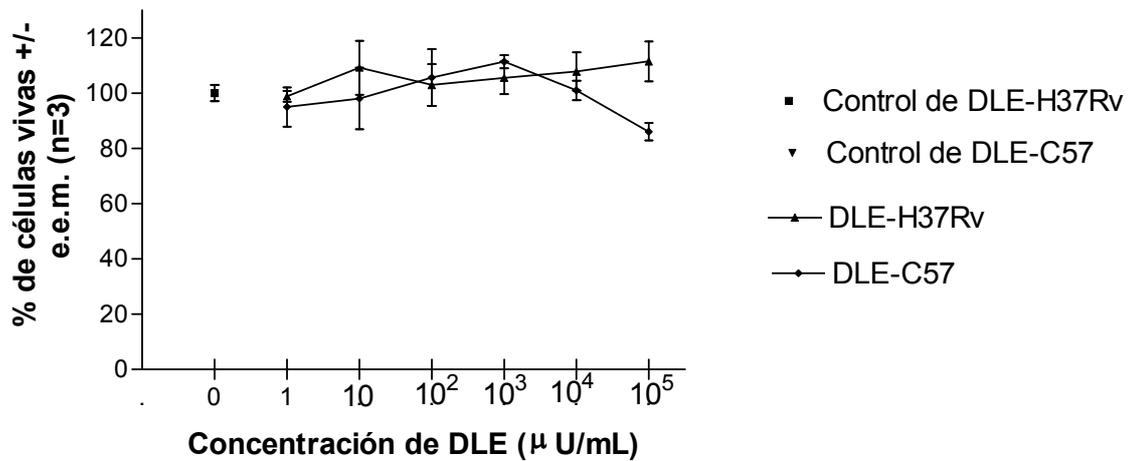
### 5.3 Evaluación del efecto citotóxico de los DLEs.

Con el objetivo de conocer si los cambios en la formación de metástasis experimentales se deben a un efecto citotóxico de los DLEs sobre las células B16-F10. Se determinó el efecto de los DLEs sobre la viabilidad celular mediante el método de reducción de MTT. Con esta metodología la señal de absorbancia varía de forma lineal con el número de células vivas (Figura 7)

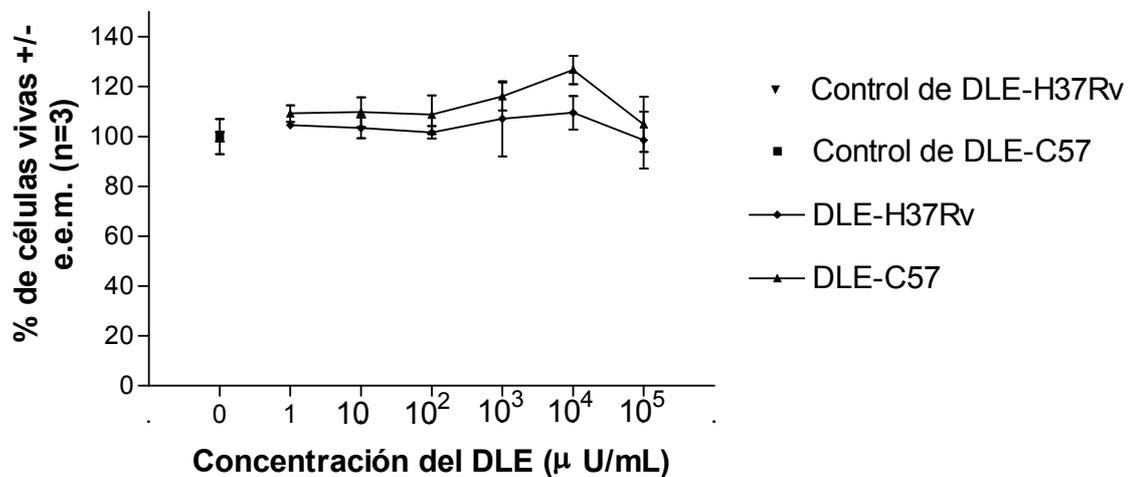


**Figura 7. Curva estándar para la reducción del MTT.** Cada punto de la curva corresponde al promedio de tres determinaciones  $\pm$  e.e.m.

Las concentraciones de DLE-H37Rv y DLE-C57 probadas en células B16-F10 fueron 1  $\mu$ U/mL, 10  $\mu$ U/mL, 100  $\mu$ U/mL, 1 mU/mL, 10 mU/mL y 100 mU/mL. Los controles fueron células sin tratamiento, debido a que los DLEs se disolvieron en medio de cultivo. Los experimentos se realizaron a dos tiempos de exposición: 24 y 48 h. Los resultados se muestran en las figuras 8 y 9. En los resultados se puede observar que no se afectó significativamente la viabilidad las células B16-F10 posterior al tratamiento con cualquiera de los dos factores de transferencia a las concentraciones probadas comparadas con sus respectivos controles. Basados en estos resultados se decidió utilizar la concentración de 10 mU/mL para posteriores estudios en “in vitro”. Esto se debe a que sí bien los datos muestran que no hay diferencias significativas sobre la viabilidad de las células posterior al tratamiento con diferentes concentraciones del DLE, sí se logra detectar una tendencia descendente apenas perceptible. Por lo tanto en vez de utilizar la concentración máxima (100mU/mL) se decidió utilizar la inmediata inferior probada debido a que se tenía el riesgo de utilizar una concentración citotóxica.



**Figura 8.** Efecto de la exposición de células B16-F10 a DLEs (24 horas). *Los datos presentados en esta grafica corresponden a dos experimentos independientes. Las células tratadas con cualquiera de los DLEs, DLE-H37Rv o DLE-C57, no presentan diferencias significativas al compararlos contra el control. Cada punto de la curva corresponde al promedio de tres determinaciones ± e.e.m.*



**Figura 9.** Efecto de la exposición de células B16-F10 a DEL (48 horas). *Los datos presentados en esta grafica corresponden a dos experimentos independientes. Las células tratadas con cualquiera de los DLE, DLE-H37Rv o DLE-C57, no presentan diferencias significativas al compararlos contra el control. Cada punto de la curva corresponde al promedio de tres determinaciones ± e.e.m.*

#### **5.4 Efecto del DEL-C57 sobre la secreción de OPN soluble en células B16-F10.**

Dado que OPN puede ser secretada por células cancerosas y tener efectos autócrinos, se decidió estudiar el efecto del DLE sobre la secreción de OPN por células B16-F10. Cultivos de células B16-F10 se trataron con 10 mU/mL de DLE-C57. Se estudiaron dos tiempos de exposición: 24 y 48 h. Se recolectó el sobrenadante de los cultivos posterior a la exposición con DLE-C57 y se procedió a cuantificar OPN. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en los niveles de OPN secretada, entre el tratamiento de células B16-F10 con DEL-C57 y el control, en ninguno de los dos tiempos de exposición. Cabe señalar que la concentración de OPN aumentó aproximadamente el doble entre las 24 y las 48 h de exposición.

**Tabla 6. Efecto del DEL-C57 sobre la secreción de OPN en células B16-F10.** Los resultados provienen de dos experimentos independientes.

Tratamiento	n	OPN (ng/mL) +/- e.e.m.	
		24 horas	48 horas
<b>FT C57</b>	<b>2</b>	<b>15.30 +/- 5.56</b>	<b>25.53 +/- 1.47</b>
<b>Control</b>	<b>2</b>	<b>13.75 +/- 1.10</b>	<b>26.41 +/- 1.59</b>

## VI. Discusión.

En el modelo de metástasis experimentales que montamos, los dos DLEs evaluados fueron capaces de disminuir el número de nódulos metastásicos en pulmón. DLE-H37Rv proviene del dializado de esplenocitos de ratones que fueron expuestos a M. tuberculosis (cepa H37Rv). La infección por M. tuberculosis es controlada principalmente por respuestas inmunes celulares (RIC), con una alta producción de citocinas  $T_H1$ . En contraste, DLE-C57 proviene de ratones que no fueron expuestos a ningún antígeno. Nuestros resultados muestran que tanto el DLE que proviene de ratones con una RIC activa con una polarización hacia al patrón de citocinas  $T_H1$ , como el DLE de ratones sanos son igualmente capaces de disminuir el número de nódulos metastáticos pulmonares. Este hecho sugiere que el efecto antimetastático de los DLEs se debe a la fracción independiente de antígeno. Por esta razón, en algunos de los estudios posteriores sólo se utilizó DEL-C57.

En nuestros experimentos sólo evaluamos 2 dosis de los DLEs (0.1 y 1 U/ratón), pero ambas mostraron ser igualmente efectivas para disminuir la formación de metástasis. Con estas dosis se han reportado efectos protectores de DLEs en otras patologías, especialmente infecciosas (Fabre, 2004).

Los modelos de metástasis experimentales no se ajustan fielmente a la realidad, pues al administrar directamente las células cancerosas en la circulación, se omiten varias de las etapas que el proceso de metástasis tendría en el curso normal de una neoplasia. Esto es una desventaja para la evaluación del efecto de posibles agentes antimetastáticos. Por esto, sería recomendable analizar si el efecto de los DLEs se conserva en un modelo de metástasis espontáneas, que es más cercano a lo que pasa en los pacientes. Utilizando las mismas células B16-F10, podría generarse un tumor primario en la piel de ratones C57BL/6, y estudiar si la administración de DLE aún es capaz de disminuir el número de nódulos metastáticos en pulmón (Schmitz, 2000).

Sin embargo, el modelo de metástasis experimentales, además de ser más rápido, tiene como ventaja que sabemos que nuestro agente

antimetastásico tendría que estar afectando alguna de las siguientes etapas del proceso de metástasis: 1) adherencia de las células cancerosas al endotelio vascular; 2) extravasación de las células adheridas; 3) migración de las células; y 4) proliferación en el tejido blanco. Las posibles explicaciones de cómo los DLEs pudieran modificar cada una de las etapas se discuten a continuación.

(1) Adherencia al endotelio. En el melanoma existe una relación entre la expresión de moléculas de adhesión al endotelio vascular y el fenotipo maligno. Por ejemplo, se ha detectado que la sobre-expresión de ICAM-1 (Howell, 2005) o de ARM-1 (Simins, 1999) facilita la adhesión de células tumorales a la vasculatura. Actualmente no se sabe si los DLEs son capaces de cambiar la expresión de receptores de adhesión relacionados con este fenómeno.

(2) Extravasación. Se sabe que las células tumorales responden a citocinas y quimiocinas. Estas señales favorecen la extravasación de células tumorales de manera similar a como lo hacen con leucocitos. Se ha demostrado que las células tumorales, una vez adheridas al endotelio vascular, son guiadas a sitios específicos por agentes quimioattractores. Como se mencionó con anterioridad, OPN puede funcionar como quimiocina (Das, 2005). Existen estudios que ponen de manifiesto que el factor de transferencia afecta la expresión de OPN (Perez, 1999). Nosotros evaluamos el efecto de DLE en la concentración plasmática de OPN y los resultados muestran que los tratamientos no producen modificaciones. Sin embargo, OPN puede expresarse en diferentes tejidos generando gradientes que dirijan la extravasación en un órgano en particular. Por lo tanto sería recomendable estudiar si los DLEs modifican la expresión local de OPN en pulmón.

Adicionalmente, existen otras proteínas que no analizamos en este estudio, que pudieran sufrir modificaciones como consecuencia del tratamiento con DLEs. Por ejemplo, en células de melanoma existe una sobre-expresión del receptor CXCR4, el cual en condiciones normales tiene una expresión baja o nula. A este receptor se le une el ligando CXCL12 (Kakinuma, 2006) y como consecuencia de la interacción, se modula la migración de células tumorales así como la formación de metástasis (Müller, 2001). Actualmente se desconoce

si los DLEs son capaces de cambiar la expresión de quimiocinas como CXCL12, o la de sus receptores como CXCR4.

(3) Migración de células cancerosas. Como ya se describió, OPN puede controlar la motilidad celular, la invasividad y el crecimiento tumoral (Das, 2005). Esta proteína puede ser expresada por muchos tipos de células, incluyendo las mismas células cancerosas. Por esta razón, decidimos estudiar el efecto del tratamiento *in vitro* de células B16-F10 con el DLE-C57. El tratamiento con una concentración alta de DLE (10 mU/ml) no cambia la expresión de OPN en cultivos de células B16-F10. Por lo que descartamos la posibilidad de que el efecto antimetastásico del DLE esté relacionado con cambios en la expresión de OPN.

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) juegan un papel importante en la invasión y migración, al ser enzimas capaces de degradar la matriz extracelular. Existe una relación entre altos niveles de expresión de MMPs y el fenotipo maligno del melanoma. En particular, MMP-2 y MMP-9 se encuentran elevadas en suero de pacientes con melanoma (Redondo, 2005). Aún no se determina si el factor de transferencia modifica la expresión y/o la actividad de algunas de estas MMPs, por lo que se requieren estudios posteriores.

(4) Proliferación. Una vez que las células tumorales se han establecido en un sitio distinto al del tumor primario, comienzan a proliferar. Dado que en el modelo utilizado se contó el número de tumores pulmonares macroscópicos, la disminución del número de nódulos metastáticos producida por los DLEs podría deberse a una disminución en la proliferación o la viabilidad de las células cancerosas. Sin embargo, cuando estudiamos el efecto citotóxico *in vitro* de los DLEs, encontramos que éstos no afectan la viabilidad de las células de melanoma. Estos datos muestran que no existe relación entre un efecto citotóxico directo de los DLEs y el efecto antimetastásico.

En conjunto, nuestros datos muestran que los DEL podrían tener aplicación como agentes antimetastásicos y ser utilizados como adyuvantes en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, en particular, en melanoma. El

mecanismo de acción por el cuál los DLEs disminuyen la formación de metástasis no involucra cambios en la expresión de OPN, por lo que se requieren estudios posteriores en los que se analice la participación de otras moléculas como las propuestas en este apartado.

## VII. Conclusiones.

- Se estableció en nuestro laboratorio el modelo murino de metástasis experimentales. Utilizando este modelo, los extractos dializados de leucocitos DLE-H37Rv y DLE-C57 inhiben al menos 4 veces la formación de nódulos metastásicos en pulmón.
- La fracción antígeno inespecífica del DLE es la responsable del decremento de nódulos metastásicos en pulmón evaluado en el modelo de metástasis experimentales.
- En experimentos *in vitro* los extractos dializados de leucocitos DLE-H37Rv y DLE-C57 no afecta la viabilidad de las células B16, por lo tanto el decremento de nódulos metastásicos en pulmón no esta relacionado con un efecto citotóxico del DLE.
- El efecto del DLE en el modelo de metástasis experimentales no provoca cambios en la expresión de OPN. OPN no está implicada sobre la inhibición de la formación de metástasis experimentales pero se cree que otras citoquinas como es el caso de algunas quimiocinas si lo estén.
- Se requieren estudios posteriores para aclarar el mecanismo de acción del DLE
- En el modelo murino singénico de metastasis experimentales la administración del DLE-H37Rv o DLE-C57, reduce la formación de nódulos metastásicos en pulmón. Este efecto no correlaciona con cambios en la expresión de OPN.

### **VIII. Bibliografía:**

Abbas A, Lichtman A, Sober J, 2000, Cellular and Molecular Immunology, Ed. W.B., Saunders company, Chapters 16 y 17.

Alanko T, Rosenberg M, Saksela O, 1999, FGF expression allows nevus cells to survive in three-dimensional collagen gel under conditions that induce apoptosis in normal melanocytes, *Journal Investigative Dermatology*, 113: 111-119.

Bharat B, 2006, Inflammation and cancer: How hot is the link?, *Biochemical Pharmacology*, bcp-9107: 1- 17.

Carmeliet M, 2005, Angiogenesis in life, disease and medicine, *Nature*, 438: 1-9

Denhardt D, 2005, Osteopontin expression correlates with melanoma invasion, *Society for Investigative Dermatology*, 124(5): 1-10.

Das R, Subha P, Ganapati H, Mahabeleshwar, Anuradha B, Gopal C, 2005, Osteopontin: It's role in regulation of cell motility and nuclear factor  $\kappa$ B-mediated urokinasa type plasminogen activator expression, *Life*, 57:441-447.

Dunn G, Old L, Shreiber R, 2004, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting, *Immunity*, 21:137 – 148.

Fabre R, Pérez T, Aguilar L, Rangel M, Estrada-Garcia I, Hernández-Pando R, 2004, Transfer factors as inminotherapy and supplement of chemotherapy in experimentla pulmonary tuberculosis, *Clinical and Experimental Immunology*, 136: 215 – 223.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM, GLOBOCAN 2002, Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 2.0. IARC CancerBase No. 5, Lyon, IARCPress, 2004, <http://www-depdb.iarc.fr/globocan2002.htm>

Franks L, Teich N, 1998, Introduction to the cellular and molecular biology of cancer, Ed. Oxford university press, United states, Cap. 1, 2, 4, 6

Fudenberg H, Pizza G, 1993, Transfer factor 1993: New frontiers, *Progress in Drug Research*, 42: 309-400.

Furger K, Menon R, Tuck AI, 2001, The funtional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis, *Current Molecular Medicine*, 1: 621–632.

Gao J, Tsuda Y, Katayama K, Nakayama T, Hatanaka Y, Tani Y, 2003, Antitumor effect by interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine CCL27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector, *Cancer Research*, 63:15: 4450-4425.

Geissinger E, Weisser C, Fisher P, Scharl M, Wellbrock C, 2002, Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen, *Cancer Research*, 62: 4820–4828.

Gottlieb A, Sizemore R, Gottlieb M, Kern C, 1995, Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease, *Biotherapy*, 9:27-31

Houghton A, Polsky D, 2002, Focus on melanoma, *Cancer Cell*, 2:4:275-278.

Howell W, Rose-Zerilli M, Theaker J, Bateman A, 2005, ICAM-1 polymorphisms and development of cutaneous malignant melanoma, *International Journal of Immunogenetics*, 32:367-375.

Kakinuma T, Hwang S, 2006, Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis, *Journal of Leukocyte Biology*, 70: 639-651.

Kirkpatrick C, 1993, Structural nature and functions of transfer factors, *Annals of New York Academy of Sciences*, 685:362

Kirkpatrick C, 2000, Transfer Factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules, *Molecular Medicine*, 6:332-341

Lawrence H, Borkowsky W, 1981, Transfer Factor: Recent developments in the pursuit of idea, *Cellular Immunology*, 63:301-309.

Lawrence H, 1955, The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes, *Journal Clinical Investigative*, 34: 219.

Levin A, 1970, Wiskott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunology deficiency: clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 67:821-828

Mosmann T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to preoliferative and cytotoxic assays, *Journal Immunologic Methods*, 65: 55–63.

Nemoto H, Ritling S, Yoshitake H., Furuya K, Amagasa T, Tsuji K, Nifuji A, Noda M, 2001, Osteopontin deficiency reduces experimental tumor cell metastasis to bone and soft tissues, *Journal Bone Miner Research*, 16(4): 652.

Müller A, Horney B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, 2001, Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis, *Nature*, 410: 50 – 57.

Pan H, Ou Y, Peng S, Liu S, Lai P, Lee P, Sheu J, Chen C, Hsu H, 2004, Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma, *Cancer*, 98(1) : 119-128.

Philip S, Bulbule A, Kundu G, 2001, Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor- $\kappa$ B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (48): 44926-44935.

Perez M, 1999, Efecto del factor de transferencia, México D. F., Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis para obtener el grado de licenciatura, 50 pp.

Rollins B, 2006, Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *European Journal of Cancer*, 42: 760-767.

Rangaswami H, Bulbule A, Kundu G, 2006, Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression, *Trends in Cell Biology*, 16:2: 1-12.

Redondo P, Lloret P, Idoate M, Inores S, 2005, Expression and serum level of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression, *Clinical and Experimental Dermatology*, 30 (5): 541-547.

Regan A, 2003, The role of osteopontin in lung disease, *Cytokine Growth Factor Reviews*, 14: 479–488.

Rossi D, Zlotnik A, 2000, The biology of chemokines and their receptors, *Annual Review Immunology*, 18:217-225.

Rozzo J, Kirkpatrick C, 1988, Murine transfer factor. IV Studies with genetically regulated immune responses, *Cellular Immunology*, 115:130-145.

Ruddon R, 1995, *Cancer Biology*, Ed. Oxford University Press, Oxford, Chapters 1, 2, 6, 11

Schimitz A, Govek, Böttner B, Van L, 2000, Rho GTPases: signaling, migration and invasion, *Experimental Cell Research*, 261:1-12

Simins A, Wighardt H, Weidner K, Weidle U, Holzmann B, 1999, Functional cloning of ARM-1, an adhesion-regulating molecule upregulated in metastatic tumor cell, *Clinical and Experimental Metastasis*, 17: 641-648.

Song J, 1998, Tumor immunology: The glass is half full, *Immunity*, 9:757–763.

Tannock I, Hill R, 1998, *The Basic Science of Oncology*, Ed McGraw-Hill, México, 219-240.

Tuck A, Arsenault D, O'Malley F, Hota C, Ling M, Wilson S, Chambers A, 1999, osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells, *Oncogene*, 18 (29): 4237.

Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, Tahara E, 1998, Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer, *International Journal Cancer*, 79(2): 127.

Wai P, Kou P, 2004, The role of osteopontin in tumor metastasis, *Journal of Surgical Research*, 121: 228-241

Wilson G, Fudenberg HH, 1983, Is controversy about transfer factor therapy nearing an end?, *Immunology Today*, 4:157-161

Yeatman T, Chambers A, 2003, Osteopontin and colon cancer progression, *Clinical and Experimental Metastasis*, 20(1): 85.

Zhou Y, Dai D, Martinka M, Su M, Zhang Y, Campos E, Dorocicz I, Tang L, Hustsman D, Nelson C, Ho V, Li G, 2005, Osteopontin expression correlates with melanoma invasion, *The Society for Investigative Dermatology*, 124: 5-15.

Zlotnik A, Yoshie O, 2000, Chemokines: a new classification system and their role in immunity, *Immunity*, 12: 121 – 127.

Zlotnik A, 2004, Chemokines in neoplastic progression. *Seminars in Cancer Biology*, 14: 181-185.