



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Determinación por RT-PCR de la regulación de IL-4,
IL-10, IFN-gamma y TNF-alfa en células de bazo de
ratones con melanoma, tratados con IL-2 encapsulada.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O

P R E S E N T A:
EVELIN NIEVES ESCAMILLA BELLO

DIRECTORA DE TESIS:

M en C. ROSALVA RANGEL CORONA



MEXICO, D.F. Octubre de 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

Carrera de Biología

Tesis que presenta: Evelin Nieves Escamilla Bello

Directora de tesis: M en C. Rosalva Rangel Corona

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de oncología celular L-4 PB, de la unidad multidisciplinaria de investigación experimental “UMIEZ” de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y la asesoría del Dr. Benny Weiss Steider.

Durante la realización de esta tesis se contó con apoyo del programa PAPIIT Convenios. IN 216500 y IN210306 de la DGAPA.

MÉXICO D.F. OCTUBRE DEL 2007

Agradecimientos:

A la M en C. Rosalva Rangel Corona, por su dirección y ayuda en la realización de la tesis.

A los miembros del jurado:

M en C. Rosalva Rangel Corona
M. C. Raúl Zavala Chavero
Biól. Carlos Martínez Montoya
M. en C. Hugo López Muñoz
Biól. J. Misael Vicente Hernández Vázquez

Por su valiosa contribución y asesoría en la elaboración de esta tesis.

A todos los miembros de la UMIEZ.

A todo el personal del Bioterio de la FES Zaragoza por su cooperación en el mantenimiento de los animales.

A Reynalda Roldan Pérez por el apoyo en la elaboración de los liposomas cationicos.

Al Sr. José Chavarria por el mantenimiento de los materiales del laboratorio.

Al Dr. Benny Weiss, Dra. Teresa Corona, Dr. Arturo Valle, Dra. Isabel Soto, Dra. Lourdes Mora y al Dr. Jorge Mendoza.

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES POR CREER EN MÍ Y SOBRE TODO POR APOYARME PARA CUMPLIR ESTE SUEÑO A PESAR DE LOS OBSTACULOS.

A MIS HERMANOS POR DEMOSTRARME SU APOYO INCONDICIONAL

A MIS AMIGOS DE GENERACION: ITZEL, JULIO, REYNA, CHRISTIAN, EFREN, IVONNE, DAVID, ANTONIO, JESUS, LUIS ALBERTO, JUAN CARLOS, POR COMPARTIR EXPERIENCIAS INOLVIDABLES DURANTE LA CARRERA.

A MIS AMIGOS DEL LABORATORIO: KARLA, OCTAVIO, NANCI, GRISELDA, ANDRES, ALEJANDRO Y ARTURO POR SU AMISTAD.

Índice

Abreviaturas.....	i
Resumen.....	ii
Introducción.....	1
Marco Teórico.....	2
Planteamiento del problema.....	36
Hipótesis.....	37
Objetivos.....	38
Materiales y Método.....	39
Resultados.....	48
Discusión.....	56
Conclusión.....	60
Bibliografía.....	61
Anexos.....	67

ABREVIATURAS

IL-4:	Interleucina 4
IL-10:	Interleucina 10
IFN- γ	Interferón gamma
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
RT:	Retrotranscripción
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
IL-2:	Interleucina 2
NK:	Células accinas naturales
Células T:	Células derivadas del timo
Células B:	Células derivadas de la médula ósea
LTCD4 ⁺ :	Linfocitos T auxiliares CD4 ⁺
LTCD8 ⁺ :	Linfocitos T citotóxicos CD8 ⁺
IgM:	Inmunoglobulinas M
IgD:	Inmunoglobulina D
IgE:	Inmunoglobulina E
LGL:	Linfocitos granulares grandes
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
IL-13:	Interleucina 13
IL-6:	Interleucina 6
LB:	Linfocitos B
LT:	Linfocitos T
IL-10R:	Receptor de Interleucina 10
IL-4R:	Receptor de Interleucina 4
IL-2R:	Receptor de Interleucina 2
pg:	Pico gramos
μ l:	Microlitros
ml:	Mililitros
rpm:	Revoluciones por minuto
INFs	Interferones
kD:	Kilodalton
TGF- β :	Factor de crecimiento transformador
LAK:	Células "killer" activadas por linfocinas
TNFR:	Receptor de TNF
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
CaCu:	Cáncer Cervicouterino
IFNR	Receptor de interferón
ADN	Acido dexosiribonucleico
A	Grupo control (sin tratamiento)
B	Inoculación de células B16F0
C	Inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos.
D	Inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada liposomas catiónicos.

RESUMEN

El cáncer se distingue por el crecimiento celular descontrolado que progresa hacia la expansión desarrollando metástasis. Existen diferentes tipos de cáncer, entre ellos, el melanoma que consiste en una transformación maligna de los melanocitos, células que dan pigmentación a la piel; este tipo de cáncer es curable si se detecta a tiempo. En los últimos años, se han administrado tratamientos con interferones e interleucinas, cuyo objetivo principal, es aumentar la respuesta inmunológica del paciente, proporcionándole una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad. Con base a lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de las citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α en células de bazo de ratones inoculados con la línea celular B16F0 (melanoma) y tratados con IL-2 encapsulada. Para ello se extrajo el RNA mensajero de células de bazo de ratones tratados con esta citocina, posteriormente se empleó la técnica de RT-PCR, para su amplificación. Los resultados obtenidos muestran que al administrar IL-2 encapsulada en los ratones, se presenta una variación en la expresión de las citocinas. En el caso de IL-10, se observó un aumento muy evidente en su expresión, mientras que la síntesis de IFN- γ no se ve modificada. Sin embargo, IL-2 induce una baja expresión de RNAm para TNF- α . Cabe destacar que no observamos expresión de mensajero para IL-4 en ninguna de las muestras. Estos datos nos permiten brindar información a cerca de la regulación de la síntesis de las citocinas antes mencionadas, para modular la respuesta inmunológica, y así, contribuir en el diseño de nuevas alternativas terapéuticas para el cáncer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer se ha convertido en una de las enfermedades más temida. Aunque no sea la causa más frecuente de muerte, se sabe que es un suceso progresivo y fatal, para el cual no ha sido descubierta aún ninguna cura definitiva. Hay muchos tipos diferentes de cánceres, pero todos comparten una característica común: el crecimiento celular descontrolado que progresa hacia la expansión generando metástasis. Entre estos cánceres se encuentra el melanoma (cáncer de la piel), que consiste en una transformación maligna de los melanocitos, estas son las células que dan pigmentación a la piel. Este tipo de cáncer es curable si se detecta a tiempo. En los últimos años se han administrado tratamientos con diversas citocinas (Interferones e Interleucinas), que tienen como principal objetivo aumentar la respuesta inmunológica del paciente. Para eliminar el crecimiento tumoral proporcionándole una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

Con base a lo antes mencionado el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de las citocinas: Interleucina 4 (IL-4), Interleucina10 (IL-10), Interferón gamma (IFN- γ) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en células de bazo de ratones inoculados con la línea celular B16F0 (melanoma) y tratados con IL-2 encapsulada. Para ello se empleó la técnica de RT-PCR, el análisis de los amplificadores para cada una de las citocinas nos permitieron determinar como la administración de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos puede modificar la síntesis de IL-4, IL-10, TNF- γ y TNF- α y comprobar si existen variaciones en los niveles de estos moduladores biológicos inducidos durante la respuesta inmunológica anti-tumoral, con esta información podremos encontrar las mejores condiciones y vías de administración de IL-2 encapsulada y de esta manera proponer una alternativa terapéutica para los pacientes con melanoma.

MARCO TEÓRICO

CANCER

Una célula mantiene sus características morfológicas, químicas, bioquímicas y fisiológicas debido a la operación de múltiples vías de regulación sutiles y al mismo tiempo restringidas. Cuando los mecanismos de homeostasis se alteran, la célula puede modificar alguna de sus características. Todas ellas están interrelacionadas de manera que la modificación en alguna de ellas repercute en las demás, aunque en grados muy variables. Básicamente esto es el cáncer, la alteración de la homeostasis celular con cambios estables y permanentes hacia la progenie de las células alteradas. Las alteraciones que pueden presentar las células cancerosas incluyen modificaciones en su forma, tamaño, apariencia presentando aberraciones en el número de cromosomas, cambios químicos y bioquímicos, una de cuyas consecuencias es la aparición de antígenos propios de las células cancerosas (Good R. 1990).

Las células cancerosas pueden acumular múltiples mutaciones en genes cruciales, permitiendo su replicación autónoma e invasión. A pesar de todo esto, una mutación en un gen particular es un evento relativamente raro, e incluso después de un daño químico deliberado, la frecuencia de mutación en un gen particular es de 10^{-6} , lo que implica, que solo una célula en un millón esta mutada. La frecuencia de mutación en las células tallo humanas es de aproximadamente 10^{-10} por cada división celular, a pesar de esta probabilidad tan baja, y debido al gran número de divisiones celulares, es muy probable que todos los adultos presenten muchas células mutadas. Afortunadamente, un suceso como el cáncer requiere al menos de mutaciones en cinco genes; c-myc, c-fos, c-ras, c-sys y c-cyb (Valle A. y Weiss B. 2003).

Al ser muchos los factores que pueden inducir el desarrollo del cáncer, es entendible que todos los tipos celulares puedan sufrir, en algún momento de la vida, la transformación neoplásica (Rojas E. 1996). Es por esto que existen alrededor de un centenar de formas clínicas de cáncer las cuales pueden agruparse según el tipo de tejido afectado: Leucemias, Linfomas, Sarcomas, Carcinomas y Adenomas (Tabla1).

TIPOS DE CANCER	TEJIDO QUE AFECTA
LEUCEMIAS	TEJIDO HEMATOPOYETICO EN MEDULA OSEA.
LINFOMAS	GANGLIOS LINFATICOS
SARCOMAS	TEJIDOS DE SOSTEN: TEJIDO CONECTIVO, MÚSCULOS, VASOS SANGUINEOS Y LINFATICOS.
CARCINOMAS	MELANOMA, EPITELIOS MUCOSOS, SISTEMA NERVIOSO, Y VICERAS (HÍGADO, PÁNCREAS, ETC.).
ADENOMAS	GLANDULAS

Tabla 1. Formas clínicas de cáncer y tejido afectado

MELANOMA

La incidencia de melanoma (cáncer de piel) en todo el mundo ha aumentado, afectando principalmente a personas con piel clara y presencia de numerosos nevus. Sin embargo, se desconocen los efectos genéticos y bioquímicos que transforman al melanocito, una célula que raramente prolifera en la piel adulta normal, es una célula capaz de replicarse dando lugar a un tumor muy invasivo y a menudo fatal (Puig L. 1997 y Ulger A. *et al* 2005).

El melanoma afecta principalmente la piel en un 90%, pero también puede localizarse en ojos en el 9% de los casos y con menor frecuencia en mucosas y llega a producir metástasis en cadenas ganglionares y órganos como hígado y pulmón. (Rosas *et al* 2003). Constituye 3% de las neoplasias malignas cutáneas y causa 65% de las muertes por cáncer. En México afecta extremidades inferiores (casi 50%), pie (43%), cabeza (23%), tronco (13%), extremidades superiores (12%) y cuello (2%) y ocupa el tercer lugar entre los cánceres de piel, con 14.1 por ciento. Afecta a todas las razas, pero es más frecuente en caucásicos que en sujetos de raza negra, orientales o hindúes. Afecta a ambos sexos; se registra de los 20 a los 60 años de edad y es excepcional en los niños (Arenas R. 2005).

El melanoma se origina de la transformación maligna de los melanocitos, las células que producen el color de la piel y dan el color oscuro a los lunares. Bajo condiciones normales, los lunares generalmente son benignos, son agrupaciones de células pigmentadas pero a veces un lunar puede convertirse en melanoma. Habitualmente los melanocitos están localizados en la epidermis, en la dermis o en el epitelio mucoso (Jiménez A. 1995 y Ulger A. *et al* 2005).

En las primeras etapas de su desarrollo, el crecimiento del melanoma tiene lugar de un modo superficial, por lo que cualquier lesión cutánea pigmentada que modifique su aspecto debe ser vigilada estrechamente para efectuar una biopsia en profundidad en un corto plazo y de ser necesario la extirpación del tumor en estadios precoces, siendo el modo más seguro de erradicar esta enfermedad (Moreno K. 2004).

Este cáncer se inicia como una pequeña *mancha* hiperpigmentada (que fácilmente se puede confundir con un nevó), crece de manera horizontal dentro de la epidermis inicialmente y en algún momento dicho crecimiento pasa a ser vertical, de manera tal que se forma una *papula*, la que al continuar su crecimiento constituye un *nódulo* y posteriormente un *tumor*. (Figura 1), (Magaña M. *et al*. 2003).

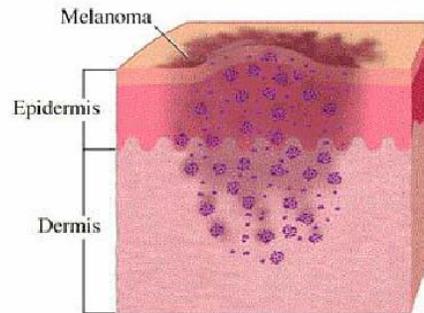


Figura 1. Ubicación del melanoma en diferentes capas de la piel. (Tomado de la página: www.cancer.org)

CLASIFICACION DEL MELANOMA

Tradicionalmente se ha usado la clasificación anatomoclínica del melanoma propuesta por Clark (Wallace Clark, 1924-1998, Estados Unidos) en cuatro tipos: Melanoma lentigo maligno, Melanoma de extensión superficial, Melanoma maligno “nodular” y Melanoma acral lentiginoso (Magaña M. *et al.* 2003).

Melanoma lentigo maligno. Supone un 5-10% del total de casos de melanoma, aparece casi siempre en individuos de más de 60 años, en la cara y sobre una piel con importante daño actínico. Tiene una fase inicial con crecimiento radial superficial muy prolongada (hasta 10 años o más), que ha recibido los nombres de melanosis de Dubreuilh y peca melanica de Hutchinson (Ferrandiz F. 1996).

Suele localizarse en zonas expuestas a la luz solar, principalmente en la cara (mejillas) y cuello; puede afectar mucosas por contigüidad. Reinicia como una lesión plana, de color café oscuro, que crece con lentitud hasta 7 cm en promedio, y muestra elevaciones oscuras, con hiperqueratosis y ulceración. Algunos autores

lo llaman lentigo maligno cuando está confinado a epidermis (*in situ*) y melanoma lentigo maligno cuando invade dermis (Arenas R. 2005).

Melanoma de extensión superficial. Es el tipo clínico patológico de melanoma más frecuente (70% de los casos). Su presentación suele ser más precoz, con una incidencia máxima entre los 40 y los 60 años. Las localizaciones más habituales son el tronco y las piernas; en el tronco es más frecuente en los hombres y en las piernas en las mujeres.

Tiene una fase de crecimiento radial superficial, que puede durar meses o incluso años, pero es más corta que en el melanoma lentigo maligno. Aunque tiene similitud con la de este tipo de melanoma, en el de extensión superficial las lesiones iniciales suelen ser algo sobreelevadas y pueden mostrar hiperqueratosis y colores variados en su superficie. Los fenómenos de regresión son más intensos, con formación frecuente de lesiones arciformes, a veces concéntricas y áreas blanquecinas, eritematosas o violáceas. En la fase de invasión en profundidad se producen nódulos, ulceración o hemorragia. La metástasis se originan por diseminación linfática y hemática; las primeras suelen ser más precoces (Ferrandiz F. 1996).

Melanoma maligno “nodular”. Es la forma más agresiva; representa 10 a 20% de los melanomas; sobreviene entre el quinto y sexto decenios de la vida; predomina en varones; se observa como una placa o tumoración semiesférica de aspecto “nodular”, de color café a azul oscuro, de superficie lisa, ulcerada o vegetante, que asienta con frecuencia en una piel normal (Arenas R. 2005).

La localización predominante es en el tronco. En la raza blanca un 10-15% de los melanomas son de este tipo. Es un tumor de muy alta agresividad, que origina metástasis linfáticas y hemáticas (Ferrandiz F. 1996).

Melanoma acral lentiginoso. Se observa más a menudo en personas de raza negra y en mestizos; es la forma más frecuente en México; afecta palmas,

plantas o falanges distales; puede ser periungueal o subungueal, y acompañarse de paroniquia y distrofia ungueal; produce manchas irregulares de crecimiento radial, y en etapas avanzadas genera formas exofíticas (Arenas R. 2005).

La transformación a la fase invasora a menudo pasa inadvertida por las peculiares localizaciones del tumor y la mayor parte de las veces se detecta por ulceración y hemorragia, debido al diagnóstico tardío por parte de médicos sin experiencia en este campo (Ferrandiz F. 1996).

CLASIFICACIÓN DEL MELANOMA EN BASE A LA INVASIÓN

Existe otra clasificación de Clark que se usa para evaluar el nivel de invasión: nivel I, intraepidérmico; nivel II, hasta dermis papilar; nivel III dermis papilar completa; nivel IV hasta dermis reticular, y nivel V hasta tejido celular subcutáneo.

Según el espesor de la lesión, medida con un micrómetro adaptado al microscopio, Breslow los divide en cinco grupos: menores de 0.76 mm, de 0.76 a 1.49 mm, de 1.5 a 2.49 mm, de 2.50 a 3.99 mm y mayores de 4 mm (Figura 2), Esta clarificación se ha relacionado con supervivencia a cinco años (Orkin M. *et al* 1994).

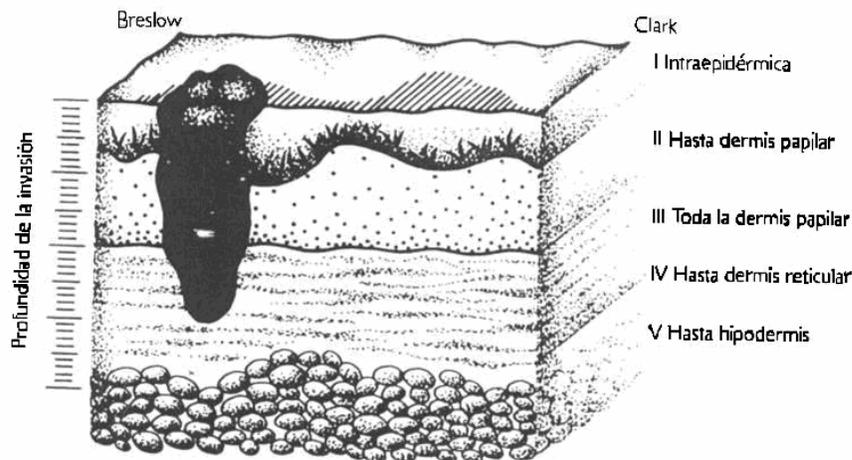


Figura 2. Clasificación de los melanomas según Breslow y Clark. (Tomado de Arenas R. 2005)

TRATAMIENTO

Cirugía: El tratamiento electivo del melanoma es la extirpación quirúrgica y las posibilidades del paciente dependen, en gran medida, de que se realice en el estudio más precoz posible. El margen de recesión de la lesión es de 1-3 cm, la conveniencia de efectuar una extirpación profiláctica de los ganglios linfáticos regionales y la asociación de diversas pautas de quimioterapia e inmunoterapia ha sido objeto de considerables debates, sin haber llegado a demostrarse un claro aumento de la supervivencia con ninguna de ellas (Ferrandiz F. 1996).

Tratamientos sistémicos: Quimioterapia e inmunoterapia (interferón alfa y gamma a altas dosis e IL-2), son las únicas citocinas que han demostrado eficacia terapéutica en el tratamiento del melanoma (Pinar S. *et al* 2004).

Pese al desarrollo de modernas técnicas de cirugía y trasplantes, nuevas y efectivas drogas citotóxicas, que han permitido tratar con éxito algunas patologías neoplásicas, frecuentemente algunas células cancerosas sobreviven a estas terapias y se diseminan en el organismo, haciendo necesario el desarrollo de nuevos tratamientos complementarios a los actuales. Uno de estos métodos es la manipulación del sistema inmunológico para combatir tumores, lo que se denomina inmunoterapia del cáncer. Se ha producido un creciente interés por utilizar al sistema inmunológico como herramienta en el tratamiento del cáncer. Citocinas como interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ) e interferón alfa (IFN- α) son comúnmente utilizadas como terapias adyuvantes en algunas neoplasias (López M. *et al* 2004).

Aunque muchos de estos agentes inmunoterapéuticos han mostrado su eficacia, todavía existen muchos aspectos por definir para lograr una estrategia terapéutica verdaderamente efectiva e inocua (Torrilla A. y Noris G. 2004).

SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmunológico es importante en la medida que sus alteraciones funcionales son causa de numerosas enfermedades, en su estudio se relacionan tanto los aspectos anatómicos, como son los órganos y tejidos que lo constituyen, así como el estudio de una serie de células y moléculas liberadas en la respuesta del organismo ante la entrada de un antígeno (Báscones A. y González M. 2003).

Este sistema ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo. Para eliminar a un antígeno que haya establecido una infección (atravesando las barreras epiteliales de los vertebrados) lo primero que debe de hacer el sistema inmunológico es reconocerlo como tal y a continuación desarrollar una respuesta inmunológica adecuada para destruirlo (Regueiro G. *et al.*, 2002).

La respuesta inmunológica depende de cuatro tipos celulares principales: Macrófagos, Células NK, Linfocitos derivados del Timo (linfocitos T) y Linfocitos B. Estas interactúan entre sí, de manera directa ó por acción de interleucinas (Suites P. *et al.* 1994 y Ju. S. *et al* 2007).

Hay dos niveles de defensa contra invasión por agentes externos: inmunidad innata e inmunidad adaptativa (conocida también como inmunidad adquirida) (Suites P. *et al.* 1994 y Ju. S. *et al* 2007).

INMUNIDAD INNATA

Llamada en ocasiones inmunidad natural, se presenta desde el nacimiento y se debe a elementos inespecíficos. Las superficies corporales, en especial la piel, forman la primera línea de defensa contra la penetración de microorganismos;

cuando esto ocurre, los microorganismos invasores se enfrentan, al principio, con otros elementos del sistema inmunitario innato (Suites P. *et al.* 1994).

La inmunidad innata se basa en la activación tanto de una serie de moléculas preformadas, proteínas del complemento, así como de células, (fagocitos monolitos, macrófagos y neutrófilos) y mastocitos, que tienen receptores innatos para múltiples patógenos. Algunos mecanismos innatos no actúan inmediatamente, si no que inducen una respuesta a la infección, como son las células asesinas naturales (NK, del inglés Natural Killer Cells), ó ciertas moléculas como los interferones (especialistas en defendernos de los virus), y otras citocinas y mediadores que producen inflamación (Regueiro G. *et al.*, 2002).

INMUNIDAD ADAPTATIVA

En la respuesta inmune adaptativa ó adquirida, el agente extraño ó inmunógeno desencadena una serie de sucesos que llevan a la activación de linfocitos, así como a la producción de anticuerpos y linfocitos efectores altamente específicos para el inmunógeno (Suites P. *et al.* 1994 y Ross. M, *et al.* 2005).

Las características que definen la inmunidad adaptativa son una especificidad precisa por distintas moléculas y una capacidad de recordar y responder con más intensidad a la exposición repetida a un mismo antígeno. El sistema inmunitario adaptativo es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de sustancias microbianas y no microbianas.

Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos (Abbas *et al* 2004).

SISTEMA LINFOIDE

Las células que forman parte del sistema inmunológico se organizan en órganos y tejidos, estas estructuras reciben el nombre de sistema linfóide. Los órganos del sistema linfóide son desde el punto de vista anatómico de dos tipos: a) órganos con capsula bien definida (como el caso del bazo, el timo, ganglios linfáticos y médula ósea) y b) acumulaciones difusas de tejido linfóide (se trata de tejido linfóide no encapsulado que se asocia a las mucosas). Desde un punto de vista funcional, los órganos y tejidos linfoides se dividen en primarios ó centrales (médula ósea y timo) y secundario ó periféricos (bazo, ganglios linfáticos) (Regueiro G. *et al.*, 2002).

BAZO

El bazo tiene el tamaño aproximado de un puño cerrado y es el órgano linfático de mayor tamaño (Figura 3). Está situado en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad abdominal y tiene una irrigación abundante (Ross. M., *et al.* 2005).

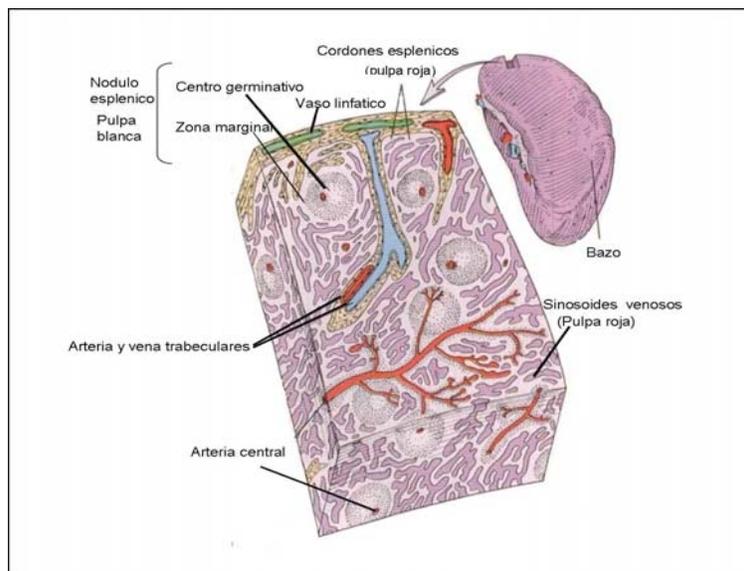


Figura 3. Estructura interna del Bazo. (Tomado de Ross M. 2005)

Cuando se produce una infección que no puede ser eliminada por los mecanismos innatos es necesaria una respuesta adaptativa que se genera contra un antígeno el cual es transportado al bazo por vía sanguínea ó a los ganglios por vía linfática y es allí donde es reconocido por linfocitos que en circulación. La organización de dichos órganos permite las interacciones necesarias entre las distintas células del sistema inmunológico para que se pueda generar una respuesta adaptativa.

En los órganos linfoides secundarios, se produce la activación y proliferación de los linfocitos (Regueiro *et al* 2002).

El bazo es un órgano linfoide secundario y efectúa algunas funciones no inmunitarias, como filtración de la sangre y conversión de hemoglobina a bilirrubina. El bazo tiene dos tipos de tejidos principales: pulpa blanca y pulpa roja, que se sostiene por una malla reticular densa de poro fino. La pulpa blanca contiene folículos linfoides centrales formados, en su mayor parte, con linfocitos B, rodeados por regiones de linfocitos T dependientes. La pulpa roja, eritroide, sirve como filtro para eritrocitos dañados o viejos, y como sitio de reserva para hematopoyesis extramedular (Suites P. *et al.* 1994).

Las funciones principales del bazo comprenden: Activación y proliferación de los linfocitos B y T, producción de anticuerpos contra antígenos presentes en la sangre circulante, eliminación de antígenos macromoleculares de la sangre, diferenciación de los plasmocitos, así como la secreción de anticuerpos, que ocurren en la pulpa blanca (Ross. M., *et al.* 2005).

En el bazo se encuentran todos los tipos celulares necesarios para generar respuestas inmunes celulares y humorales (linfocitos T, linfocitos B, células NK, macrófagos) además el entramado hístico necesario para su correcta interacción mutua (Regueiro G. *et al.*, 2002).

LINFOCITOS

Las células responsables de la especificidad inmunitaria pertenecen a una clase de glóbulos blancos conocidos como linfocitos. Se encuentran en grandes cantidades en la sangre, en la linfa (el líquido incoloro de los vasos linfáticos que conectan los nódulos linfáticos del cuerpo) y en órganos linfoides especializados como el timo, los nódulos linfáticos, el bazo y el apéndice (Alberts B. *et al* 1994).

Aunque morfológicamente todos los linfocitos son distinguibles entre sí, desde el punto de vista funcional se reconocen dos tipos básicos de linfocitos, los linfocitos T y los linfocitos B. En los humanos, dentro de los linfocitos T se incluyen dos subtipos: los linfocitos CD4⁺ y los linfocitos CD8⁺. El CD4⁺ correspondería a los linfocitos T cooperadores ó Th (del inglés helper) y los CD8⁺ ó linfocitos T citotóxicos ó Tc, de los linfocitos B no se han descrito subtipos (Rojas E. 1996 y Ross. M., *et al.* 2005).

LINFOCITOS B

Los linfocitos B se diferencian en órganos equivalentes a la médula ósea ó el tejido linfático asociado con el intestino. Estos linfocitos tienen una vida de duración variable y participan en la síntesis y secreción de los diversos anticuerpos circulantes, también llamados inmunoglobulinas, que son las inmunoproteínas asociadas con la inmunidad humoral. La cual está mediada por anticuerpos que actúan en forma directa sobre el agente invasor. Estas células constituyen entre el 20% y el 30% de los linfocitos circulantes, los linfocitos B expresan en su superficie las inmunoglobulinas M (IgM) y la inmunoglobulina D (IgD), así como las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (Ross M.H. *et al* 2005). Las inmunoglobulinas se ocupan de fijar al antígeno, activar a la célula y desencadenar la secreción de inmunoglobulina soluble al suero y tejidos (Suites D.. *et al.* 1991).

Para la puesta en marcha de una respuesta humoral no basta, en la mayoría de los casos, la sola participación de los linfocitos B, si no que los linfocitos T juegan un papel determinante. Los linfocitos T que ayudan a los linfocitos B en su activación se denominan células T cooperadoras y proporcionan ayuda una vez reconocido el antígeno que es presentado por los propios linfocitos B mediante moléculas de membrana uniéndose a ligandos de los linfocitos B ó mediante la liberación al medio de factores solubles (citocinas), que se unen a receptores de los linfocitos B (Regueiro G. *et al.*, 2002).

LINFOCITOS T

Los linfocitos T son un linaje especial de linfocitos que surge de la maduración de células madre en el timo; de aquí su nombre. Los linfocitos T inician la respuesta inmunitaria, intervienen en reacciones efectoras específicas de antígeno y regulan la actividad de otros leucocitos por medio de la secreción de factores solubles (Suites D. *et al.* 1991).

Tienen una vida larga e intervienen en la inmunidad mediada por células y representan entre el 60% y el 80% de los linfocitos circulantes. Los linfocitos T expresan los marcadores CD2, CD3 y CD7; sin embargo, se sub clasifican según tengan ó no otros marcadores superficiales importantes: CD4 y CD8 (Ross M. *et al* 2005).

Los linfocitos CD4 o auxiliares (Th) se dividen en Th1 y Th2 según el tipo de citocinas que producen, los linfocitos Th1 secretan interferón gamma (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y en la hipersensibilidad retardada. Por su parte, los linfocitos Th2 producen interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13), cooperando con la respuesta

inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B y del cambio de isotipo de los anticuerpos para la producción de inmunoglobulina E (IgE) e inmunoglobulinas g IgG1 (en ratón) o IgG4 (en humanos) promoviendo la diferenciación de eosinófilos y mastocitos (López M. 2003).

Los linfocitos T que expresan el marcador CD8 reciben el nombre de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Ross M.H. et al 2005). Ejercen su función efectora mediante la secreción de IL-2, interleucina 16 (IL-16), IFN- γ y TNF- α fundamentalmente (Aguzzi A. et al 2005).

El papel biológico de los linfocitos T en el conjunto de la respuesta inmune específica es central ya que en este tipo celular reside el control de los linfocitos B y de sus productos, las inmunoglobulinas. Los linfocitos T son células centrales en la función y regulación del sistema inmunológico. Además de tener funciones directas como la citotoxicidad ó citolisis, regulan el funcionamiento de su propio linaje y de otros linajes (linfocitos B, monocitos, etc.) mediante contactos celulares ó mediadores solubles denominados citocinas. (Regueiro G. et al., 2002).

CÉLULAS NK

Las células NK (*Natural Killer*) son un subconjunto de leucocitos que surgen de un precursor en la médula ósea. Estas células se caracterizan por su propiedad de lisar células tumorales (referida como actividad NK) sin que exista presentación de antígeno por medio de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, sin afectar las células del huésped (Stites P. et al. 1994 y Ross. M, et al. 2005).

Estas células representan el 5% de los linfocitos, se distinguen morfológicamente por ser linfocitos granulares grandes (LGL) y tienen la propiedad de destruir células infectadas por virus, células alogénicas. Las NK son capaces

de mediar su acción, sin activación previa ni restricción aparente del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC), de forma diferente a como lo hacen los linfocitos T y B; por esta razón el nombre de asesina natural (Arango P. *et al* 1999).

Hoy en día sabemos que estas células no solamente son capaces de matar tumores si no que juegan un importante papel en la defensa frente a patógenos, especialmente virus e incluso en el rechazo de órganos trasplantados. Además de su función citotóxica las células NK tienen capacidad para producir diversas citocinas y por lo tanto también tienen una función reguladora (Regueiro G. *et al.*, 2002).

CITOCINAS

En los últimos 25 años se ha descubierto, caracterizado y purificado un grupo importante de mediadores peptídicos. Estos mediadores, denominados citocinas, funcionan como reguladores en alta y baja respuestas inmunitarias, inflamatorias y reparadoras a la lesión. Las citocinas producidas por linfocitos se designan linfocinas, en tanto que los péptidos sintetizados por monocitos o macrófagos se conocen como monocinas (Stites P. *et al* 1994).

El término citocina se aplica a un gran número de moléculas diferentes, cuya función es transmitir señales entre células en el curso de una respuesta inmunitaria. Todas las citocinas son proteínas y algunas llevan adosados azúcares (glucoproteínas). Suelen actuar de forma autocrina (sobre la misma célula productora), ó paracrina (sobre células cercanas) ó endocrina (Figura 4).

Las citocinas se unen a receptores específicos de la membrana celular, desencadenando una cascada de respuestas implicadas en la inducción, ampliación ó inhibición de una serie de genes regulados por citocinas a nivel nuclear (Roitt I. *et al* 2000).

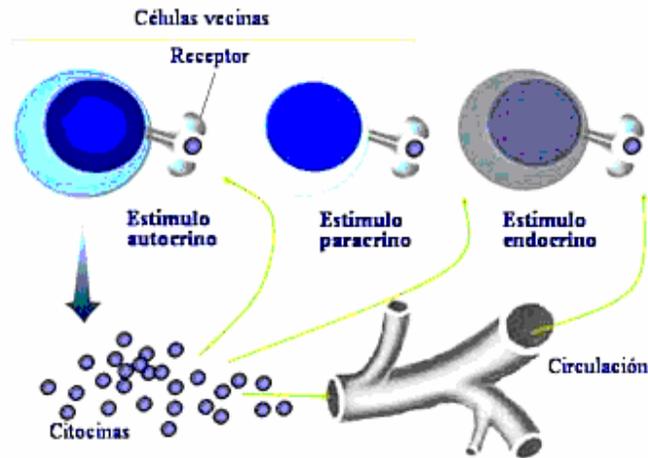


Figura 4. Acciones de las citocinas. (Tomado de Regueiro G.2002)

En general, hay dos grupos de citocinas que pueden ser distinguibles con base en su participación en los procesos de infección y/o inflamación. Las citocinas que están directa o indirectamente involucradas en los procesos inflamatorios reciben el nombre de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, el IFN- γ y el TNF- α) y promueven la respuesta inmune mediada por células. Las citocinas que suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias son las citocinas antiinflamatorias, por ejemplo, IL-4, IL-10 e IL-13, que son potentes mediadores de los linfocitos B. De esta manera, el perfil de expresión de citocinas presentes en una enfermedad determinará el tipo de respuesta inmune despertada (Bermúdez M. *et al* 2005).

La producción de algunas citocinas esta controlada por el procesamiento del ARN y por mecanismos postranscripcionales, como la liberación proteolítica de un producto activo a partir de un precursor inactivo. Una vez sintetizadas, las citocinas se secretan rápidamente, lo que origina una liberación brusca cuando es necesario (Abbas *et al* 2004).

Durante las últimas décadas se han administrado productos naturales y sintéticos con el fin de aumentar la respuesta inmune normal. Los interferones, las interleucinas y los factores de crecimiento hematopoyético, han mostrado beneficios clínicos sustanciales en infecciones virales crónicas y cánceres como sarcomas, linfosarcomas y melanoma. El control del crecimiento tumoral, indudablemente debe involucrar un amplio espectro de funciones efectoras de naturaleza inmunológica ó no inmunológica, sin embargo, aun no esta claramente establecido, cuales de estas funciones efectoras son controladas por citocinas. Varios grupos de investigadores han estudiado el efecto de las citocinas en el desarrollo de la inmunidad anti-tumoral, para detectar el potencial terapéutico de esas moléculas (Ayala A. *et al* 2000).

Estas proteínas tienen funciones pleiotrópicas. Según compartan ó no los mismos receptores, vías de señalización y algunas actividades biológicas, se han clasificado en diferentes familias: Interleucinas, Interferones, Factores Necrosantes de Tumores, etc. (Regueiro G. *et al.*, 2002).

INTERLEUCINAS (IL). Las interleucinas son un extenso grupo de citocinas que son producidas fundamentalmente por linfocitos T, aunque los fagocitos mononucleares y algunas células tisulares también producen algunas de ellas, la función de la mayoría es inducir la multiplicación y diferenciación de otras células (Roitt I. *et al* 2000).

Interleucina 4 (IL-4): Se le conoció inicialmente como factor 1 de crecimiento de Infocitos B, por su acción estimulante de la proliferación de este grupo celular (Molina V. *et al* 2000).

La IL-4 es una glucoproteína de 20 kD, producida por los linfocitos CD4⁺ (Th2) pero también es sintetizada por los timocitos fetales y macrófagos (Figura 5). Promueve el crecimiento de los linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas como la IgE. Inhibe el estímulo que la IL-2 ejerce sobre estos linfocitos. Además

contribuye a la hematopoyesis de otras células (Margni A. 1996, Serra B. 1990 y Ross. M., *et al.* 2005).

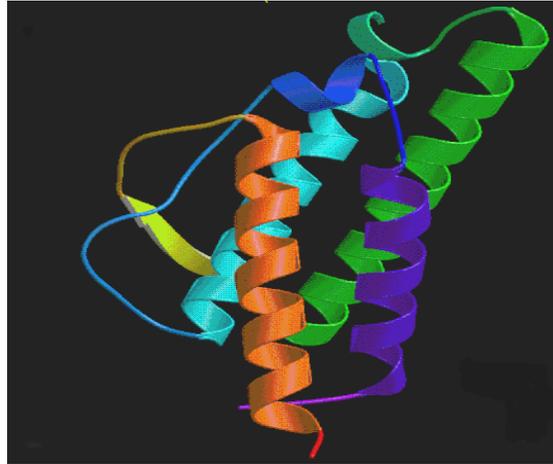


Figura 5. Estructura tridimensional de la IL-4. (Tomado de la página: cmbi.bjmu.edu.cn/.../cyt_strucs/index.html)

La IL-4 posee múltiples funciones inmunorreguladoras, actúa sobre los linfocitos T, linfocitos B, monocitos, neutrófilos, fibroblastos, células epiteliales, endoteliales y progenitores hematopoyéticos (Hernández S. 2004). Ejerce acciones de retroalimentación negativa sobre los linfocitos Th1, como consecuencia de estos hechos la IL-4 permite un desplazamiento hacia la respuesta inmune humoral en detrimento de la actividad NK y de la inmunidad mediada por células (Margni A. 1996).

Recientes investigaciones sobre células tumorales han demostrado que la IL-4 es capaz de inhibir la proliferación de algunas líneas de células de tumores de pulmón humano tanto *in vivo* como *in vitro*; y en linfocitos B de leucemia linfocítica crónica, inhibe la apoptosis sin estimular la proliferación celular y reduciendo los niveles de proteína bcl2 (Soto I. *et al.* 1999).

En estudios previos se ha demostrado que al inocular células de melanoma (B16F10) en ratones de la cepa C57BL se produjo un alto grado de metástasis

pulmonar, y al administrarle IL-4 se observó una regresión del tumor (Kobayashi M.1998).

Un grupo de colaboradores investigo los mecanismos terapéuticos implicados en el rechazo de los tumores inoculados con la línea celular de melanoma B16 que produjeron metástasis, gracias a la interacción de IL- 4 e IL-5 con las células de melanoma (Dobrzansk J. *et al* 2001).

Otro grupo de investigadores realizo experimentos con un glucolípido derivado de una esponja marina (GalCer), el cual se utilizo para estimular selectivamente a las células V14NKT para producir grandes cantidades de IFN- γ y de IL-4, y así poder estimular su actividad citotóxica y antitumoral (Hayakawa Y. *et al* 2001).

Actualmente la IL-4 no tiene un uso clínico potencial en humanos, pero por sus efectos antitumorales *in vitro* y en modelos de ratones, la IL-4 puede potencialmente inhibir el crecimiento de tumores y linfomas de células B (Soto I. *et al.* 1999).

Interleucina 10 (IL-10): Fue inicialmente denominada factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF), fue descubierta como un producto de los linfocitos Th2 capaz de inhibir la producción de citocinas del tipo Th1. (Margni A. 1996) La IL-10 es una citocina producida por los linfocitos B y T, los monocitos, los timocitos fetales activados, los macrófagos y los queratinocitos con efectos pleiotropicos, algunos de los cuales están encaminados a suprimir la actividad monocitaria (citocina inflamatoria), (Jiménez A. 1995).

La IL-10 se produce como una proteína inmadura de 178 aminoácidos que después de proteolizarse genera la proteína madura de 160 aminoácidos. Existen tres formas de IL-10 identificadas: de rata, de ratón y de humano (Figura 6). Todas poseen una homología elevada de aproximadamente 73% (Soto I.. 1999). Ejerce

funciones biológicas como la limitación de las respuestas inflamatorias, la regulación, diferenciación y proliferación de varias células inmunes tales como células T, células B, células NK y de los granulocitos (Asadullah K. 2003).

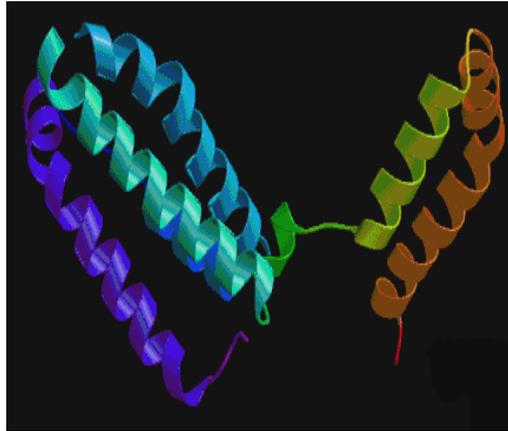


Figura 6. Estructura tridimensional de la IL-10. (Tomado de la página: cmbi.bjmu.edu.cn/.../cyt_strucs/index.html)

También actúa sobre las células presentadoras de antígeno inhibiendo su función y es un regulador negativo de la respuesta inmune celular (Bascones A. y González M. 2003).

El receptor para IL-10 (IL-10R) es una glucoproteína de 110 kD; en el ratón esta constituido por 561 aminoácidos (aa) y en el hombre por 557 aa, existiendo entre ellos un 60% de homología. El IL-10R esta estructuralmente relacionado con el receptor de IFN, une a la IL-10 con alta afinidad (Margni A. 1996).

En estudios recientes se ha demostrado que la IL-10 es capaz de modular las respuestas humorales inhibiendo la producción de citocinas implicadas en la respuesta inmunitaria mediada por células (Dees C. *et al* 2002).

Por otro lado la IL-10 además de tener actividades reguladoras positivas múltiples se ha presumido que induce el crecimiento de los tumores producidos

por la línea celular de melanoma (B16F0) en modelos con ratones, sin embargo en los resultados obtenidos *en vivo* son una polémica (García H. *et al* 2002)

Romero y su grupo de trabajo han reportado que existe un incremento en la concentración en suero de la interleucina-10 en pacientes con tumores sólidos, lo que trae como consecuencia la evolución de la enfermedad (Romero A. *et al* 2001).

Para investigar la relevancia de la IL-10 en los pacientes con melanoma maligno, *in vivo*, Dummer y Cols estudiaron los niveles sericos de IL-10 en 104 pacientes no tratados, afectos de melanoma maligno en diferentes estadios. Se utilizaron como controles 20 sujetos sanos y 22 pacientes efectos de procesos inflamatorios diversos. Los niveles sericos fueron determinados con ELISA. Solo 1 de los 31 pacientes en estadio I (3%) y uno de los 16 pacientes en estadio II (6%) mostraron niveles de IL-10 detectables. Seis de los 17 pacientes con metástasis a ganglios linfáticos (estadio III 35%) y 29 pacientes de los 40 con enfermedad metastasica (estadio IV, 73%), revelaban niveles de IL-10 entre 15-480 pg/ml. Ninguno de los pacientes sanos y solo uno de los pacientes control mostró niveles detectables de IL-10. Esta citocina en los pacientes con melanoma maligno contribuye a la depresión de la regulación inmunitaria antitumoral *en vivo* (Jiménez A. 1995).

Dadas las funciones descritas anteriormente para la IL-10 en linfocitos T auxiliares, macrófagos, linfocitos B y neutrófilos, resulta evidente que este factor puede tener importantes efectos reguladores y correguladores en el sistema inmune y que participa en procesos antiinflamatorios y antivirales (Soto I. *et al.* 1999).

INTERFERONES (IFN). Fueron descubiertos por Isaac y Lindenmann en 1957 en Londres. Los INFs son tipos de citocinas que se encuentran

normalmente en el cuerpo. Fueron las primeras citocinas producidas en el laboratorio para el uso como modificadores de respuesta biológica. Son moléculas proteicas reguladoras del crecimiento celular. Basados en sus propiedades antigénicas específicas, los INFs pueden ser divididos en alfa, beta y gamma. En la actualidad se conocen más de 20 subtipos de INFs. Todos los INFs poseen actividad inmunorreguladora, antiproliferativa y antiviral (Moreno K. *et al* 2004).

Todos los IFN tienen acción inmunomoduladora, inducen en la superficie de la célula tumoral la expresión de antígenos asociados al tumor incluidos en el sistema principal de histocompatibilidad (HLA) de tipo I y únicamente el IFN- γ en el tipo II, incrementando la actividad citotóxica de las células asesinas y la capacidad fagocítica de los macrófagos. También, presentan acción antiproliferativa (inhibición del crecimiento) sobre células normales y tumorales, con efecto antineoplásico «in vitro» e «in vivo» (Sotoca M. 1999).

Interferón gamma (IFN- γ). El IFN- γ o IFN inmune, es una glucoproteína multifuncional caracterizada por sus propiedades antivirales. Es producido por linfocitos Th1 (CD4⁺), T CD8⁺ y en menor grado por las células NK. El IFN- γ es una glucoproteína constituida por 143 aa, que presenta diferentes grados de glucosilación, es una proteína homo dímera de 21-24 kD. Induce la diferenciación de LB y LT de modo tal que se promueve la maduración de los linfocitos T citotóxicos y la secreción de Igs. También activa las células NK, favoreciendo su acción citotóxica (Moreno K. *et al* 2004).

La totalidad de las acciones del IFN γ conducen a promover las acciones de los linfocitos Th1 y los macrófagos, suprimiendo la acción de linfocitos Th2 y de los neutrofilos. El receptor de IFN- γ es una glucoproteína de 90 kD, constituido por una cadena polipeptídica, se expresa en todas las células a excepción de los eritrocitos (Margni A. 1996).

En los carcinomas cutáneos, el melanoma y otras afecciones pigmentadas, cada vez más se preconiza el empleo de IFN- γ con resultados muy alentadores, recientemente se plantea su uso en dermatosis crónica como dermatitis atópica y epidermodisplasia entre otras como una opción de tratamiento con beneficios para el paciente (Figura 7), (Moreno K. *et al* 2004).



Figura 7. Estructura Tridimensional del IFN- γ . (Tomado de la pagina:
cmbi.bjmu.edu.cn/.../cyt_strucs/index.html)

OTRAS CITOCINAS. Entre estas se encuentran los factores de necrosis tumoral, TNF α y TNF β (del inglés *tumor necrosis factor*), y el factor de crecimiento transformador (TGF β), ejercen diversos efectos, son especialmente importantes en las reacciones inflamatorias y citotóxicas (Roitt I. *et al* 2000).

Los factores de necrosis tumoral son proteínas generalmente referidas como citocinas inflamatorias. El TNF fue originalmente identificado como un factor responsable de la necrosis tumoral presente en el suero de animales tratados con LPS, acción de la cual deriva su nombre (Margni A. 1996).

Los TNF son factores altamente pleiotropicos, producidos principalmente por macrófagos activados, células NK, linfocitos LAK (linfocitos activados para matar) y células endoteliales. El TNF producido por los LTh1 (Ossa E. 1990).

Factor de necrosis tumoral (TNF α). Es una citocina producida principalmente por monocitos, linfocitos y por el músculo (Recasens M. *et al* 2004). Las principales acciones biológicas son las mismas que las de TNF- β ya que comparten los receptores celulares. Ejercen un efecto local parácrino y autocrino que conducen a un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión, lo que promueve la adherencia de neutrofilos, monocitos y linfocitos a las células endoteliales (Figura 8). Estimula a los fagocitos mononucleares a producir IL-1, IL-6, quimiocinas y el propio TNF. Aumenta la expresión de moléculas del MHC de clase I favoreciendo así la citotoxicidad mediada por células (Margni A. 1996).



Figura 8. Estructura Tridimensional del TNF α . (Tomado de la página: cmbi.bjmu.edu.cn/.../cyt_structs/index.html)

El TNF- α señaliza a través de dos receptores de membrana bien conocidos (TNFR): TNFR1 (p60) y TNFR2 (p80). Las fracciones solubles de estos receptores sTNFR1 y sTNFR2, resultan de la proteólisis de la porción extracelular del

receptor cuando el TNF alfa se une a él. La cuantificación de estas fracciones solubles es un indicador sensible y reproducible en un mismo individuo de la activación del sistema TNF- α (Recasens M. *et al* 2004).

El TNF- α ha sido utilizado como una herramienta para combatir diferentes tipos de canceres obteniendo excelentes resultados, (Lee H. *et al* 2006).

Por otro, lado la combinación de aumento de temperatura, aumento de proteínas de fase aguda, leucopenia y activación del sistema de coagulación han sido encontrados como efectos adversos en pacientes con cáncer que recibían TNF como agente terapéutico (Margni A. 1996).

En la medicina clínica, las citocinas son importantes como agentes terapéuticos y como dianas de antagonistas específico en numerosas enfermedades inmunitarias e inflamatorias. A menudo se utilizan cada vez más en estudios con animales para estimular o inhibir la inflamación, la inmunidad y la hematopoyesis (Abbas *et al* 2004).

INTERLEUCINA 2 (IL-2).ENCAPSULADA COMO TRATAMIENTO PARA EL CANCER

La interleucina 2 (IL-2) es una proteína descubierta en 1976 en los laboratorios del National Cancer Institute. Su gen fue clonado en 1984, lo que permitió obtener grandes cantidades de IL-2 recombinante. A partir de entonces se han desarrollado múltiples ensayos clínicos que han demostrado el efecto antitumoral de la IL-2 (González B y Grañena A. 1996).

La interleucina 2 (IL-2) es un péptido con PM de 15 400 con 133 aminoácidos y un puente disulfuro interno esencial (Stites P. *et al*.1994). Es producida por los Linfocitos Th1 (CD4+) y en menor cantidad por los linfocitos CD8+, células NK, macrófagos y células LGL, del ingles "large granulocytes

lymphocytes". (Figura 9). La IL-2 murina presenta un 63% de homología en la secuencia de aminoácidos con la IL-2 humana, siendo ambas activas sobre líneas celulares murinas (Margni A. 1996).

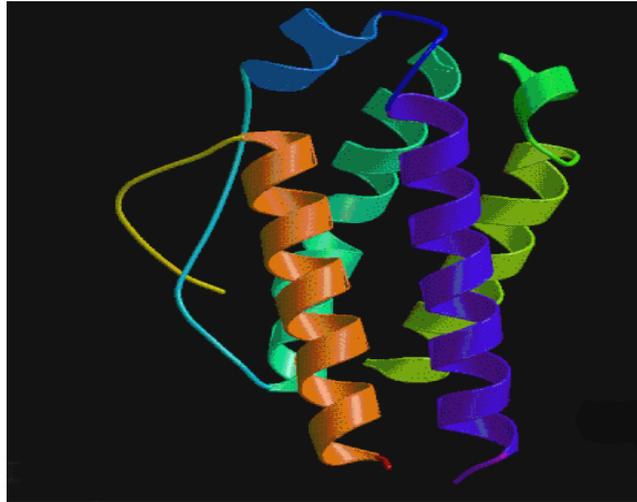


Figura 9. Estructura tridimensional de la IL-2. (Tomado de la pagina: cmbi.bjmu.edu.cn/.../cyt_structs/index.html)

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA IL-2

La interleucina 2 (IL-2) es un poderoso factor de crecimiento para una variedad de células y juega un papel clave en la diferenciación y desarrollo de linfocitos T y la activación de células NK, además de ser un potente inmunomodulador (Loza R. *et al* 2003).

Fue aislada del medio condicionado de células linfoides con una remarcada hidrofobicidad, tiene un papel primordial en la clonación de linfocitos T antígeno específicos, presentando actividad sobre otras células del sistema inmune como timocitos inmaduros, macrófagos, linfocitos B, células NK y LAK. La IL-2, más que

otra linfocina secretada por los linfocitos T, es un factor que juega un papel primordial en la iniciación y potenciación de la respuesta inmune, proporcionando la señal necesaria para la proliferación de células T y B (Rangel C. *et al* 1999).

Los linfocitos T activados por IL-2 producen otras linfocinas como IFN- γ ; linfotóxina; factores de multiplicación y diferenciación de linfocitos B como IL-4, IL-6 y BCDF; factores de proliferación hematopoyética como IL-3, IL-5, IL-10 y GM-CSF y TGB β . Además, los linfocitos T activadas por IL-2 muestran un espectro amplio de citotoxicidad (Daniel P. Stites.1994).

RECEPTOR DE IL-2 (IL-2R)

El receptor para IL-2 esta constituido por tres subunidades α , β y γ . (Ellery M y Nicholls J. 2002), las cuales se asocian en la superficie celular por enlaces no covalentes para formar un complejo funcional del receptor de alta afinidad para IL-2. El complejo formado por la asociación de las tres cadenas tiene una constante de disociación de $K_d= 10^{-11}M$. Por su afinidad por la IL-2 las cadenas dan origen a tres tipos de receptor: el de baja afinidad, (compuesto por la cadena α o p55), el de afinidad intermedia (constituido por la cadena β o p75) y el receptor de alta afinidad (compuesto por la interacción de las cadenas α , β y γ) (Rangel C. *et al* 1999).

IMPORTANCIA MÉDICA Y TOXICIDAD DE IL-2.

Pruebas clínicas han demostrado que la administración *in vivo* de células LAK (del inglés Lymphokine Activated Killer), más IL-2 produce regresión de masas tumorales en pacientes con cáncer renal y melanoma en fase Terminal observándose respuesta completa y duradera en 3% de los pacientes. Existen reportes que indican un aumento en los niveles de TNF en suero de pacientes

poco después de la infusión de IL-2, lo cual se relaciona con la actividad antitumoral observada (Rangel C. *et al* 1999).

La interleucina 2 (IL-2) ha cobrado gran interés en el estudio de la biología de algunos tumores ya que se usa como una alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cánceres. Ha sido utilizada sola ó en combinación con otros fármacos en la inmunoterapia adoptiva, tanto en animales como en humanos, para producir regresión de tumores en estados avanzados; donde se ha demostrado que tiene una respuesta antitumoral (Hernández J. *et al* 2005).

Su aplicación vía sistémica altera vías de regulación hematopoyéticas importantes y puede provocar serios efectos secundarios, por mencionar algunos; síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza e hipotensión, por lo cual su uso es limitado. De este modo la IL-2 no sería una buena alternativa para las pacientes con cáncer ya que para que la citocina inhiba la proliferación tumoral sería necesaria su administración vía sistémica en dosis elevadas con el inconveniente de los efectos tóxicos; ante esta situación, en la actualidad se buscan nuevas alternativas para la administración de esta citocina, una de las alternativas es encapsularla en liposomas (Ayala A. *et al* 2005).

LIPOSOMAS

Los liposomas son microvesículas formadas por lípidos anfipáticos, las cuales encierran dentro de sus membranas lipídicas compartimentos acuosos, presentan formas esféricas ó ligeramente alargadas con diámetro de varios nanómetros. Los liposomas pueden interaccionar con las células de diferentes formas: fusión, adsorción, endocitosis y fagocitosis (Ayala A. *et al* 2005).

Lípidos Anfipáticos: Son los lípidos constituyentes de las membranas, son compuestos como los fosfolípidos y los esfingolípidos, los cuales se caracterizan por tener un extremo hidrófobo y uno hidrófilo (Figura 10). En medio acuoso, la

porción hidrófoba de la molécula se junta con otras moléculas hidrófobas, lejos del agua. La porción hidrófila se aproxima a otras moléculas hidrófilas al agua. En cantidades pequeña, los lípidos polares forman gotitas ó micelas cuando se encuentran en agua. En cantidades mayores, forman una doble capa o bicapa, donde las partes hidrófobas se encuentran en el interior, y las hidrófilas en el exterior. (Schumm D.1998, Devlin T. 1999)

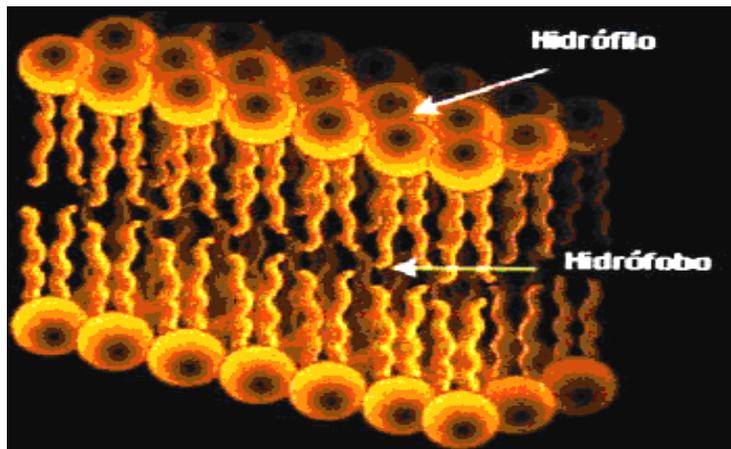


Figura 10. Sección transversal de una bicapa lipídica. (Tomado de la pagina: cmbi.bjmu.edu.cn/.../cyt_strucs/index.html)

Debido a la semejanza del arreglo lipídico entre el liposoma y la matriz membranal, así como a la manera espontánea en que se forman los liposomas en un medio acuoso, estas vesículas se han empleado como un modelo experimental de estructuras precelulares en los estudios sobre el origen de la vida, ya que al formarse aíslan micro-ambientes de los alrededores y al mismo tiempo, constituyen una barrera con una permeabilidad altamente específica. Finalmente la capacidad de los liposomas para atrapar moléculas biológicamente activas en su interior acuoso ó en su bicapa lipídica, ha permitido que estas vesículas puedan utilizarse como vehículos para transportar fármacos, enzimas ó ácidos nucleicos a células en diferentes sistemas biológicos. Generalmente se usan liposomas unilamelares de 0.2 a 0.5 μ m de diámetro, por que son muy estables e

interaccionan mejor con las células, formados con lípidos anfipáticos (Roldan P. 2006).

Inmunoterapia con liposomas: La importancia del uso de liposomas como acarreadores de diversas sustancias, radica en que se ha demostrado que su utilización modifica fuertemente la farmacocinética de los productos activos, ya que la sustancia libre requiere de mayores concentraciones para ejercer su acción, pues es rápidamente excretada por los riñones y además puede tener efectos tóxicos, diferentes ó no tener ninguno (Roldan P. 2006).

Se ha demostrado que 100UI/ ml de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaCu) *in vitro*. En particular se utilizan los liposomas catiónicos debido a que estos tienen mayor afinidad por células epiteliales (como las que conforman a los carcinomas), sin embargo, los lípidos catiónicos no existen en la naturaleza y para formar liposomas catiónicos es necesario incluir en la formulación lípidos como la espermidin-colesterol. Por esta razón se evaluó el efecto de la IL-2 encapsulada en liposomas neutros y aniónicos sobre la proliferación de líneas celulares de CaCu *in vitro*. Estos resultados se contrastaron con los obtenidos al evaluar los liposomas catiónicos. Los resultados demostraron que cualquiera de las dos formulaciones (aniónicos y neutros) de liposomas es adecuada para encapsular IL-2 sin modificar el efecto inhibitor sobre las células de CaCu CALO e INBL; proponiendo así una posible alternativa terapéutica para este tipo de pacientes (Ayala A. *et al* 2005).

RETROTRANSCRIPCION (RT).

La Retrotranscripción es la amplificación de RNA (especialmente mRNA) a través de la síntesis previa de su cDNA (DNA complementario al RNA), que después se amplificara por PCR. Es decir, no se obtienen copias de RNA de

partida, si no de DNA, aunque se conserva la secuencia del RNA. El método de RT-PCR tiene la mayor capacidad de detención para la medición de la expresión génica *in vitro*. Esta técnica se utiliza para amplificar mRNA de células asequibles. La mezcla inicial contiene todos los componentes necesarios: muestra de RNA, transcriptasa reversa, oligo dt, cebadores y dNTP's (Panduro A. 2000).

La enzima transcriptasa reversa, presente en retro virus, se utiliza para sintetizar una hebra de DNA complementario de cada molécula de mRNA. Esta enzima es capaz de polimerizar trifosfato de desoxiribonucleotido para formar una hebra de DNA complementario usando una molécula de RNA como plantilla. Al igual que otras DNA polimerasas, la transcriptasa reversa solo puede agregar nucleótidos al extremo 3' de un iniciador (primer) apareado por sus bases a la plantilla. Esta función la cumple un oligo-dt libre agregado, al hibridar la cola poli(A) 3' de cada plantilla de mRNA (Lodish, *et al*, 2000).

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la Polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), inicialmente descrita por Kary B. Mullis en 1985, es una técnica que imita la forma en que la naturaleza lleva acabo la replicación del ADN. Se sabe que la Polimerasa de ADN de especies bacterianas que viven en fuentes termales es estable a temperaturas de 90° C, muy por encima de la temperatura que destruye la actividad de otras Polimerasas de ADN, Mullis y colaboradores aprovecharon esta enzima para desarrollar la técnica de PCR.

Fundamento:

El ADN normalmente se encuentra como una molécula de dos cadenas en forma de hélice donde cada cadena es complementaria de la otra. La PCR inicia con la muestra de ADN, la cual es puesta en un tubo junto con los primers (segmentos cortos sintetizados de ADN de cadena sencilla que corresponden y se unen exactamente a la porción de ADN a sintetizar), desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP`s los bloques que constituyen el ADN), buffer y una enzima (polimerasa) resistente al calor (Mendoza J. *et al.* 2004).

La reacción se lleva a cabo en 3 pasos: *Desnaturalización, Alineación y Extensión.*

Desnaturalización: Aun cuando el DNA se obtenga aislado y puro se somete a una temperatura de 92° a 96° C durante 1 minuto con el objeto de que la doble hélice de DNA se separe y que los oligonucleótidos iniciadores se unan a los sitios con secuencias complementarias, (Figura 11) (Panduro A. 2000).

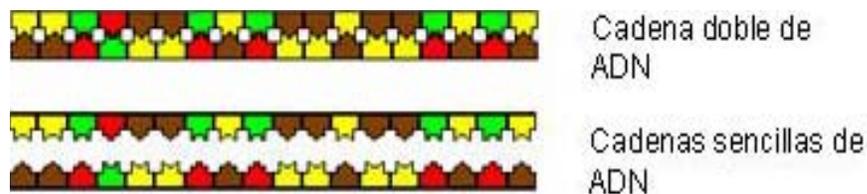


Figura 11. Desnaturalización de la cadena de DNA. (Tomado de Mendoza J. 2004)

Alineación: Es evidente que si no se separan las dos hebras sencillas del DNA, los iniciadores ó primers no se podrán alinear y por lo tanto se interrumpirán los eventos subsecuentes (Panduro A. 2000).

Los primers preparados de oligonucleótidos complementarios a los extremos 3' y 5' del segmento de ADN a amplificar hibridan con el sitio correcto de ADN geonómico que hasta ese momento se encuentra a baja concentración.

Como los primers no pueden unirse a la cadena ADN a temperatura elevada, se necesita el enfriamiento a 55 °C, entonces los primers pueden alinearse a las partes finales del ADN (Figura 12). Esto toma aproximadamente 20 segundos (Mendoza J. *et al.* 2004).



Figura 12. Alineación de la cadena de DNA. (Tomado de Mendoza J. 2004)

Extensión: Una vez efectuada la alineación de los iniciadores ó primers por complementariedad de bases, a partir de los mismos la polimerasa de ADN comienza a sintetizar una copia complementaria de la secuencia específica (molde) (Figura 13). En la actualidad, una de las enzimas que mas se usa en la técnica de PCR es la polimerasa Taq de DNA (aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*), que actúa en condiciones optimas a una temperatura de 70 a 74 °C (Panduro A 2000).

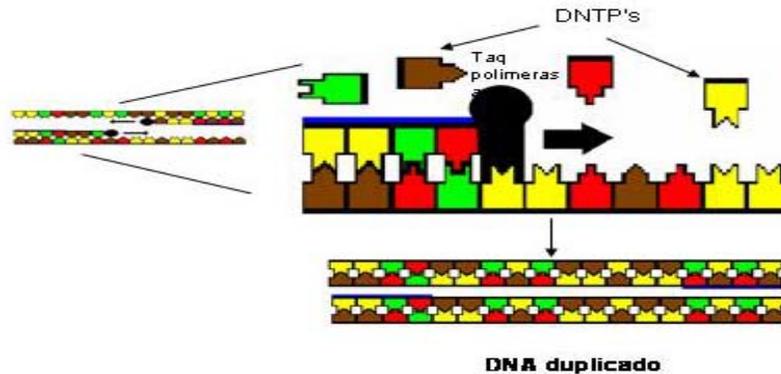


Figura 13. Extensión de la cadena de DNA. (Tomado de Mendoza J. 2004)

Las tres etapas de la reacción de PCR: La desnaturalización, alineación y la extensión de la nueva cadena de ADN definida por el primer se conocen como ciclos (Mendoza J. *et al.* 2004).

Este ciclo de desnaturalización y síntesis puede repetirse doblando así el número de copias de la secuencia comprendida entre los primers, por lo tanto la secuencia deseada crece exponencialmente, de tal forma que si se empieza con una molécula, después de 30 ciclos habrá cerca de mil millones de copias de ADN. Para conseguir una amplificación específica del ADN se requieren 20 a 30 ciclos de reacciones, cada ciclo dura aproximadamente entre 2-5 minutos y un procedimiento automático permite, en pocas horas obtener una enorme cantidad de ADN (Mendoza J. *et al.* 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el melanoma es susceptible a un control por medio de la estimulación del sistema inmunológico del paciente utilizando IL-2 por vía sistémica. Desafortunadamente por los graves efectos secundarios producidos por esta citocina actualmente se buscan vías para su aplicación. Para ello se trabaja en la búsqueda de nuevas estrategias para su administración al respecto nuestro grupo de trabajo evaluó el efecto de altas concentraciones de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos en un modelo experimental *in vivo*, cuyos resultados indican que existe una reducción de las masas tumorales, así como de los efectos tóxicos, en los animales tratados (Bañuelos 2000). Sin embargo, poco se sabe del proceso de regulación de las citocinas que participan en el rechazo antitumoral. Por esta razón, en este trabajo se evaluaron los niveles de expresión de las citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α en células de bazo de ratones singénicos de la cepa C-57BL/6NHsdG con tumores de melanoma de células B16F0, tratados con IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos. Con el fin de obtener información sobre la respuesta inmunológica inducida por este tratamiento.

HIPÓTESIS

Se conoce que la respuesta antitumoral inducida por las células del sistema inmunológico, esta regulada entre otras citocinas por: IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α e IL-10, donde las cuatro primeras juegan un papel muy importante en la proliferación y diferenciación de células citotóxicas específicas (Tc), que participan directamente en la eliminación de masas tumorales, mientras que IL-10 regula negativamente esta actividad. Por tanto, al administrar IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos como tratamiento en ratones de la cepa C-57BL/6NHsd; modificara la síntesis de estas citocinas en células de bazo de los ratones que reciben este tratamiento.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de citocinas: IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α , por la técnica de RT-PCR, en células de bazo de ratones tratados con IL-2 encapsulada.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Cultivar la línea de melanoma B16F0.
- 2.- Inocular a cada grupo de ratones hembra de la cepa C-57BL/6NHsd, con la línea de melanoma.
- 3.- Administrar como tratamiento IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos a los ratones hembras singénicos de la cepa C-57BL/6NHsd inoculados con células B16F0.
- 4.- Extraer el RNAm del bazo de los ratones tratados con IL-2 encapsulada.
- 5.- Medir los niveles de IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α en células de bazo de los ratones C-57BL/6NHsd por medio de la técnica de RT-PCR.
- 6.- Esclarecer el papel de IL-2 encapsulada en la regulación de IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α .

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

a) Línea Celular: Se utilizó la línea celular de Melanoma B16F0 de la reserva crió preservada de el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Las células se cultivaron en medio líquido D-MEM (Gibco) suplementado con 20% v/v de suero fetal bovino (SFB) de Gibco. La incubación se realizó a 37⁰ C, una atmósfera de 95% de humedad relativa y 5% de CO₂.

b) Animales de Experimentación: Se utilizaron 20 ratones hembra de la cepa C-57BL/6NHsd de tres semanas, procedentes del Centro UNAM – Harlan de producción de animales de laboratorio.

c) IL-2: Se utilizó IL-2 recombinante (R&D, systems).

d) Componentes de Liposomas Catiónicos: Fosfatidilcolina (PC) y Espermidin-Colesterol (ESP-CHol). (Roldan P. 2006).

REACTIVOS:

RT

Amortiguador 5X (Invitrogen)
DTT 0.1 M (Invitrogen)
Enzima MMLV-RT (Invitrogen)
DNTP'S 5 mM Mix (Fermentas)
Oligo (DT) 15 Primer 500 µg/ml (Promega)

PCR

Amortiguador 5X Green Go Taq (Promega)
DNTP'S 10 mM Mix (Fermentas)
Enzima Go Taq DNA Polímerasa 5u/µL (Promega)
Primers

Electroforesis

Agarosa (Invitrogen)
Marcador de peso molecular Puc19 DNA/ MSPL 34-501 Pb (Fermentas)
Buffer de Carga Blue/Orange 6X (Promega)

MÉTODOS:

1) Tratamiento de Ratones:

Los ratones se clasificaron por grupos según el tratamiento que se les aplicó:

Grupo A (grupo control): sin tratamiento y lo conforman 4 ratones

Grupo B: inoculación de células, con 4 ratones

Grupo C: inoculación de células más el tratamiento con IL-2 encapsulada, conformado por 5 ratones.

Grupo D: inoculación de células más el tratamiento con IL-2 encapsulada, conformado por 5 ratones. Este grupo se dividió en 5 subgrupos a los cuales se les asignó la siguiente nomenclatura: D1, D2, D3, D4 y D5

2) Cultivo y Conteo de Células:

Se cultivó la línea celular B16F0 en medio de cultivo DMEN 10% SFB (Gibco), cuando las células se encontraron en fase exponencial, se despegaron de la caja de cultivo con una solución de verseno, se realizó el conteo de células con ayuda de un hemocitometro (Cámara de Neubauer) obteniendo una cantidad de 5×10^5 células que fueron resuspendidas en 0.33 ml en una solución de PBS.

3) Inoculación de células:

Se inocularon 500 mil células B16F0 por ratón, vía intraperitoneal (i.p) se utilizó la misma forma de inoculación para los tres grupos experimentales (B, C y D).

4) Aplicación del tratamiento:

Al séptimo día de haber realizado la inoculación, se aplicó vía intraperitoneal el tratamiento de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos (0.3 ml para cada ratón) diariamente durante 5 días para los grupos C y D.

5) Sacrificio de los animales:

Los ratones de los grupos A, B y C se sacrificaron al quinto día de tratamiento; El sacrificio de los ratones del grupo D se realizó al día 1, 2, 3, 4 y 5 después de recibir el tratamiento (D1 se sacrificó al primer día de tratamiento, el grupo D2 al segundo, el grupo D3 al tercer día, el grupo D4 al cuarto y el grupo D5 al quinto día de tratamiento). Los animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron por dislocación craneal. Posteriormente se realizó la disección del área abdominal de cada ratón para extraer el bazo. Este fue colocado en una solución de PBS en un tubo para poder conservarlo en perfectas condiciones.

6) Extracción de RNAmensajero de células de bazo de ratón:

Los bazos de cada ratón se maceraron para obtener las células. Estas se colocaron en un tubo con una solución de PBS, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantaron sin despegar el botón de células, este procedimiento se repitió 3 veces con el fin de que quedara completamente libre de residuos. Al botón de células se le agregó 1ml de Trizol (Gibco), se resuspendió y se dejó reposar de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente, se agregó 200µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 3 minutos, se dejó reposar de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm a una temperatura de -8° C, se retiró la fase acuosa y se paso a un tubo nuevo, a este tubo se le agregó 500µl de isopropanol, esta mezcla se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar a 12000 rpm a una temperatura de

-8° C, se guardó a -20° C toda la noche, nuevamente se centrifugó y se decantó el isopropanol, al botón que se formó se le agregó 1 ml de etanol al 75% por cada ml de trizol, se resuspendió y se centrifugó a 7500 rpm a una temperatura de -7° C durante 5 minutos, se decantó el etanol y se dejó evaporar a temperatura ambiente, para obtener nuestro stock de RNAm, el cual resuspendimos en 20 µl de agua DPC.

7) Cuantificación del RNA mensajero:

Se tomaron 4 µl del stock de RNA y se resuspendieron en 196 µl de agua DEPC para determinar las concentraciones de RNAm (µg/ml), las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro y se leyeron las absorbancias a 260 y 260-280.

8) Retrotranscripción (RT):

Para llevar a cabo la RT es necesario que en cada muestra de RNAm tuviera una concentración de 1 µg / µl. la cual se calculó con la siguiente formula:

(ABSORBANCIA DE 260) (VOLUMEN DE LA DILUCIÓN) (40) / 1000 = 1 µg / µl de RNAm.

Después de haber hecho los cálculos correspondientes, se procedió a realizar la RT, con las siguientes condiciones (Tabla 2).

REACTIVOS	1RX
Amortiguador 5x	6 μ l
0.1 MDTT	2 μ l
DNTPS 5mM	4 μ l
Enzima MMLV-RT	1 μ l
Oligo dt	2 μ l
Muestra	1-2 μ l
Agua libre RNAsas	13 μ l
Volumen total	30 μl

Tabla 2. Condiciones para RT

Nota: las reacciones se ponen en un termociclador 1 hora a 46° C.

9) Reacción en cadena de la plimerasa (PCR):

Los productos que se obtuvieron de la RT se utilizaron para llevar a cabo la PCR. Las condiciones para cada reacción son las siguientes: (Tabla 3.)

REACTIVO	1RX
5x Green	6 μ l
DNTPS	0.8 μ l
Primer 1 (Sentido)	1 μ l
Primer 2 (Antisentido)	1 μ l
Go Taq Polimerasa	0.15 μ l
Muestra cDNA	4 μ l
Agua libre de RNAsas	7.05 μ l
Volumen total	20 μl

Tabla 3. Condiciones para PCR

Las secuencias de los primers (Invitrogen) que se utilizaron fueron las siguientes:

IL-4 5' TGTTCTTCGTTGCTGTGA 3'
 3' TC AACCCCCAGCTAGTTGTC 5'
 PB=177

IL-10 5' TTTTCACAGGGGAGAAATCG 3'
 3' CCAAGCCTTATCGGAAATGA 5'
 PB=162

TNF- α 5' GCACCTCAGGGAAGAGTCTG 3'
 3' CTGGGACAGTGACCTGGACT 5'
 PB= 204

IFN- γ 5' TGAGCTCATTGAATGCTTGG 3'
 3'ACTGGCAAAGGATGGTGAC 5'
 PB=237

β -actina 5' GGGTCAGAAGGATTCCTATG 3'
 3' GGT CTCAAACATGATCTGGG 5'
 PB= 234

NOTA: las reacciones se pusieron en un termociclador durante 3 horas y media.

Para que la PCR se lleve a cabo en perfectas condiciones el termociclador lleva a cabo los pasos siguientes:

- Paso 1= 94°C 6 minutos
- Paso 2= 55° C 2 minutos
- Paso 3= 72° C 2 minutos
- Paso 4= 94° C 45 segundos
- Paso 5= 30 veces el paso 2 al 4
- Paso 6= 55° C 2 minutos
- Paso 7= 72° C 7 minutos
- Paso 8= 20° C 30 minutos

10) Electroforesis:

Finalmente se observó la expresión de las citocinas por medio de una electroforesis (gel de agarosa al 1.5 %). Se pesó 1.5 % de agarosa y se diluyó en 100 mililitros de TBE 1X, se calentó hasta que desaparecieran los grumos de agarosa, se le agregaron unas gotas de bromuro de etidio y se vació a una cámara de electroforesis, se puso el peine correspondiente según el número de muestras obtenidas producto de la PCR. Se esperó a que polimerizara, se quitó el peine y se prosiguió a poner 3 μ l de cada una de las muestras, pero antes de ponerlas se mezclaron con un buffer de carga (2 μ l) para evitar que se salieran del pozo, terminando de hacer este procedimiento la cámara se conectó a una fuente de poder, en donde las muestras corrieron a un voltaje de 90 ampers durante una hora. Para poder identificar a cada una de las citocinas se utilizó un marcador de pesos moleculares de 34 a 501 pares de bases. Por último se tomó la foto del gel con ayuda de un transiluminador.

RESULTADOS

Con la finalidad de contar con células de bazo de ratones hembra de la cepa C-57BL/6NHsd con melanoma y tratadas con IL-2 encapsulada. Se inoculó a las hembras, vía peritoneal, células de melanoma B16F0 (tumor originado en este tipo de ratón), después del establecimiento de los crecimientos tumorales en los ratones se les administró IL-2 encapsulada por 5 días consecutivos. Posteriormente se formaron dos grupos de animales para la extracción del bazo a diferentes intervalos de tiempo, así como para monitorear la presencia de tumores.

Cuantificación de RNAm de los diferentes grupos experimentales.

Para saber si las muestras de RNAm extraído de células de bazo de ratones hembra contenían una cantidad suficiente de mensajero para realizar la retrotranscripción de cada una de ellas, se llevó a cabo su evaluación. Las muestras de los distintos grupos experimentales, fueron diluidas en una relación 4:200; grupo A (control), grupo B (inoculación de células B16F0), grupo C (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento) y grupo D (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio de las hembras al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento).

Posteriormente se cuantificó el mensajero utilizando un biofotómetro, los datos de absorbancia a 260nm se utilizaron para calcular la concentración de RNAm, también obtuvimos los valores de la relación 260/280 cuyo rango debe estar entre 1-2 unidades para que la muestra se considere aceptable para realizar una retrotranscripción. Los datos del biofotómetro nos permitieron conocer, además de la cantidad del RNAm (para ajustarla a una concentración de 1µg/µl), su pureza e integridad, esta última fue confirmada por medio de un gel de agarosa (Cuadro 1).

MUESTRA	Mg/ml RNAm	Absorbancia 260	Relación 260-280	µg/ µl RNAm
A1	806.4	0.403	1.99	3.224
A2	1043.6	0.522	1.97	4.176
A3	1048.2	0.524	1.99	4.192
A4	912.9	0.456	1.98	3.648
B1	1266.3	0.633	2.00	5.064
B2	605.0	0.303	2.02	2.424
B3	773.1	0.387	2.15	3.096
B4	1038.3	0.519	2.00	4.152
C1	459.6	0.230	1.99	1.840
C2	1061.2	0.531	1.99	4.248
C3	1112.7	0.556	1.98	4.448
C4	736.7	0.368	1.99	2.944
C5	1023.4	0.512	1.98	4.096
D1	1199.3	0.600	2.00	5.120
D2	1659.7	0.830	1.99	6.640
D3	1510.6	0.755	2.00	6.040
D4	2320.7	1.160	1.99	9.280
D5	1031.3	0.0516	2.00	4.128

Cuadro 1. Cuantificación del RNA mensajero, datos de absorbancia a 260nm, y relación 260/280 de los distintos grupos experimentales; grupo A (control), grupo B (inoculación de células B16F0), grupo C (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada, administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento) y grupo D (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio de las hembras al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento).

Una vez confirmadas las condiciones óptimas de las muestras de RNAm se llevó a cabo la retrotranscripción obteniendo el DNA complementario (DNAc) para cada una de ellas.

Evaluación de la expresión de citocinas inducidas por la administración de IL-2 encapsulada.

Para evaluar la expresión de las citocinas reguladas por IL-2 encapsulada, se utilizaron los DNAC previamente obtenidos. Para la amplificación de los DNAC se utilizaron oligonucleótidos, con un tamaño de pares de bases (pb) conocidos y previamente diseñados para IL-4, IL-10, IFN γ y TNF α .

Para confirmar que las condiciones establecidas para la PCR fueron las correctas se incluyó como control interno de la técnica β -actina en los amplificados de los diferentes grupos experimentales: grupo A control, grupo B inoculación de células B16F0, grupo C inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento y grupo D inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio de las hembras al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento. Se sabe que β -actina es una proteína constitutiva de las células por lo cual su síntesis es continua y debe ser detectada en todas las muestras si la PCR esta bien diseñada. En este caso observamos la expresión del producto de amplificación de 234 pb en todas las muestras de los diferentes grupos (Figura 14 y Cuadro 2).

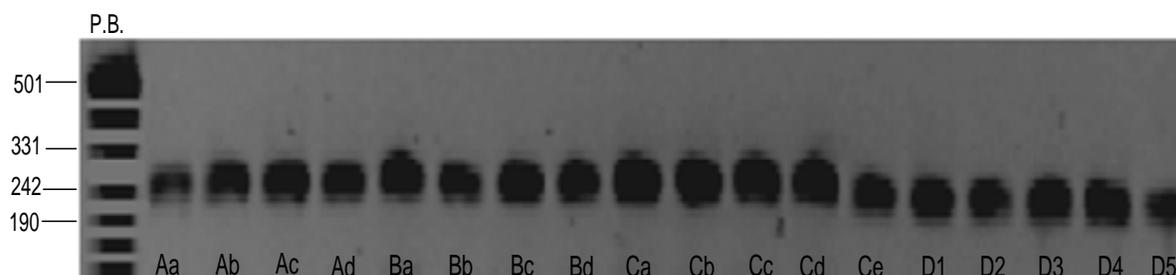


Figura 14. Expresión de RNAm para β -actina; grupo A (control), grupo B (inoculación de células B16F0), grupo C (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento) y grupo D (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio de las hembras al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento). En las muestras de los diferentes grupos se observa una banda de 234 pb.

Expresión de IL-4

Para el caso de la determinación de la presencia de IL-4 en el gel no encontramos productos de amplificación de 177 pb en ninguno de los grupos experimentales, (Figura 15 y Cuadro 2). Cabe aclarar que los ratones de los tres grupos A, B y C fueron sacrificados después del quinto día consecutivo de tratamiento, a diferencia del grupo D cuyos animales fueron sacrificados al día 1, 2, 3, 4 y 5 después de recibir el tratamiento con IL-2 encapsulada.

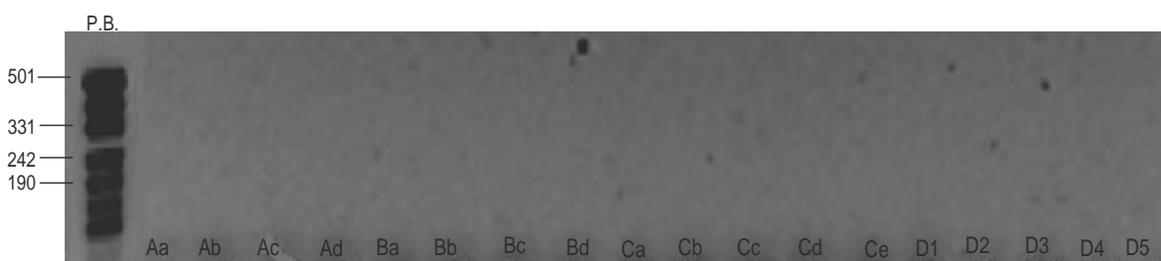


Figura 15. Expresión del RNAm para IL-4, en los distintos grupos experimentales; grupo A (control), grupo B (inoculación de células B16F0), grupo C (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento) y grupo D (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio de las hembras al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento). No se observa la banda de 177 pb esperada para este producto de amplificación.

Expresión de IL-10

Al comparar los productos de amplificación para esta citocina entre los diferentes grupos experimentales podemos observar que los animales del grupo A (control) muestran una expresión de este gen semejante a la observada en las muestras del grupo B que incluye animales que fueron inoculados con células B16F0. Sin embargo, la mayor expresión de mensajero se observó en los grupos C y D. En el caso del grupo C, 3 de los 5 amplificados mostraron una elevada expresión de la banda de 162 pb. Mientras que en las 5 muestras del grupo D, inoculados con células B16F0 + IL-2 encapsulada y sacrificados al día 1, 2, 3, 4 y 5 después del tratamiento, observamos la mayor expresión de mensajero en las muestras del día 1, 2, 3, y 4, con una disminución en la del día 5 sin llegar a ser como las observadas en el grupo control (Figura 16 y Cuadro 2).

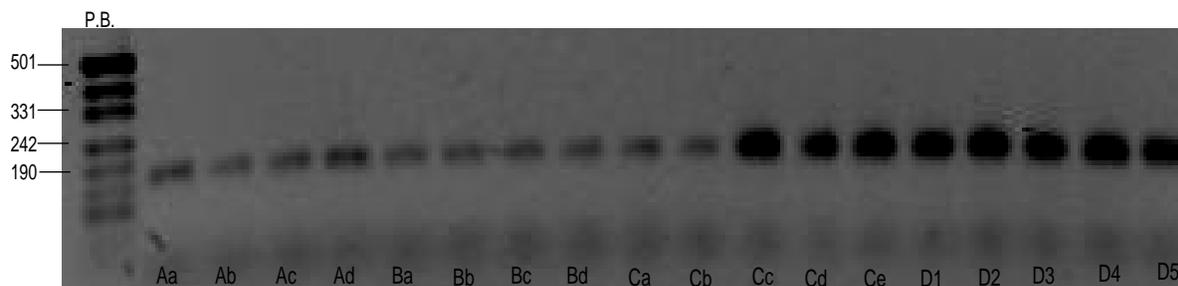


Figura 16. Expresión de RNAm para IL-10 en los distintos grupos experimentales; grupo A (control); grupo B (inoculación de células B16F0); grupo C (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento) y grupo D (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio de las hembras al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento). La banda se localizó en 162 pb, observando un incremento de IL-10 en los grupos C y D.

Expresión de IFN- γ

En el caso de interferón gamma, observamos que en general hay una baja expresión del mensajero de esta citocina en los grupos B y C, detectando una disminución de la expresión de la banda de 237 pb con respecto al control. En el grupo D (animales inoculados con células B16F0 + IL-2 encapsulada y sacrificados al día 1, 2, 3, 4 y 5 después del tratamiento), solo tres muestras presentaron productos de amplificación con un patrón semejante al observado en el grupo control (Figura 17 y Cuadro 2).

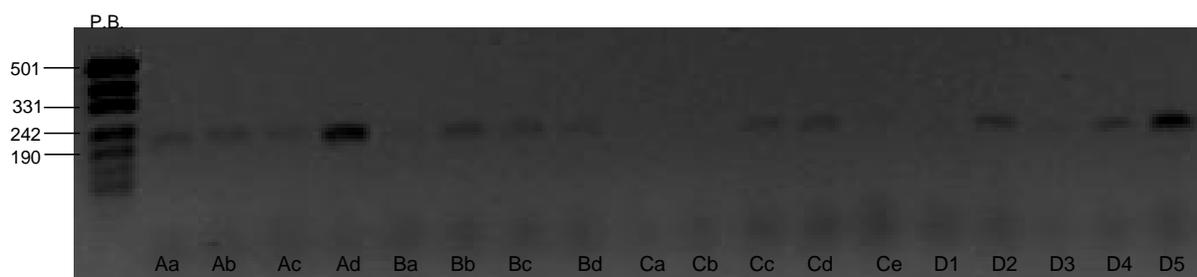


Figura 17. Expresión de RNAm para IFN- γ en los distintos grupos experimentales; grupo A (control), grupo B (inoculación de células B16F0), grupo C (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento) y grupo D (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio de las hembras al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento). La banda de 237 pb, solo se observó en el grupo A y D.

Expresión de TNF- α

Al comparar los productos de amplificación de TNF- α en general se observó una disminución de su expresión de la banda de 204 pb en los grupos B, C y D en comparación del grupo control. En el grupo B se detectó el producto en dos de las cuatro muestras. Por su parte en el grupo C, no se observa la presencia de bandas. Finalmente el grupo D solo presentó expresión de mensajero en la muestra obtenida después del quinto día de tratamiento (Figura 18 y Cuadro 2).

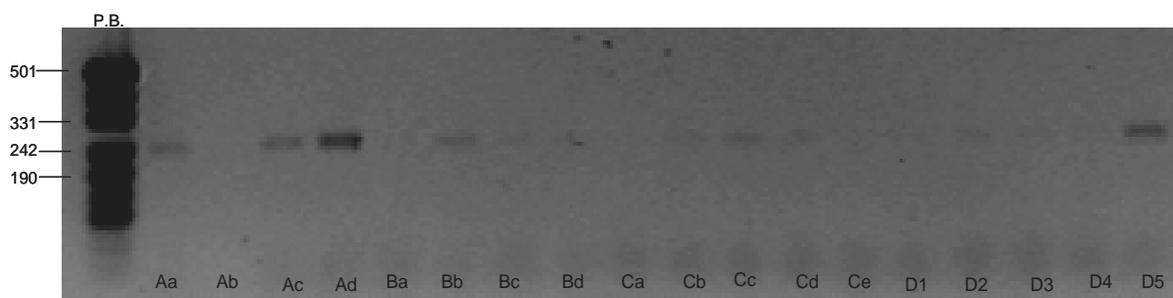


Figura 18. Determinación de la expresión del RNAm para TNF- α en los distintos grupos experimentales; grupo A (control), grupo B (inoculación de células B16F0), grupo C (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento) y grupo D (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio de las hembras al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento). La banda para este producto de amplificación se localizó en 204 pb, en general se observa una baja expresión en la mayoría de los grupos experimentales.

GRUPO	β - actina	IL-4	IL-10	IFN- γ	TNF- α
A (control)	*****	-	***	****	***
B (inoculación de B16F0)	*****	-	**	**	*
C (inoculación de B16F0 + IL-2 encapsulada)	*****	-	****	*	*
D1 (inoculación de B16F0 + IL-2 encapsulada)	*****	-	*****	-	-
D2 (inoculación de B16F0 + IL-2 encapsulada)	****	-	*****	*	-
D3 (inoculación de B16F0 + IL-2 encapsulada)	*****	-	*****	-	-
D4 (inoculación de B16F0 + IL-2 encapsulada)	*****	-	*****	*	-
D5 (inoculación de B16F0 + IL-2 encapsulada)	***	-	****	**	**

Cuadro 2. Expresión de las citocinas en los diferentes grupos experimentales: grupo A (control), grupo B (inoculación de células B16F0), grupo C (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada durante 5 días consecutivos, con sacrificio de las hembras al día 5 del tratamiento) y grupo D (inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada administrada por 5 días con sacrificio al día 1, 2, 3, 4 y 5 de tratamiento). El aumento en la expresión del RNAm se distingue con un “*” y la ausencia del RNAm con “-”.

DISCUSIÓN

Se sabe que interleucina 2 (IL-2) es producida por un subtipo de linfocitos T auxiliares denominados Th1 y en menor cantidad por linfocitos T citotóxicos, esta citocina ha cobrado gran interés ya que se usa como una alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cánceres (Hernández J. *et al* 2005). Pruebas clínicas han demostrado que la administración *in vivo* de células activadas para matar (LAK; del inglés lymphokine activated Killer cells) acompañadas de la administración de IL-2 vía sistémica producen regresión de masas tumorales en pacientes con cáncer renal y melanoma en fase terminal observándose remisión completa y duradera en 3% de los pacientes (Rangel C. *et al* 1999).

Sin embargo, su uso se ha limitado debido a los graves efectos secundarios producidos por IL-2. Por esta razón actualmente se buscan nuevas vías de administración de esta citocina para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Al respecto en el Laboratorio de Oncología Celular, nuestro grupo de trabajo ha utilizado IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos como tratamiento de ratones con tumores de cáncer cérvico uterino (CaCu) inducidos, obteniendo hasta un 80% de reducción de las masas tumorales, detectando al mismo tiempo una disminución de los efectos tóxicos de IL-2. Estos resultados nos hacen pensar que el uso de IL-2 encapsulada puede ser una vía de administración adecuada de la citocina para pacientes con cáncer (Ayala A. *et al* 2005). Para ello es necesario confirmara el efecto de IL-2 encapsulada en otro modelo de tumor como el melanoma que se sabe puede ser eliminado eficientemente al estimular el sistema inmunológico (Thejass P., Kuttan G., 2007).

Por esta razón, en este trabajo se utilizó el modelo de melanoma para determinar si existe el mismo efecto antitumoral encontrado para CaCu y así como, determinar el patrón de secreción de citocinas inducido en células de bazo de ratones tratados con IL-2 encapsulada.

Es conocido que los linfocitos T juegan un papel importante en la regulación de la respuesta del sistema inmunológico, participando en la proliferación y diferenciación de las distintas poblaciones de linfocitos T, tal es el caso de los linfocitos T auxiliares (Th) que se subdividen en Th1 y Th2 dependiendo del tipo de citocinas que producen. Los linfocitos Th1 secretan interferón gamma (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) y factores de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y beta (TNF- β). Por su parte, los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Lopez M. 2003). Estas citocinas ejercen funciones antagónicas ya que mientras algunas de ellas inducen la proliferación o diferenciación otras regulan negativamente la activación de los linfocitos.

Es importante tener en cuenta esta información ya que se sabe que IL-10 en altas concentraciones puede inhibir la síntesis de INF- γ , IL-2 e IL-4 (Sheldon J. y Riches P. 1999.). Por lo tanto, el hecho de haber determinado en este trabajo, una alta expresión de RNAm para IL-10 puede estar directamente relacionada con la regulación negativa de IL-4 en los grupos experimentales, dando como resultado la no expresión del mensajero para esta citocina tal y como observamos en nuestros resultados.

Ahora bien, el haber determinado una alta expresión de RNAm para IL-10 en las muestras, tanto de los ratones sacrificados al día 5 de tratamiento como los sacrificados al día 1, 2, 3, 4 después de la administración de IL-2 encapsulada, nos indica que ésta última debe estar induciendo una severa activación de células Th2 que son las encargadas de la síntesis de esta citocina. El haber obtenido altas concentraciones de IL-10, conocida como una de las principales citocinas inmunosupresoras (Jiménez Arnau 1995), podría implicar que se esta produciendo una regulación negativa de poblaciones de linfocitos Th1, que producen IFN- γ y TNF- α y que esta podría ser la posible explicación a que en nuestros experimentos observáramos que en los grupos donde detectamos mayor expresión de RNAm para IL-10 se tuviera la menor expresión tanto de IFN- γ como TNF- α . Sería

importante realizar estudios para la caracterización de las poblaciones de linfocitos Th1 y Th2 en los ratones tratados con IL-2 para complementar los datos aquí mostrados.

Por otro lado, todos los interferones (INFs) poseen actividad inmunorreguladora, antiviral y antiproliferativa sobre células normales y tumorales, por lo cual se utilizan como agentes antineoplásicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Sotoca M. 1999). Se ha reportado que niveles altos de IFN- γ regula negativamente poblaciones de Linfocitos Th2 (Margni A. 1996), sin embargo, nuestros datos muestran una baja expresión de RNAm para IFN- γ en todos los grupos incluyendo el control, lo cual podría indicar que IL-2 no está generando cambios en la expresión de esta citocina a los 5 días de tratamiento. Si consideramos que se requieren entre 5 y 7 días para la activación de linfocitos T y que estos puedan secretar citocinas como IFN- γ , podría ser que el tiempo en que evaluamos su expresión no sea suficiente para observar cambios en sus niveles de expresión. Por esa razón a pesar de que determinamos altos niveles de mensajero para IL-10 no observamos disminución en la síntesis de citocinas Th1 como IFN- γ .

Para el caso de la regulación de la expresión de TNF- α encontramos que IL-2 la disminuye, a diferencia de IFN- γ , que no muestra cambios. Este es un dato muy interesante ya que ambas citocinas son secretadas por linfocitos Th1 (Margni A. 1996), por lo que pensamos que la disminución en TNF- α se debe a una secreción diferencial de citocinas Th1, la cual parece ocurrir en intervalos de tiempo diferentes. Por lo que los altos niveles de IL-10 producidos por linfocitos Th2 pueden actuar de manera diferencial sobre las poblaciones Th1. Lo cual parece razonable ya que durante la activación del sistema inmunológico no se sintetizan todas las citocinas ni se diferencian todas las poblaciones de células efectoras al mismo tiempo.

Por los resultados obtenidos en este trabajo, donde encontramos una alta expresión de IL-10, es evidente que el tratamiento con IL-2 esta induciendo la activación de poblaciones de linfocitos Th2, sin embargo, también observamos que las masas tumorales están siendo reducidas hasta en un 90%, lo cual habla de que no solo de linfocitos T citotóxicos están eliminando las masas tumorales, podemos pensar en la participación de otras células efectoras las cuales podrían ser las células NK. Al respecto se sabe que IL-10 también, estimula otras funciones de igual importancia como es, promover la actividad de las células asesinas naturales ó NK activando la defensa contra tumores e infecciones virales, por lo tanto los alto niveles de IL-10 detectados puede activar a estas poblaciones de leucocitos participando en la eliminación de crecimientos tumorales tal como lo observado en este trabajo.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir que:

- IL-2 encapsulada induce una alta expresión de RNAm para IL-10.
- IL-2 parece no modificar la expresión de RNAm para IFN- γ .
- IL-2 encapsulada induce una baja expresión de RNAm para TNF- α .
- No se encontró expresión de RNAm para IL-4.

PERSPECTIVAS:

Se sugiere realizar la extracción de células de bazo, a diferentes intervalos de tiempo después de haber recibido el tratamiento de IL-2 encapsulada.

Determinar las citocinas producidas por subpoblaciones de linfocitos T (Th1 y Th2), para correlacionar mejor esta regulación negativa de citocinas efectoras que observamos.

Determinar la presencia de células NK.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A., Lichtman A. (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier. México. pp: 563.

Aguzzi A., Heikenwalder M., Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity*. 2005; 22(1): 145-54.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (1994). *Biología Molecular de la Célula*. Omega .México. PP: 1387.

Ayala A., Corona O., Ibáñez H., Baeza R., Weiss S. y Rangel C. (2005) Efecto de IL-2 encapsulada en dos formulaciones de liposomas sobre la proliferación de células de CaCu. *Memorias del XIV congreso de Bioenergética y Bioquímica*. Oaxaca.

Arango P., Llanes F., Moreno D. y Faxas G. Influencia de citocinas en respuesta citotóxica natural de pacientes con cáncer de mama. *Cubana Oncológica* 1999; 15(3): 186-92.

Arenas Roberto. (2005). *Atlas Dermatología "Diagnostico y Tratamiento"*. Tercera Edición. Mac Graw Hill. México. pp: 600-604.

Asadullah K., Sterry W. y Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. *Pharmacol Rev*. 2003; 55(2):241-69.

Báscones A. y González M. Mecanismos Inmunológicos de las enfermedades periodontales y perimplantarias. *Avances en Periodoncia* 2003; 15 (3):121-138.

Bermúdez M., Peralta Z. y Madrid M. Terapia génica con citocinas contra cáncer cervico uterino. *Salud Pública de México* 2005; 47 (6):1-18.

Beutler B. Citocinas y caquexia neoplásica. *Hospital Practice* 1994; 3 (4): 150-157.

Dees C, Harkins J, Petersen MG, Fisher WG, Wachter EA. Treatment of murine cutaneous melanoma with near infrared light. *Photochem Photobiol*. 2002; 75(3):296-301.

Devlin Thomas.(1999). *Bioquímica*. Tercera edición. Reverte. Mexico. pp: 187-190.

Dobrzansk J., Reome B., Dutton W. Role of Effector Cell-Derived IL-4, IL-5, and Perforin in Early and Late Stages of Type 2 CD8 Effector Cell-Mediated Tumor Rejection. *Journal of Immunology*, 2001; 167: 424-434.

Ellery M. y Nicholls J. Alternate signaling pathways from the interleukin-2 receptor. Elsevier 2002: 13: 27-40.

Enz P., Kowalczyk A. y Galimberti R. Melanoma: Clínica, Estadificación Y Seguimiento. Hospital 2004: 24 (2): 1-6.

Ferrandiz Foraster. (1996). Dermatología Clínica. Segunda Edición. El Sevier Science. México. pp: 361-364.

García H., Hernández P., Gariglio P. y Berumen J. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. Immunology. 2002; 105(2): 231–243.

García M., García F., Citocinas, Inflamación Y Conducta. Vertientes 2005 8 (1-2): 4-13.

González B. y Grañena A. Interleucina 2: un paso adelante en el tratamiento del cáncer. Medicina Clínica 1996: 107 (15):578-580.

Good Roberto y Wesley Alexander. (1990). Principios De Inmunología Clínica. Reverte. México. pp: 247-257.

Guzmán R., Alcocer G. y Madrid M. Perspectivas Para El Desarrollo De Vacunas e Inmunoterapia Contra Cáncer Cervico uterino. Salud Pública de México. 1998:40 (1): 1-9.

Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H., Kaer V., Saik I. and Okumura K. Differential Regulation of Th1 and Th2 Functions of NKT Cells by CD28 and CD40 Costimulatory Pathways. Journal of Immunology. 2001: 166: 6012-6018.

Hernández J., Corona O., Ibáñez H., Baeza R., Leiva S., Weiss S. y Rangel C. (2005) Caracterización de liposomas cationicos como acarreadores de interleucina 2 (IL-2). Memorias del XIV Congreso De Bioenergética Y Biomembranas. Oaxaca.

Hernández R. y Ingeborg B. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. Salud Pública De México. 2006: 48 (5):430-439.

Hernández S., Velásquez G., Allen F., Bonilla G. y Elorriaga G. Citocinas Proinflamatorias. Rev. Med IMSS. 2004: 42 (3): 227-233.

Jiménez Arnau. Interleucina 10, supresor natural de la respuesta inflamatoria cutánea. Actualidad Dermatológica. 1995: 26: 397-407.

Jiménez Arnau. Melanoma Maligno: marcadores de metástasis circulantes. Actualidad Dermatológica 1995: 426 (1): 149-159.

Ju SA., Park SM., Lee SC., Kwon BS and Kim B. Marked Expansion of CD11c+CD8+ T-Cells in Melanoma-bearing Mice Induced by Anti-4-1BB Monoclonal Antibody. *Mol Cells*. 2007;24(1):132-8.

Kobayash M., Kobayashi M., Pollard R. and Fujio Suzuki. A. Pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *Journal of Immunology*. 1998; 160: 5869-5873.

Lee H., Baek S., Joe S. and Pyo S. Modulation of IFN-gamma production by TNF-alpha in macrophages from the tumor environment: significance as an angiogenic switch. *Int Immunopharmacol*. 2006; 6(1):71-8.

Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Panamericana. México. pp: 1083.

Loza R., Esquivel G., Mercado S., Gutiérrez X., Banda R. y Verdugo R. Expresión del mRNA de la IL-2 en vasos de pollo vacunados contra el virus de la influenza aviar. *Tec Pecu México*. 2003; 41 (2):141-152.

López M., Escobar A., Alfaro J., Fodor M., Larrondo M., Ferrada C. y Salazar F. Avances en inmunoterapia celular contra el melanoma maligno. *Rev Méd Chile*. 2004; 132: 1115-1126

López Moreno H. Cestodiasis Titulares: Participación De Los Linfocitos T Cooperadores 1 y 2. *Salud Pública De México*. 2002; 44 (2): 145-152.

Margni Aníbal. (1996). *Inmunología e Inmunoquímica*. 5ta.Edición. Panamericana. México. pp: 1-9.

Magaña M., Cazarín J., Pérez R. (2003). *Dermatología*. Primera Edición. Medica Panamericana. México. pp: 314-320.

Maher S , Romero W. , Scarzello A., Gamero A. Interferón: celular executioner or white knight?. *Curr Med Chem*. 2007; 14(12):1279-89.

Mendoza J, García A, Aguilar L. (2004). *Protocolos de Biología Molecular*. Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer. pp: 1 y 2.

Moreno Koch. Melanoma. *Oncología*. 2004; 27 (3): 1-4.

Molina V., Romero A., Ruiz A., Heredia W., Atencio R. y Taborda L. Interleucina 4 en el suero de embarazadas normales y preeclámpicas. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2000; 60(2):77-80.

Oelke M., Moehrle U., Chen L., Behringer D., Cerundolo V., Lindemann B. and Mackensen A. Generation and Purification of CD8⁺ Melan-A-specific Cytotoxic T

Lymphocytes for Adoptive Transfer in Tumor Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2000; 6: 1997-2005.

Orkin M., Maibach H. y Dahl M., (1994). *Dermatología*. Primera Edición. Manual Moderno. México. pp: 639-641.

Ossa E. El factor de necrosis de los tumores o caquectina. *la treia*.1990:1(2): 114-120.

Panduro Arturo. (2000). *Biología Molecular En La Clínica*. Tercera Edición. Mc Graw-Hill. México. pp: 31-41.

Pascual F., Ortega V., Campos M., Yanez J. y García J. Efecto del IFN gamma y del Lymphomysot Sobre El Crecimiento del Melanoma B16F10 *in vitro* e *in vivo*. Tratamiento con IFN gamma y Lymphomysot. *Patología*. 2006. 39 (1): 27-34.

Pagano R. and Weinstein J. Interactions of liposomes with mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1978; 7: 435-468.

Pinar S., Sáez B., Clavo V. y Lara J. Tumores Cutáneos Malignos. *Biocancer*. 2004; 1 (1): 1-14.

Piña O. y Ortiz H. Neoplasia hematodérmica CD4+/CD56+. Diagnóstico histopatológico, fisiopatología y avances recientes de un tumor originado en células dendríticas plasmocitoides. *Rev Esp Patol*. 2007; 40, (1): 11-22.

Puig Lluís. Oncogenes y Genes Supresores TumORAles En El Melanoma Maligno Cutáneo. *Actualidad Dermatológica*. 1997:10 (1): 705-713.

Rangel Corona (1999). *Interleucina 2*. Plaza y Valdez. México. pp: 347.

Recasens M., Ricart W. y Fernández R. Obesidad e inflamación. *Rev Med Univ Navarra*. 2004; 48 (2): 49-54.

Regueiro G.R., López L.C., Martínez N.E., Gonzáles R.S. (2002). *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune*. 3ra. Edición. Panamericana. México. pp: 1-4.

Roldan Pérez. (2006). Caracterización de liposomas aniónicos y neutros por resonancia magnética nuclear ³¹ P. Facultad de estudios superiores Zaragoza.

Rojas Espinosa Oscar. (1996). *Inmunología*. Primera Edición. Panamericana. México. pp: 228.

Romero A., Corzo M., Vitoria M., Molina V., Castellano A., Estévez J. y González J. Interleucina-10 y quimiopreención retinoide del cáncer de mama experimental. *Gac Méd Caracas*. 2001: 109(1):67-72.

Rosas S., Baca T., Muñoz F. y Muñoz G. Estudio Clínico, Epidemiológico e Histopatológico De Melanoma Maligno. *CIMEL*. 2003: 8(1): 23-27.

Roitt I, Brostoff J., Male D. (2000). *Inmunología*. Elsevier. México. pp: 423.

Ross M., Kaye J., Pawlina W. (2005). *Histología Texto Y Atlas A Color Con Biología Celular Y Molecular*. Panamericana. México. pp: 864.

Salcedo T., Azzoni L., Wolf F. and Perussia B. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *Journal of Immunology*. 1993: 151: 5 2511-2520.

Sheldon J. y Riches P. Citocinas inflamatorias. *Cardiovascular risk factors*. 1999: 8 (3) 165-176.

Serra Baldrich. La piel como órgano inmunológico. *Actualidad Dermatológica*. 1990: 13 (1): 487-499.

Schumm Dorothy. (1998). *Principios de Bioquímica*. Primera Edición. El Manual Moderno. PP: 313-315.

Soto I., Caceres J., Mendoza J. y Weiss B. (1999). *Las Citocinas En La Hematopoyesis Y El Sistema Inmunológico: Mecanismos Celulares y Moleculares*. Plaza y Valdez. México. pp: 347.

Sotoca Momblona J. Cuarenta años de interferones. *Farrn Hosp.*. 1999; 23(4):205-213.

Stites P., Abba T. (1994). *Inmunología Humana Y Básica*. El Manual Moderno. México. pp: 418.

Suites Daniel. (1991). *Inmunología Humana y Básica*. Primera Edición. El Manual Moderno. México. pp: 418.

Tejas P. and Kuttan G. Modulation of cell mediate immune response in B16F-10 melanoma induced matastatic tumor – bearing C57BL/6 mice by sulforaphane. *Inmunopharmacology and Inmunotoxicology*. 2007: 29 (173): 11-17.

Torrilla A. y Noris G. *Inmunoterapia En Melanoma*. *Oncología*. 2004: 27 (3): 102-107.

Ülger AF., Sen E., Ereku S. y Gönüllü O. Melanoma pulmonar maligno. *Notas Clínicas*.2005;41(2):102-104

Valdespino Gómez y Rocha Zavaleta. Inmunoterapia mediada por linfocitos T en pacientes con cáncer. *Cir. Ciru*. 2003: 71 (3): 235-244

Valle Mendiola A. y Weiss Steider B. Origen Molecular Del Cáncer. *Vertientes*. 2003: 6(1): 3-8

Zhang Q., Seipp R., Chen S., Vitalis T., Li XL, Choi K., Jeffries A. y Jefferies W. TAP expression reduces IL-10 expressing tumor infiltrating lymphocytes and restores immunosurveillance against melanoma. *Int J Cáncer*. 2007: 120(9):1935-41.

PAGINAS DE INTERNET:

www.cancer.org

cmbi.bjmu.edu.cn//cyt_strucs/index.html

ANEXO 1

SOLUCIONES:

Solución Fisiológica de Verseno

RPMI 1640/10% SFB

Hidrocortisona

H₂O DEPC

H₂O Bidestilada

H₂O Inyectable

H₂O nuclease free

PBS

Trizol

Cloroformo

Alcohol isoamilico

Alcohol Isopropilico

Etanol 70%

Bromuro de etidio

TBE 10X, 1X y 0.5X

ANEXO 2

PREPARACION DE REACTIVOS:

TBE 10X

- 108 gramos de Tris base
- 55 gramos de Acido bórico
- 40 mililitros de EDTA 0.5 M
- Nota: lleve a 1000 ml con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Guardar a temperatura ambiente.

EDTA 0.5 M

- 186.1 gramos de EDTA
- 1000 mililitros de agua destilada
- Nota: disolver el EDTA en los 1000ml de agua destilada y llevar a PH 8.

TBE 1X

- tomar 50 mililitros de TBE 10X y diluirlo en 450mililitros de agua destilada.

GEL DE AGAROSA 1.5%

- 1.5 gramos de agarosa en 100 mililitros de TBE 1X

AGUA DEPEC

- 0.2% de Dietil-pirocarbonato en 100ml de agua

PRIMERS

- β -actina (1:10)
- IL-4 (1:5)
- IL-10 (1:5)
- TNF- α (1:5)
- IFN- γ (1:5)

DNTPS (MIX)

- 100 μ l de A
- 100 μ l de G
- 100 μ l de T
- 100 μ l de C

-600 µl de agua libre de Rnsas

Nota: se prepararon 400 µl de dNTP´s en 600 µl de agua libre de RNAsas

SOLUCION FISIOLOGICA DE VERSENO

En 800 mililitros de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias.

-Tris base	3.04 gramos
-Cloruro de sodio	800 gramos
-Cloruro de potasio	0.40 gramos
-Etilen-diamino-tetra-acetico (EDTA)	0.20 gramos

Nota: El pH se ajusta a 7.7 con acido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 litro y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

SOLUCION DE FOSFATOS (PBS)

En 800 mililitros de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

-Cloruro de sodio	8.0 gramos
-Fosfato de sodio monobásico	2.88 gramos
-Fosfato de potasio	0.4 gramos
-Cloruro de potasio	0.20 gramos

El pH se ajusta a 7.2 con acido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 litro y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

ABREVIATURAS

IL-4:	Interleucina 4
IL-10:	Interleucina 10
IFN- γ	Interferón gamma
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
RT:	Retrotranscripción
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
IL-2:	Interleucina 2
NK:	Células accinas naturales
Células T:	Células derivadas del timo
Células B:	Células derivadas de la médula ósea
LTCD4 ⁺ :	Linfocitos T auxiliares CD4 ⁺
LTCD8 ⁺ :	Linfocitos T citotóxicos CD8 ⁺
IgM:	Inmunoglobulinas M
IgD:	Inmunoglobulina D
IgE:	Inmunoglobulina E
LGL:	Linfocitos granulares grandes
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
IL-13:	Interleucina 13
IL-6:	Interleucina 6
LB:	Linfocitos B
LT:	Linfocitos T
IL-10R:	Receptor de Interleucina 10
IL-4R:	Receptor de Interleucina 4
IL-2R:	Receptor de Interleucina 2
pg:	Pico gramos
μ l:	Microlitros
ml:	Mililitros
rpm:	Revoluciones por minuto
INFs	Interferones
kD:	Kilodalton
TGF- β :	Factor de crecimiento transformador
LAK:	Células "killer" activadas por linfocinas
TNFR:	Receptor de TNF
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
CaCu:	Cáncer Cervicouterino
IFNR	Receptor de interferón
ADN	Acido dexosiribonucleico
A	Grupo control (sin tratamiento)
B	Inoculación de células B16F0
C	Inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos.
D	Inoculación de células B16F0 + IL-2 encapsulada liposomas catiónicos.