



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

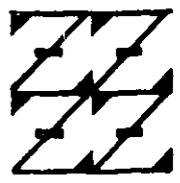
LABORATORIO DE ONCOLOGIA UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

"LAS LINEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CERVIX CALO E INBL SECRETAN LAS CITOCINAS IL-2, IL-3, E IL-6, EN LA FASE G1 DEL CICLO CELULAR, Y ESTAS CITOCINAS SON UTILIZADAS POR AMBAS LINEAS PARA INDUCIR SU PROLIFERACION"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BI O L O G O P R E S E N T A : TORRES GUARNEROS CARLOS FRANCISCO

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO ES DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA: M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

284502

MEXICO, D. F.

JUNIO DEL 2000



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.

EL PRESENTE TRABAJO FUÉ REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, DIRIGIDO POR LA M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA.

A Dios...

A mí me encanta Dios. Ha puesto orden en las galaxias y distribuye bien el tránsito en el camino de las hormigas. Y es tan juguetón y travieso que ha --
hecho frente al ataque de los antibióticos-- ¡ bacterias mutantes !

Viejo sabio o niño explorador, cuando deja de jugar con sus soldaditos de plomo o carne y hueso, hace campos de flores o pinta el cielo de manera increíble.

Mueve una mano y hace el mar, mueve otra y hace el bosque. Y cuando pasa por encima de nosotros quedan las nubes, pedazos de su aliento....

Dios siempre esta de buen humor. Por eso es el preferido de mis padres, el escogido de mis hijos, el más cercano de mis hermanos, la mujer más amada, el perrito y la pulga, la piedra más antigua el pétalo más tierno, el aroma más dulce, la noche insondable, el borboteo de luz, el manantial que soy.

A mí me gusta, a mí me encanta Dios. Que Dios bendiga a Dios...

SABINES

DEDICADA

A mi madre:

Clemencia Guarneros por su amor, fé en mí, su gran liderazgo, fuerza para seguir adelante y por mostrarme el camino del éxito...

A mi esposa:

Hirán por su compañía, cariño y apoyo incondicional. La amo...

A mis hijos:

Greco† y Yanco porque son la razón de mi vida, trabajo y superación constante.

A mis hermanos:

Ana María por su apoyo total a toda la familia...

Jorge por su espíritu de superación, sin límites...

Mario Ricardo por su constante lucha...

Sara por su inmenso cariño...

Bernabé por su invaluable apoyo y por buscar el éxito...

Juan José por su entusiasmo frente a la vida...

Mónica por su continua superación...

Sergio por su don de hermano...

A mi familia:

Aurelio, Aurelio hijo, Jessica, Berenice, Ricardo Isaac, Miroslava, Ernesto, Eric, Eduardo, Adriana, Karla, Alan, Arianna, Alma, Juan David, Karen, César, Marco Antonio, Marco Francisco...

A mis amigos del laboratorio y a todas las personas con quienes disfruto la vida... A.A.

De una manera especial de alma y corazón adentro quiero agradecer a la familia Torres Martínez por todo el apoyo, confianza y paciencia que me brindaron.
De igual manera le agradezco a Sergio por su infinito apoyo.
Ya que hicieron posible para mí este sueño...

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la M. en C. Rosalva Rangel Corona por su apoyo incondicional en momentos difíciles, por su dirección, consejos y sugerencias que han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Doctor Benny Weiss Steider por compartir conmigo algo de su sabiduría.

M. C. Raúl Zavala Chavero por sus sugerencias que enriquecieron este trabajo.

M. en C. Enrique Mendieta Márquez por su acertados comentarios y observaciones.

Dra. Isabel Soto Cruz por su asesoría, útiles y acertados comentarios y opiniones.

Al Biólogo Samuel Campos Lince por su asesoría en la parte estadística.

Al Sr. José Chavarria por su valiosa asistencia Técnica.

A todos ellos, Gracias.

ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	4
CICLO CELULAR	4
CÁNCER CÉRVICO-UTERINO	7
SISTEMA INMUNE	8
INMUNIDAD HUMORAL	10
INMUNIDAD CELULAR	10
RECEPTORES DE CÉLULAS T	11
ACTIVACIÓN DE CÉLULAS	12
CITOCINAS	12
INTERLEUCINAS IL-2, IL-3 e IL-6	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
CONCLUSIONES	63
SUGERENCIAS	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÉNDICES	74

RESUMEN

Las interleucinas (IL) juegan un papel muy importante en la respuesta inmune. Además, recientemente se ha destacado su importancia en la regulación de células no hematopoyéticas tanto normales como tumorales, controlando positiva o negativamente su proliferación. Asimismo, existen datos de que estas interleucinas también pueden ser secretadas por células tumorales, participando así en un sistema autócrino de proliferación. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó la posible presencia de IL-2, IL-3, e IL-6, en el medio condicionado de líneas celulares de cáncer de cérvix (CaCu) (CALO e INBL) utilizando anticuerpos monoclonales específicos, además de determinar su participación en la regulación de la proliferación.

Nuestros resultados indican que las células de CaCu (CALO e INBL) son capaces de secretar estas interleucinas, además de ser utilizadas para controlar positivamente su proliferación *in vitro*. Estos resultados proporcionan información acerca de la biología de este tipo de tumor y confirma que las células tumorales de CaCu pueden crear mecanismos para proliferar a expensas del organismo, en donde las células tumorales serían más eficientes para utilizar las citocinas secretadas por ellas mismas en un mecanismo autócrino de proliferación y además utilizar las citocinas de otro tipo celular por medio de un mecanismo parácrino de proliferación.

INTRODUCCIÓN

La biología molecular ha permitido el estudio minucioso del ciclo celular, el cual es de vital importancia para comprender las causas que desencadenan el carcinoma de cérvix (CaCu) que es un grave problema de salud en México (Lazcano *et al.*, 1996, Muñoz y Bosch, 1999) por ser la principal causa de muerte por neoplásia en las mujeres; dicha enfermedad es generada por una desregulación de la proliferación celular lo cual trae como consecuencia alteraciones del ciclo celular y no permite que éste se realice eficientemente. Además se sabe que el ciclo celular permite a las células proliferar, duplicar su material genético, segregar en dos juegos el material duplicado y dividirse para dar origen a dos células hijas (Murray y Hunt, 1993). El ciclo celular está dividido en cuatro fases: G₁, S, G₂ y M, así como de una fase fuera de ciclo denominada G₀, (De Robertis *et al.*, 1994, Zentella *et al.*, 1996). Estas fases del ciclo celular están mediadas por diversos tipos de secreciones celulares conocidas como citocinas entre las cuales se pueden mencionar a las interleucinas (IL), producidas por linfocitos. Estas son moléculas glucoprotéicas bioactivas sintetizadas por células linforeticulares y están involucradas en la modulación y coordinación de diversas funciones para las células del sistema inmune (Mizel, 1989; Abbas, *et al.*, 1994; Bell, 1998, Moller *et al.*, 1998). Tal es el caso de la Interleucina-2 (IL-2) llamada factor de crecimiento de células T (CTGF del inglés cell T growth factor), que es una glucoproteína de 14 a 17 kilodaltones (kDa), responsable de la progresión de linfocitos T desde G₁ hasta S en el ciclo celular, producida por células T CD4⁺, y en menor

cantidad por células T CD8⁺ activadas (Nakamura *et al.*, 1994, Hollingsworth *et al.*, 1996, Gómez *et al.*, 1998).

Asimismo, la Interleucina-3 (IL-3) es una glucoproteína de 20 a 27 kDa, producto de células T CD4⁺ activadas, células epiteliales tímicas, queratinocitos, células neuronales y células mieloides. La IL-3 sustenta el crecimiento y diferenciación de los primeros progenitores hematopoyéticos y de células mieloides (Bendtsen, 1994, Nair *et al.*, 1999). Finalmente la Interleucina-6 (IL-6) es una glucoproteína de 26 kDa sintetizada por fagocitosis mononuclear, células endoteliales, fibroblastos y otras células que responden a IL-1 y TNF (Factor necrótico tumoral- α). La IL-6 promueve el crecimiento de células epiteliales de cérvix tanto normales como neoplásicas (Abbas *et al.*, 1994, Billadeau *et al.*, 1997; Castrilli *et al.*, 1997, Song *et al.*, 1999).

Sabemos que la síntesis de estas citocinas se lleva a cabo en una fase en particular del ciclo celular y que a su vez pueden ser utilizadas en otra fase. En particular para CALO e INBL se han determinado las fases y la duración del ciclo celular 24 y 29 hrs respectivamente (Chávez, 1997). Debido a lo anterior, el presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar la secreción de IL-2, IL-3 e IL-6, en el medio condicionado (MC) de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL durante las diferentes fases del ciclo celular y en consecuencia poder determinar su participación sobre la proliferación de las mismas.

MARCO TEÓRICO.

CICLO CELULAR

El ciclo celular es una serie ordenada de procesos que permite a las células crecer, duplicar su material genético, segregarse en dos juegos de este material duplicado y dividirse para dar origen a dos células hijas (Murray y Hunter, 1993). En su versión mitótica el ciclo celular está dividido en cuatro fases: G₁, S, G₂ y M, así como de una fase fuera de ciclo denominada G₀ (Zentella *et al.*, 1996).

La mayor parte del trabajo necesario para la preparación de la división celular se produce de una manera imperceptible al microscopio durante la fase del ciclo celular denominada "Interfase", por lo que resulta difícil establecer fases estrictas en la progresión de la célula en crecimiento durante ésta. Una excepción importante la constituye la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), en donde el material genético nuclear se replica constituyendo una etapa muy específica de la interfase llamada fase de "Síntesis de ADN" (fase S). La otra fase concreta del ciclo celular es la división celular, que incluye la división nuclear (cariocinesis) y la división citoplasmática (citocinesis), que se produce a continuación. La cariocinesis y la citocinesis en conjunto reciben el nombre de "Mitosis" (fase M). Queda por lo tanto, el período comprendido entre la fase M y el comienzo de la síntesis de ADN, que recibe el nombre de G₁ (del inglés Gap, separación), y el período comprendido entre el final de la síntesis de ADN y la fase M siguiente, que recibe el nombre de fase G. Por consiguiente la interfase está compuesta por sucesivas fases

G₁, S y G₂M, y normalmente abarca un 90% o más del tiempo total del ciclo celular (Heyworth *et al.*, 1990, De Robertis *et al.*, 1994).

Generalmente cuando las células se encuentran en estado quiescente en el que no proliferan (fase G₀), el contenido de ADN celular permanece sin modificación, el tamaño celular disminuye, las proteínas y ácido ribonucleico (ARN) son degradados rápidamente y no son resintetizados con prontitud, además que las actividades enzimáticas y de transporte disminuyen. Estas características hacen una notable distinción entre las fases G₀ y G₁ del ciclo celular (Hunter, 1993).

La fase G₁, comprendida entre la mitosis y la síntesis de ADN, incluye una importante serie de eventos en los que la mayoría de los factores mitogénicos e inhibidores de crecimiento pueden ejercer sus efectos; en esta fase las células requieren un metabolismo extra, y por ello algunos autores la han subdividido en cuatro fases que se describen a continuación.

La primera subfase, denominada de Competencia (C), está caracterizada por cambios en la estructura de la cromatina, incremento en el transporte de nutrientes a través de la membrana, así como la producción de nuevo ácido ribonucleico mensajero (ARNm).

La siguiente, es la subfase de Entrada (G_{1a}); en ella se lleva a cabo la síntesis de algunas nuevas macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), así como el incremento de enzimas glicolíticas y polisomas.

La subfase de Progresión (G_{1b}) se caracteriza por una elevada síntesis de proteínas, por lo que demuestra una alta sensibilidad a inhibidores o estimuladores de la misma (Pardee, 1989); esta subfase de G_1 también es conocida como Punto de Restricción (R), y sólo puede terminar si se logra acumular una mínima cantidad esencial de cierta proteína de disparo (denominada también proteína U, del inglés "unstable protein"). Esta proteína hipotética sólo alcanzará una concentración elevada cuando se sintetiza con relativa rapidez, y su concentración disminuirá bruscamente durante la fase de mitosis (De Robertis *et. al*, 1994).

Cuando la célula ha logrado cruzar el punto R, entra a la última fase de G_1 (G_{1c}), o Ensamblaje, en donde se da un movimiento de enzimas dentro del núcleo y su organización, que forma parte de un complejo que cataliza la síntesis que se requerirá dentro de poco tiempo (Pardee, 1989). El comprender este ciclo celular es de vital importancia para estudiar los procesos de diferenciación y proliferación celular que cuando son alterados pueden conducir a una transformación neoplásica llamada cáncer.

CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

Hay diferentes tipos de cáncer: de pulmón, mama, colo-rectal, melanoma por citar algunos; debido a la problemática que se origina en nuestro país, nos avocaremos al estudio del cáncer cervico-uterino (CaCu). El CaCu es considerado en México como un problema de salud pública, ya que es una de las principales causas de muerte entre las mujeres mexicanas, registrándose más de 4,000 muertes anuales por esta enfermedad (Lazcano et al., 1996). A pesar de los programas de detección implementados, la incidencia de nuevos casos es muy alta debido principalmente a que las mujeres acuden tardamente al médico y el tumor es detectado en estadios avanzados (Lynch y Houghton, 1993, Lazcano et al., 1996).

En la actualidad se han incrementado los avances en las investigaciones en el campo epidemiológico del cáncer cervico-uterino, lo cual ha llevado a la aparición de nuevas hipótesis acerca de su etiología. El cáncer de cérvix tiene un origen multifactorial, en el cual los más importantes factores de riesgo, propuestos o establecidos, indican que está asociado con el uso de tabaco, multiparidad, inicio de relaciones sexuales a temprana edad, higiene genital deficiente, amplio número de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales, dieta deficiente en frutas y vegetales, bajo consumo de vitamina C, β -carotenos y folatos. Asimismo, se ha detectado que el CaCu está asociado estrechamente con una etiología viral en particular con el papillomavirus (Kube et al 1994, González et. al, 1995), el Herpevirus y en menor grado el citomegalovirus. De más de 80 subtipos de Papillomavirus Humano (HPV), alrededor de 20 de ellos se asocian con infecciones

genitales, encontrándose con mayor frecuencia los tipos 16 y 18 que inducen transformación de células epiteliales de cérvix a cáncer *in situ* denominadas NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) e invasor. (Brinton, 1992; Deisseroth, 1995, Pontén, 1995).

Debido a la fuerte asociación del carcinoma de cérvix con el HPV se esperaría que el virus fuera lo suficientemente fuerte para despertar una respuesta inmune de rechazo, como sucede con las células infectadas con el virus de la influenza; sin embargo, el tumor llega a estadios muy avanzados, lo cual hace pensar que el sistema inmune del huésped puede estar dañado.

SISTEMA INMUNE

Las células y las moléculas responsables de la inmunidad y su respuesta ante una sustancia extraña constituyen el sistema inmune. Existen principalmente dos mecanismos inmunológicos para defender al organismo del ataque de microbios, virus, células transformadas y otros agentes extraños: El primero es conocido como inmunidad innata, que constituye la primera línea de defensa del organismo y en ella participan células fagocitarias como macrófagos, monocitos, neutrófilos y células asesinas naturales (NK); estos tipos celulares destruyen antígenos y células tumorales de manera inespecífica mediante la lisis (citólisis) o inhibición del crecimiento (citotaxis) (Evans *et al.*, 1993, Kagi *et al.*, 1995, Post, 1996, Vassiliadis *et al.*, 1998). El segundo mecanismo es la inmunidad adquirida o específica que es un componente de un sistema integrado de alta defensa en la

cual numerosas células como los linfocitos T y moléculas de membrana funcionan cooperativamente para lisar las células blanco. En esta respuesta se utilizan mecanismos de la inmunidad natural o innata que son necesarios para eliminar invasores externos y tienen además dos propiedades adicionales de importancia:

- a) Memorizar cada encuentro con microbios o antígenos externos, de tal manera que el subsecuente encuentro estimula los mecanismos de defensa altamente efectivos inducidos por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y linfocitos T del fenotipo CD45RO.
- b) La respuesta inmune específica amplía los mecanismos protectores de la inmunidad natural, directos o enfocados éstos a los sitios de entrada de los antígenos que son capaces de eliminar.

La respuesta inmune específica se divide en dos tipos la humoral y la celular, de acuerdo a las células que en ella participan. (Ortiz, 1987; Benacerraf y Unanue, 1990; Abbas *et al.*, 1994).

INMUNIDAD HUMORAL

Esta inmunidad es mediada por linfocitos B, que defienden al organismo de microorganismos extracelulares como infecciones bacteriales y actúan por medio de proteínas secretadas por células B diferenciadas a células plasmáticas, conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), las cuales se encuentran en el plasma sanguíneo y son capaces de identificar y unirse a marcadores específicos de las células blanco para que sean reconocidas y eliminadas (Abbas *et al.*, 1994, Muraguchi *et al.*, 1998).

INMUNIDAD CELULAR

El segundo tipo de respuesta inmune específica, defiende al organismo del ataque de hongos, parásitos, infecciones virales y células transformadas. En esta fase los linfocitos T son los encargados de llevar a cabo el reconocimiento y eliminación de las células blanco, mediante la secreción de citocinas como interferón gama (INF- γ) y TNF- α (Steinbach *et al* 1993, Abbas *et al.*, 1994 Stock *et al.*, 1998, Svenson *et al.*, 1998).

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

-
- A) Fase de reconocimiento: consiste en el reconocimiento por unión de agentes externos a receptores específicos, en linfocitos maduros.
- B) Fase de activación: es la secuencia de eventos inducidos en linfocitos como consecuencia de reconocimiento específico del antígeno, que produce la expansión clonal de linfocitos específicos dirigidos contra el antígeno.
- C) Fase efectora de la respuesta inmune: los linfocitos T han sido específicamente activados para eliminar a los antígenos que despertaron la respuesta inmune (Abbas *et al.*, 1994).

RECEPTORES DE CÉLULAS T

El receptor para células T es un complejo constituido por las cadenas α y β , las cuales están asociadas no covalentemente con la molécula CD3 compuesta por las proteínas γ , δ y ϵ y un homodímero ζ y ζ ó heterodímero ζ y η . Este complejo TcR-CD3 es el responsable del reconocimiento específico por parte de los linfocitos T. Algunas de las proteínas del complejo regulan la unión específica a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) presentes en células presentadoras de antígenos o células blanco. Las células T expresan otras proteínas de superficie celular las cuales son denominadas moléculas accesorias para el reconocimiento, activación y lisis. (Abbas *et al.*, 1994).

ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T

Involucra un aumento de su receptor en la superficie celular y la transmisión de una señal dependiente de calcio al núcleo (Troye-Blomberg *et al.*, 1999). Esta señal activa la transcripción de varios genes iniciando la diferenciación, proliferación y secreción de citocinas (López 1997, Stock *et al.*, 1998). Aunque la clásica activación de las células T requiere la presencia de antígenos que participan en la inmunidad adquirida e innata, éste proceso también requiere y genera citocinas. Las células T activadas progresan automáticamente a través de varios cambios morfológicos que son detectados después de las 12 hrs de activación (Meager, 1991, Lissoni *et al.*, 1994, Lauwery *et al.*, 1999, Leclerc 1999).

CITOCINAS

Precisamente las células o linfocitos T producen diferentes citocinas que sirven principalmente para regular la activación, crecimiento y diferenciación de distintas poblaciones celulares (Oettgen, 1991, Gotlieb *et al.*, 1994, Iseki *et al.*, 1995). Otras citocinas derivadas de células T activan y regulan células inflamatorias, tales como fagocitos mononucleares, neutrófilos y eosinófilos (Huang *et al.*, 1995, Coveney *et al.*, 1996, Clary *et al.*, 1997, Alexandroff *et al.*, 1995). Dentro de las propiedades generales de las citocinas se encuentra la regulación de la división celular, el control del crecimiento y la diferenciación de linfocitos estimulados, la modulación de la inmunidad natural; participación en respuestas inflamatorias no específicas además de la estimulación del

crecimiento y la diferenciación de células inmaduras (Bendtzen 1994, Tahara,1994 Armitage *et al.*, 1995, Douglas, *et. al.*, 1997, Pastore *et al.*, 1998). Entre las citocinas se encuentran las producidas por linfocitos denominadas interleucinas (IL), moléculas glucoprotéicas bioactivas que son sintetizadas por células linforeticulares y están involucradas en la modulación y coordinación de una variedad de funciones para diferentes tipos celulares del sistema inmune (Mizel, 1989, Azimi 1999, Andrzejewska y Niewiadomska 2000).

INTERLEUCINAS

A continuación se describen algunas interleucinas de interés en la respuesta inmune por su acción sobre linajes no hematopoyéticos (Yanase *et al.*, 1995, Terranova y Rice, 1997).

Interleucina-2.

La interleucina-2 (IL-2) originalmente llamada factor de crecimiento de células T (CTGF), es la principal citocina responsable para la progresión de linfocitos T desde G1 hasta S en el ciclo celular. La IL-2 es producida por células T CD4⁺, y en menor cantidad por células T CD8 (Landgraf *et al.*,1992, Khanna *et al* 1997). La IL-2 actúa sobre distintos tipos celulares y entre otras funciones ejerce un efecto de crecimiento autócrino pero también parácrino y sinérgico (Carson *et al.*, 1994, Nakamura *et.al.*, 1994, Euhus *et al* 1997, Lorenz *et a.,l* 1997).

La IL-2 es una glucoproteína de 14 a 17 kDa. La heterogeneidad del peso en la proteína se debe a la variación en la glucosilación de los residuos polipeptídicos. Normalmente IL-2 es transcrita, sintetizada y secretada por células T activadas por antígenos. Las principales acciones de IL-2 son sobre los linfocitos (Soto *et al.*, 1999). La IL-2 es un determinante importante de la respuesta inmune, y puede estimular una segunda síntesis de IL-2 por células T activadas, su secreción ocurre cerca de las 24 horas después de la activación inicial. IL-2 también estimula la síntesis de otras citocinas derivadas de células T tales como interferón gamma (IFN- γ) y linfoquinas (LT), IL-3, e IL-6 (Nelson, *et al.*, 1994, Gómez *et al.*, 1998, Nilsen *et al.*, 1998).

La acción de IL-2 es mediada por la unión de esta a su receptor (RIL-2). Este sistema quizá es el mejor comprendido de todos los receptores de citocinas (Taniguchi *et al.*, 1993, Kaplan, 1996, Shih-Chung *et al.*, 1997). El receptor está compuesto por tres sub-unidades, la primera de 55kDa (p55) está presente sobre células T activadas y por eso llamada antígeno Tac (para activación T). El Tac p55 o cadena α une IL-2 con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M (Hamblin 1993.; Guarini *et al.* 1997). La unión de IL-2 a células que expresan solamente p55 no genera alguna respuesta biológica detectable, la segunda proteína que se une es identificada como una proteína de 70 a 75 kDa (p70 o p75) denominada cadena β , cuya afinidad de unión a IL-2 es de aproximadamente 10^{-9} M y la tercera unidad es la cadena γ del receptor que es una proteína de 64 kDa que al unirse con p55 y p75 pueden asociar a IL-2 con alta afinidad con una K_d de aproximadamente 10^{-11}

(Taniguchi y Minami, 1993, McMillan, *et. al.*,1995, Moya *et al.*, 1999). Se cuenta con reportes de que las células de CaCu de líneas CALO e INBL expresan las cadenas α , β y γ del receptor para IL-2 (Alvarado, 1997).

La IL-2 estimula el crecimiento de células NK y aumenta otras funciones citolíticas, produciendo en ellas células linfoides activadas para matar (LAK). Tanto las células NK, como las células T, expresan la p75 y son estimuladas por altos niveles de IL-2, las células NK, sin embargo, no expresan p55 y es por ello que no reducen su requerimiento de IL-2 después de ser activadas. Por esta razón, solamente en altas concentraciones de IL-2 se puede conducir a la formación de células LAK. Las células LAK son generadas *in vitro* para uso en inmunoterapia (Aggarwal y Gutterman, 1992). La IL-2 actúa sobre células B humanas estimulando la síntesis de anticuerpos (Hsu *et al.*, 1997).

Interleucina- 3.

La Interleucina-3 (IL-3) es una glucoproteína de 20 a 27 kDa producto de células T CD4⁺ activadas, células epiteliales tímicas, queratinocitos, células neuronales y células mieloides (Bendtzen, 1994). La IL-3 apoya el crecimiento y diferenciación de los primeros progenitores hematopoyéticos y de células mieloides (Takahasi *et al.*,1995). Además, pacientes con funcionamiento de médula ósea normal, así como pacientes con terapias asociadas a la mielosupresión, muestran un incremento en los linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas y algunos reticulocitos en respuesta al tratamiento con IL-

3, y efectos similares se observan en pacientes con síndromes mielodisplásicos (Reed *et al* 1993, Mizuno *et al* 1994).

La IL-3 estimula la hematopoyesis *in vivo* y prolonga la sobrevivencia de las células mieloides de las mucosas. La IL-3 induce el desarrollo de células maduras como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos (Heyworth, *et al.*, 1990). La IL-3 acelera la maduración de los primeros precursores a un estado que responden al factor estimulante de colonias macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y al factor estimulante de colonias y granulocitos (G-CSF) (Oettgen, 1991). IL-3 también promueve el crecimiento y desarrollo de una línea celular de progenitores de médula espinal, cuya función se incrementa por IL-4. En ratón, IL-3 es producida por células T auxiliares CD4⁺ que secretan IL-2 (Hamblin, 1993, Sato *et al.*, 1999).

El receptor para IL-3 (IL-3R) consta de dos subunidades que son miembros de la superfamilia de receptores de hematopoyetina; la primera subunidad del receptor para IL-3 es una cadena α que une a la IL-3 específicamente, y la segunda subunidad del receptor es una cadena β que le confiere alta afinidad (Hamblin, 1993). En humanos, la IL-3 ha sido identificada por el ADN complementario (cADN), de una molécula homóloga para IL-3 de ratón. No obstante, IL-3 es sintetizada por algunos clones de células T humanas. La IL-3 de ratón ejerce su efecto sobre granulocitos y macrófagos humanos (Abbas.*et. al*, 1994, Bukowski *et al.*, 1996).

Interleucina-6.

La Interleucina-6 (IL-6) es una citocina de aproximadamente 26 kDa sintetizada por fagocitos mono-nucleares, células endoteliales, fibroblastos y otras células que responden a IL-1 y TNF- α (Factor necrótico tumoral- α) (Takizawa *et al.*, 1993, Watson *et al.* 1993). Ella también es producida por células T activadas e induce la maduración de células B, y puede ser detectada en la circulación después de una infección por bacterias Gram negativo y es secretada en respuesta a TNF- α , IL-1 y por linfocitos de sangre periférica (Moradi *et al.* 1993, Moriyama *et al.*, 1996, Jelinek *et al.*, 1997).

Una gran variedad de tumores malignos en donde se incluye células escamosas de carcinoma y adenocarcinoma han mostrado sintetizar IL-6. El receptor para IL-6 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y actúa sobre hepatocitos y células B (Offner *et al.*, 1995).

La IL-6 estimula hepatocitos para sintetizar varias proteínas plasmáticas, tales como fibrinógeno, que actúa en la fase de respuesta aguda. Sirve como principal factor de crecimiento para la diferenciación de células B (Danforth y Sgagias, 1993, Zhang *et al.*, 1994, Blais *et al.*, 1995). IL-6 actúa como un factor de crecimiento para varios tipos de células plasmáticas malignas (plasmacitomas o melanomas) que crecen autónomamente ya que éstas secretan IL-6 como un factor de crecimiento autócrino y pueden aumentar o inhibir la proliferación de células de carcinoma. En carcinomas genitourinarios la IL-6 actúa como un factor de crecimiento para células de carcinomas renales, por lo cual

aumenta la carcinogénesis *in vitro*. Actúa también como un factor de crecimiento autócrino sobre las líneas celulares de próstata DU154 y PC3 (Okamoto *et al.*, 1997).

El receptor para IL-6 (IL-6R) se encuentra sobre células de origen linfoide pero también no linfoide, no obstante que la expresión puede depender del grado de diferenciación o activación de las células; por ejemplo las células B latentes normales no expresan el receptor para IL-6, mientras que los blastos activados sí expresan el receptor para IL-6 (Oh *et. al.*, 1996, Rougier *et al.*, 1998).

El IL-6R consta de dos cadenas, una cadena α de peso molecular de 80 kDa y una cadena β de 130 kDa (Muraguchi *et.al.*,1998). La cadena α ha sido caracterizada como miembro de la familia de receptores de hematopoyetina, con una región amino terminal característica de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El dominio intracelular es pequeño. En contraste con la cadena β que es un miembro de la familia de receptores de hematopoyetina, tiene un gran dominio intracelular que esta involucrado en la señalización (Hamblin. 1993).

La IL-6 promueve el crecimiento de células epiteliales de cérvix tanto normales como neoplásicas (Castrilli, *et.al.*, 1997). La IL-6 puede promover el crecimiento de células somáticas híbridas producidas por fusión de células B normales con células plasmocitomas, el "hibridoma" que produce anticuerpos monoclonales. La IL-6 puede estimular células T, timocitos, y también actúa como un cofactor con otras citocinas para estimular el crecimiento de células madre o tallo hematopoyéticas (Abbas *et. al.*, 1994.,Billadeau *et al* 1997).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el cáncer cérvico-uterino (CaCu) ocupa el primer lugar dentro de las neoplasias malignas en la mujer. Su incidencia es mayor en grupos con capacidades económicamente reducidas y de áreas suburbanas. A pesar de las campañas de detección oportuna, el diagnóstico se establece con alta frecuencia en estadios avanzados, por lo cual constituye un problema de salud pública; su frecuencia ascendente revela la necesidad de ampliar la cobertura de los programas nacionales de prevención y detección oportuna (Culver, 1994). La edad de las pacientes con esta neoplasia aparentemente se encuentra en descenso, ya que se diagnostica cáncer de cérvix en mujeres cada vez más jóvenes aumentando su mortalidad en este grupo. Con respecto a esto, se ha sugerido que las neoplasias que ocurren en el grupo de mujeres jóvenes difieren en tipo histológico y comportamiento biológico de las lesiones desarrolladas en mujeres postmenopáusicas (Lazcano *et al.*, 1996, Bell, 1998). Entre los factores de riesgo para el desarrollo de CaCu se encuentran la edad que fluctúa entre los 35 a 70 años, inicio de relaciones sexuales a temprana edad, promiscuidad sexual, higiene genital deficiente (incluyendo a la pareja sexual), uso de anticonceptivos orales, consumo de tabaco, deficiencias nutricionales e infecciones ginecológicas frecuentes, así como una multiparidad. A pesar de todos estos factores, el CaCu es una enfermedad progresiva que se inicia con lesiones denominadas displasias, que responden al tratamiento médico de primer nivel de atención en un 85% de los casos; una vez que el cáncer inicia, (cáncer *in situ*), le toma de 10 a 20 años para convertirse en cáncer invasor.

Sin embargo, no se tiene la información clara acerca de los mecanismos de escape inmunológico que presentan este tipo de células (Culver, 1994). Se plantea que puedan secretar factores inhibidores de la proliferación y activación de linfocitos de sangre periférica (LSP) e incluso que puedan competir por factores de crecimiento y diferenciación de células efectoras tales como la IL-2, IL-3 e IL-6.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se ha demostrado que algunos tumores sólidos (cabeza y cuello, mama, pulmón, colon-renal y melanoma) expresan el receptor para citocinas como la IL-2, que al unirse a su ligando controla positiva o negativamente la proliferación de las células tumorales (Evans *et al.*, 1993, Andrzejewska *et al.*, 2000). También se ha confirmado que líneas celulares obtenidas de estos tumores producen citocinas que les permite tener un crecimiento autócrino, como es el caso de la línea M14 de melanoma, que produce IL-2 (Hollingsworth *et al.*, 1996). Asimismo, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el carcinoma cérvico-uterino expresa las cadenas α , β , y γ del receptor para IL-2, y que éste responde a bajas concentraciones de IL-2 (Alvarado 1997). Esto datos, nos hace pensar que las células tumorales pueden competir con los linfocitos por la IL-2 como un posible mecanismo de escape inmunológico, en donde las células tumorales serían más eficientes en utilizar la citocina, porque requieren de una concentración diez veces menor que los linfocitos para proliferar.

Sin embargo, aún no sabemos si estas células además de expresar RIL-2, son capaces de sintetizar IL-2 funcional como sucede en el melanoma; esta suposición se basa en el hecho de que al privar a las células de CaCu de suero no mueren, permaneciendo quiescentes y al agregar medio fresco con suero reinician su proliferación. Esta evidencia nos hace pensar que las células tumorales sintetizan sus propios factores de crecimiento entre los que se podría encontrar la IL-2, que para ellas es un factor mitogénico, así como otras citocinas como IL-3, e IL-6 que se ha reportado son sintetizadas por otro tipo de

tumores (Castrilli *et al.*, 1997, Kawakami *et al.*, 1997, Azimi 1999). Por esta razón, la posibilidad de que las células de carcinoma de cérvix sinteticen citocinas no puede ser descartada y el presente trabajo tiene la finalidad de determinar, en el medio condicionado de dos líneas celulares de carcinoma cervico-uterino, la presencia de IL-2, IL-3, e IL-6, así como evaluar el efecto proliferador de estas citocinas, ya que pudieran favorecer su proliferación como sucede con otros tumores. De confirmarse la producción de citocinas, propias de células hematopoyéticas y su efecto sobre la proliferación en células tumorales estaríamos en condiciones de proponer otro mecanismo de escape inmunológico para este tipo de carcinoma, ya que las células de CaCu podrían utilizar a la IL-2, IL-3 e IL-6 u otra citocina sintetizada por células inmunocompetentes para proliferar, pero en ausencia de ella tendrían la capacidad de secretarla para su autoconsumo. Esto nos hablaría de un mecanismo autócrino de proliferación que podría hacer dependientes de IL-2, IL-3 e IL-6 a las células de CaCu durante su progresión. Por otro lado, si confirmamos dicha dependencia por IL-2, IL-3 e IL-6 u otra citocina, se contaría con una herramienta para detener el crecimiento del tumor por medio de la aplicación *in situ*, de antagonistas de la (s) citocina (s) para bloquear los receptores para ésta (s) e impedir que la unión a su receptor induzca la proliferación de las células de CaCu, lo que permitiría la acumulación de la (s) citocinas que induciría la generación de linfocitos citotóxicos específicos contra las células tumorales.

Finalmente, mencionaremos que trabajamos con el modelo de CaCu por que es la primer causa de muerte por neoplasia entre las mujeres mexicanas (Muñoz y Bosch 1999), con grandes repercusiones a nivel social (Deisseroth 1995, Werness, 1995, Bell 1998). Por ello surge la necesidad de investigar los mecanismos de evasión que presenta este tumor, a nivel celular, para proporcionar conocimientos básicos sobre su biología que permitan elaborar nuevas estrategias terapéuticas (Muñoz y Bosch 1999, Sirota *et al.*, 1999).

HIPÓTESIS

Es conocido que algunos tumores sólidos expresan receptores para citocinas como la IL-2, IL-4 e IL-6 que pueden inducir o inhibir su proliferación al unirse a su ligando. Por otro lado, existen datos de que indican que estos tumores son capaces de producir algunos factores de crecimiento hematopoyético como es el caso de la línea de melanoma M14 que produce IL-2, y ciertos linfomas que sintetizan IL-4. La producción de citocinas se lleva a cabo en una fase en particular del ciclo celular y pueden tener efecto en otros tipos celulares. Recientemente nuestro grupo de trabajo ha confirmado que las células de carcinoma de cérvix expresan la subunidad α β y γ del receptor para IL-2 y que este es funcional ya que las células proliferan a bajas concentraciones de IL-2. Asimismo, contamos con datos que sugieren que las células de CaCu podrían estar secretando y utilizando de manera autócrina, factores de crecimiento como IL-2, IL-3, e IL-6, por tanto, al utilizar anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas citocinas, IL-2, IL-3, e IL-6, podremos determinar la presencia de éstas en el medio condicionado (MC) y correlacionarlas con la fase del ciclo celular que ya han sido determinadas para CALO e INBL. Finalmente al emplear medio condicionado de ambas líneas como fuente de citocinas se espera inducir la proliferación de ambas líneas celulares.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la secreción de IL-2, IL-3 e IL-6, en los medios condicionados de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL y correlacionarlo con su ciclo celular así como evaluar su efecto sobre la proliferación de ambas líneas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Proliferar líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL.
2. Sincronizar líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL.
3. Colectar medio condicionado de las líneas celulares a diferentes tiempos durante dos ciclos para CALO (24 hrs) y para INBL (29 hrs).
4. Determinar por el método de ELISA la presencia de IL-2, IL-3 e IL-6, en el medio condicionado de las líneas celulares CALO e INBL.
5. Correlacionar la secreción de citocinas con las fases del ciclo celular para cada línea.
6. Concentrar los medios condicionados de diferentes tiempos.
7. Evaluar el efecto de los medios condicionados concentrados de estas líneas sobre la proliferación de las mismas células.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Líneas celulares de CaCu, CALO estadio clínico IIB e INBL estadio clínico IVB metastásico, criopreservadas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U.N.A.M. fueron utilizadas. Los medios condicionados (MC) obtenidos de estas líneas celulares se guardaron en tubos de plástico de 50 ml y Eppendorf de 2 ml de capacidad (Falcon, U.S.A). Además se utilizaron Interleucinas recombinantes humanas rhIL-2 10 ng/ml, rhIL-3 24 ng/ml e rhIL-6 9.1 ng/ml (Lakeside Boehringer U.S.A.), que son las concentraciones óptimas para inducir proliferación, y anticuerpos monoclonales anti-humano IL-2, IL-3 e IL-6 (R & D Systems, Inc. U.S.A.).

CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos se realizaron utilizando el medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. U.S.A) como medio de cultivo (Apéndice1), suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB) (Hyclone, U.S.A.), previamente desactivado, como antibiótico se adicionó penicilina 1000 U/ml y estreptomina 1 mg/ml (Apéndice2), se mantuvieron en una incubadora (Form Scientific, Division of Mallinckrodt, Inc U.S.A.) a 37°C, pH de 7.0-7.2 y con una atmósfera húmeda saturante al 5% de CO₂ (Freshney, 1991). La densidad de las células tumorales fueron calculadas por conteo en cámaras de Neubauer (American

Optical,U.S.A) y su viabilidad fue evaluada por exclusión con azul de tripano (Sigma Chemical, Co. U.S.A.)(Apéndice3).

CRIOPRESERVACIÓN

Con el fin de tener células tumorales disponibles para subsecuentes experimentos, se utilizó la técnica de criopreservación, la cual consistió en utilizar las células en fase exponencial, sin llegar a la saturación, las cuales fueron removidas de la superficie de la caja de cultivo con solución salina de verseno (Apéndice 4) mediante pipeteo, después se procedió a lavar el botón celular con medio de cultivo RPMI, finalmente éste fue resuspendido en medio para congelación el cual consistió en el caso de células tumorales de 10% de SFB y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co. U.S.A.), en medio de cultivo. Las células se repartieron en pequeñas ampolletas (Cooke Laboratory Products, U.S.A), de 1 ml y se congelaron inicialmente a -70°C durante un periodo de 24-72 hrs para posteriormente ser introducidas en nitrógeno líquido a -190°C para su preservación indefinida.

Para descongelar las células se sacaron las ampolletas del nitrógeno y se mantuvieron a temperatura ambiente por algunos minutos para ser descongeladas y antes de estar totalmente líquidas fueron centrifugadas a 500 gravedades (g) por 5 minutos, el sobrenadante se desechó y posteriormente el botón celular se lavó dos veces con RPMI para eliminar residuos de DMSO. Después de esto, las células fueron cultivadas en medio de cultivo fresco suplementado.

OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

A DIFERENTES HORAS.

Para obtener el medio condicionado de las líneas celulares CALO e INBL, 1.5×10^6 y 5×10^5 células fueron cultivadas en 5ml por caja a diferentes tiempos (horas y días) adicionando RPMI al 10 % de SFB, una vez transcurridos los tiempos planteados el medio condicionado fue colectado y centrifugado para eliminar las células y desechos; posteriormente éste se concentró 1.25 veces el volumen inicial en una membrana de amicon con poro de 30 kDa, y concentrado en un Speed Vac hasta secar completamente. El producto final fue resuspendido en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Apéndice 5) y dializado a través de membrana de diálisis con poro de 5 kDa (Spectrum Medical, U.S.A) en PBS durante tres días con cambios de solución cada 24 hrs. El medio condicionado obtenido finalmente fue esterilizado a través de una membrana de 0.22μ . de poro. Posteriormente, para evaluar el porcentaje adecuado de medio condicionado concentrado (MCC) a utilizar con las líneas de cérvix, se realizaron cultivos en presencia de ILs recombinantes (control positivo) las cuales fueron evaluadas en su proliferación de acuerdo a su ciclo respectivo, utilizando la técnica colorimétrica de MTT Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (Sigma Chemical, Co. U.S.A), Y CRISTAL VIOLETA en el lector de placas ELISA (BIO-TEC Instrument.U.S.A), se leyeron los medios a una absorbancia de 570-630 nm.

CORRELACIONAR LAS FASES DEL CICLO CELULAR

Para determinar las fases del ciclo celular fue necesario sincronizar las células previamente. Se sembraron células de CaCu CALO e INBL (1.5×10^6 células por botella) en fase exponencial con medio de cultivo al 1% de SFB de 6 a 12 horas (sólo para permitir que se adhieran las células a la botella); después se retiró el medio y se agregó medio nuevo sin SFB, y se deja las células 24 horas en cultivo bajo estas condiciones. Finalmente se retiró el medio sin suero y se agregó medio al 10% de SFB y a partir de éste momento, se colectó el MC a los diferentes tiempos; para CALO se colectó el medio condicionado cada 2 horas y a las 10, 16 y 24 hrs que son los tiempos de las fases de G_1 , S, y G_2/M reportados para estas líneas. En la línea celular de INBL se colectó el MC cada 2 horas y a las 10, 16 y 29 hrs que son los tiempos de las fases G_1 , S, y G_2M reportados para esta línea celular (Chavéz 1997).

ENSAYO DE ELISA

Se agregaron 100 μ l de MC de las líneas celulares en 100 μ l de amortiguador de carbonatos, en el pozo de la inmunoplaaca y se incubó toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó con PBS-Tween al 0.1% cuatro veces, se bloquea con PBS-leche (leche descremada en polvo) al 2% y se incubó durante 1 hora a 37°C; nuevamente se lavó con PBS-Tween, posteriormente se agregó 10 μ l del anticuerpo primario incubando 1 $1/2$ horas a 37°C y se lavó con PBS-Tween, y posteriormente se agregó 100 μ l del anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y se incubó 1 hora a 37°C, lavando

nuevamente con PBS-Tween 0.1%. Finalmente se adicionaron 100µl de OPD (o-fenilendiamina) (Sigma Chemical, Co. U.S.A), se mantuvieron en oscuridad por 10 minutos, la reacción se detuvo con 25µl de H₂SO₄ 2.5 N y se leyó a 490 nm en lector de microplacas de ELISA (Coligan *et. al.*,1993).

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON CRISTAL VIOLETA

Se fijaron las células con Glutaraldehído al 1.1 % y se dejaron durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire el tiempo que sea necesario, pasado este tiempo se procedió a agregar el Cristal Violeta y se dejó 10 minutos en agitación se lavó nuevamente con agua destilada para quitar el exceso y se agregó Acido Acético al 10% se dejó en agitación 10 minutos, después de este tiempo la disolución del Cristal Violeta se leyó a 570-630 nm en el lector de placas ELISA.

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN POR LA TÉCNICA COLORIMÉTRICA (MTT). (Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio).

En esta técnica se mide la actividad de la mitocondria a través de la reducción del MTT a formazán, de esta forma la densidad óptica (D.O) es directamente proporcional a la proliferación celular. Para ello se sembraron células viables, después de 36 hrs de cultivo se desecho el sobrenadante y las células se incubaron durante tres horas con 50µl de bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) (Sigma Chemical, Co: U.S.A.).

El reactivo MTT enzimáticamente reducido a formazán (de color amarillo) por las células vivas fue extraído con 200 μ l de isopropanol (Sigma Chemical, Co. U.S.A), para disolver los cristales de formazán. Las placas fueron agitadas ligeramente durante 5 minutos, posteriormente se procedió a leer la solución obtenida a una absorbancia de 570-630 nm en el lector de ELISA (BIO-TEC Instrument U.S.A.). La concentración de citocinas se determinó utilizando un factor de conversión, partiendo de una concentración conocida en nanogramos y su correspondiente densidad óptica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales fueron sometidos a una prueba de hipótesis acerca de la diferencia de dos medias poblacionales. Esta prueba permite estimar la diferencia de dos medias poblacionales para compararlas. Supone una distribución normal de ambas poblaciones con medias μ_1 y μ_2 y varianzas σ_1^2 y σ_2^2 . Las muestras son aleatorias e independientes, de tamaño n_1 y n_2 . Cuando las desviaciones estandar poblacionales σ_1 y σ_2 se desconocen se agrega una suposición adicional para poder utilizar la distribución t de Student. Una prueba de igualdad de varianzas se llevó a cabo antes de estimar o probar una hipótesis acerca de la diferencia de medias, utilizando una prueba de Fisher (Marques, 1991) (Apéndice 6). En todas las pruebas de hipótesis se utilizó un nivel de significancia $\alpha= 0.05$, para determinar si existía diferencia significativa en la concentración de las citocinas entre ambas líneas celulares.

RESULTADOS

Con el propósito de determinar la secreción de citocinas por parte de las células de carcinoma de cérvix (CALO e INBL) se evaluó la concentración de cada citocina por medio de anticuerpos monoclonales específicos utilizando el método de ELISA. Los ensayos fueron realizados tres veces y por duplicado, usando como control positivo la citocina recombinante humana y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB.

Evaluación de la secreción de IL-2 de 3 a 15 días

Para determinar la secreción de citocinas se colectaron medios condicionados de las líneas CALO e INBL, a diferentes intervalos de tiempo (3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 días). En ambas líneas celulares se detectó la presencia de IL-2, obteniendo una mayor producción por parte de la línea INBL rebasando incluso al control positivo (10 ng/ml de IL-2 recombinante humana (rhIL-2)). A pesar de que la línea CALO mostró menor producción de citocina, con respecto a INBL, ésta superó la del control a lo largo del intervalo de tiempo evaluado con una ligera disminución al noveno día.(Fig.1, Tabla 1).

CONCENTRACION DE IL-2 vs TIEMPO EN DIAS

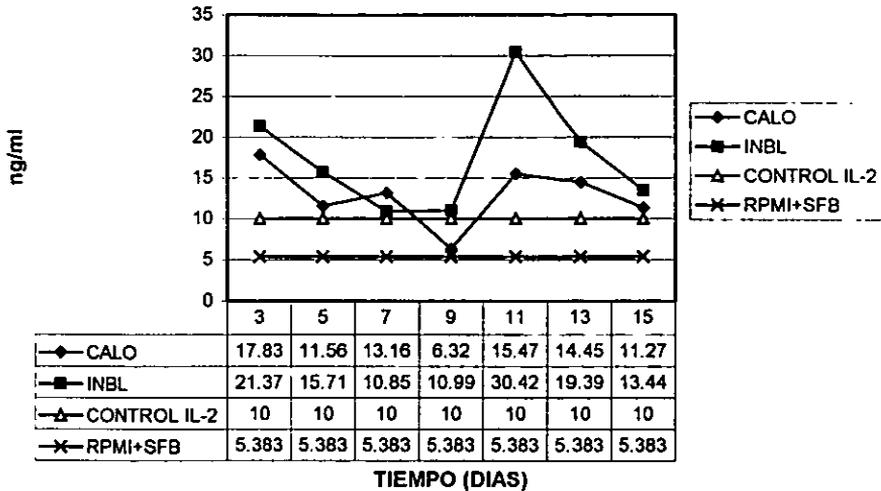


Figura 1. Presencia de IL-2 en el medio condicionado de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL. Se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10 % de SFB. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en nanogramos por mililitro (ng/ml). Se observa una concentración mayor de citocina para la línea de CaCu INBL, destacando al día 11 con 30.42 ng/ml. Se utilizó como control positivo 10 ng/ml de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

Evaluación de la secreción de IL-3 de 3 a 15 días

La evaluación del medio condicionado colectado nos indica una mayor concentración de citocina para la línea INBL con respecto a la del control e inclusive es mayor que la concentración de la línea CALO (Se utilizó como control positivo 24 ng/ml de rIL-3). Con respecto a la línea CALO se observa una concentración de citocina mayor a la del control y en algunos puntos mayor que INBL. (Fig. 2, Tabla 1).

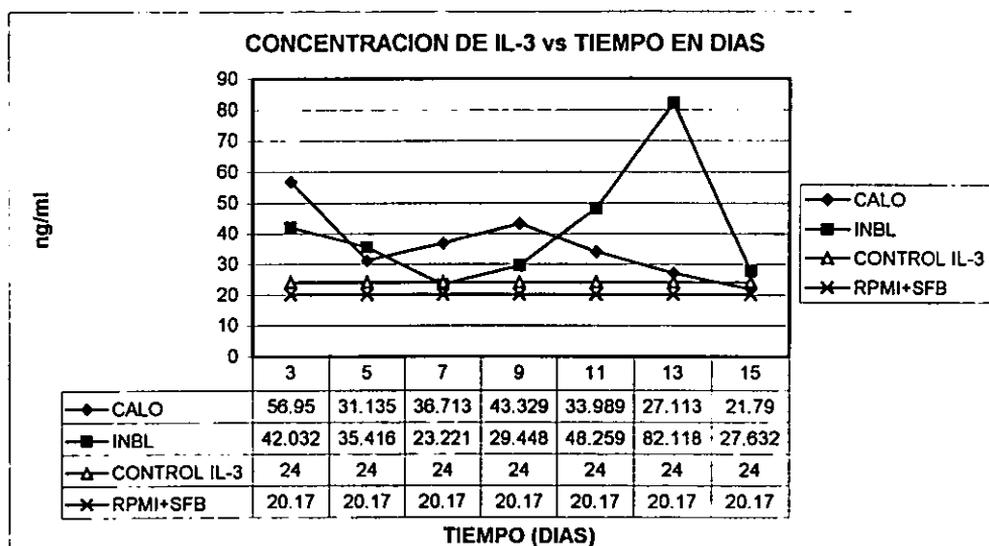


Figura 2. Presencia de IL-3 en el medio condicionado de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL. Se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10 % de SFB. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en ng/ml. Destaca la concentración de la citocina para la línea INBL al día 13 de 82.11 ng/ml. Se utilizó como control positivo 24 ng/ml de rIL-3 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

Evaluación de la secreción de IL-6 de 3 a 15 días

Los datos obtenidos para IL-6 indican que esta citocina también se encuentra presente en el medio condicionado de ambas líneas celulares, teniendo en el medio condicionado de la línea CALO la mayor concentración de esta citocina aunque los valores obtenidos son bajos (Se utilizó como control positivo 9.1 ng/ml de rhIL-6). Para la línea INBL se observa una concentración sin grandes variaciones, esta concentración de citocina es también baja. (Fig. 3, Tabla 1).

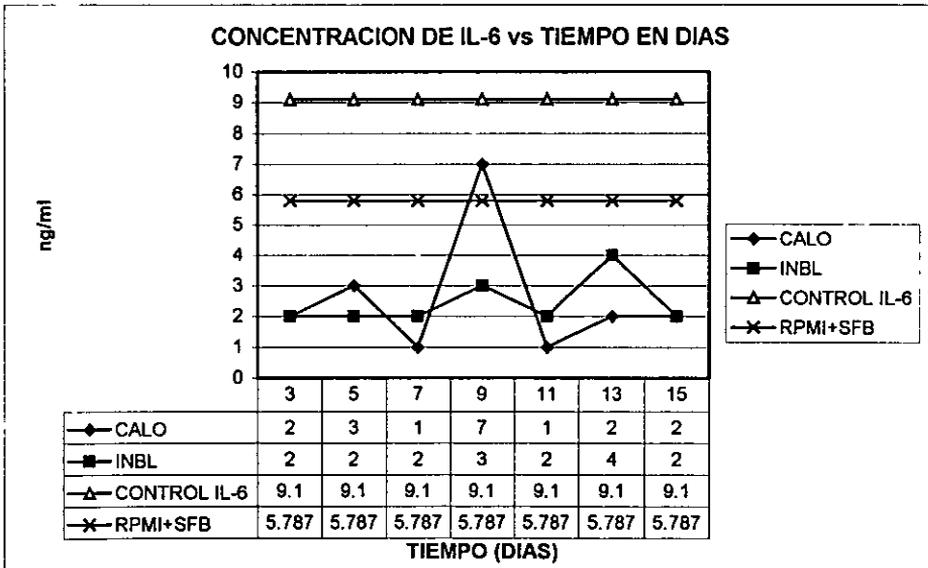


Figura 3. Presencia de IL-6 en el medio condicionado de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL. Se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10 % de SFB. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en ng/ml. La mayor concentración de esta citocina se presenta al día 9 con 7 ng/ml. Se utilizó como control positivo 9.1 ng/ml de rhIL-6 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

INTERLEUCINA (IL)	CALO (ng/ml)	INBL (ng/ml)
IL-2	6.33-17.83	10.85-30.42
IL-3	21.79-56.95	23.22-82.11
IL-6	1-7	2-4

Tabla 1. Rango de concentración de las citocinas detectadas en el medio condicionado de las líneas de CaCu CALO e INBL, evaluado a diferentes intervalos de tiempo (días).

Una vez confirmada la secreción de citocinas en las líneas celulares CALO e INBL y con el propósito de correlacionar en qué fase del ciclo celular se produce la mayor cantidad de citocina se procedió a colectar el medio condicionado de ambas líneas celulares cada 8 horas hasta completar dos ciclos. Para el caso de la línea CALO cuyo ciclo celular tiene una duración de 24 horas se procedió a colectar el medio condicionado a 8, 16, 24, 32, 40, y 48 horas. Para INBL la cual su ciclo celular tiene una duración de 29 horas se colectó el medio condicionado a 8, 16, 24, 32, 40, 48, y 56 horas.

Evaluación de la secreción de IL-2 de 8 a 56 horas

En ambas líneas celulares se detectó la presencia de IL-2, obteniendo tanto en INBL como en CALO con un aumento en la concentración de la citocina a las 24 horas, con una progresiva disminución de ésta a las siguientes horas y un nuevo aumento a las 48 horas. La cantidad de citocina evaluada para cada uno de los demás puntos fue similar en ambas líneas. Se observa para INBL una concentración de citocina mayor en todas las evaluaciones en comparación con la concentración de citocina para la línea CALO siendo también mayor que la concentración del control positivo (en este caso se utilizó como control positivo 10 ng/ml de rhIL-2, que son las unidades óptimas para inducir proliferación) (Fig. 4. Tabla 2).

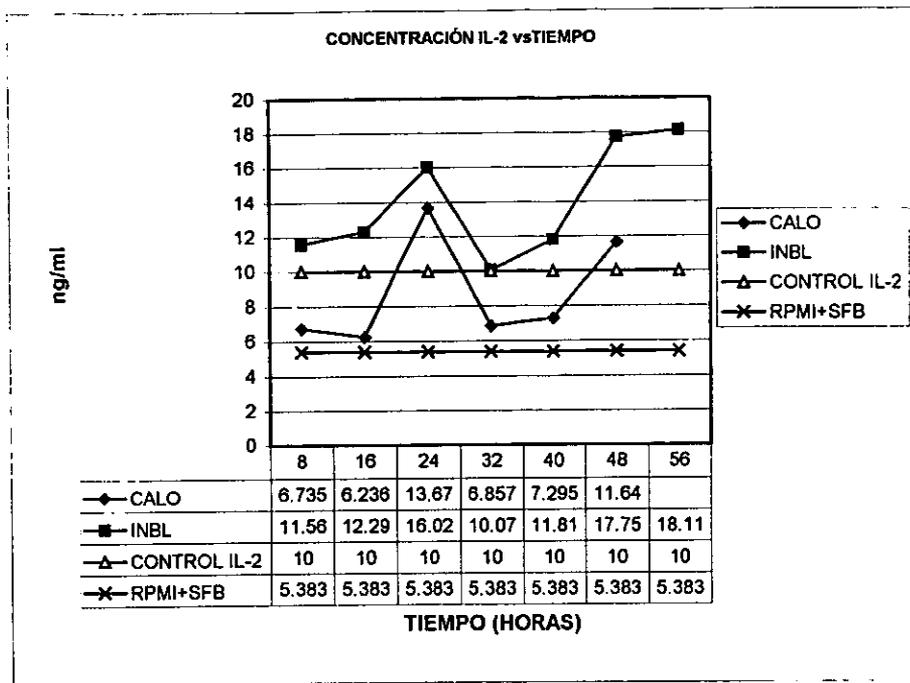


Figura 4. Presencia de IL-2 en el medio condicionado de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL. Se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10 % de SFB, se colectó el medio condicionado (MC) a las 8, 16, 24, 32, 40, 48 y 56 hrs. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en (ng/ml). Se observa la mayor concentración de IL-2 para CALO a las 24 hrs de 13.66 ng/ml, mientras que para INBL, esta se observa a las 48 hrs de 17.74 ng/ml. Se utilizó como control positivo 10 ng/ml de rhIL-2 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

Evaluación de la secreción de IL-3 de 8 a 56 horas

Se detectó la presencia de IL-3 en los medios condicionados de las dos líneas celulares obteniendo para INBL una mayor concentración de citocina en comparación a la línea CALO y al control positivo (en este caso se utilizó como control positivo 24 ng/ml de rhIL-3). Para la línea CALO el comportamiento es muy similar. Sin embargo, la cantidad de citocina producida por INBL es mayor. En ambas líneas celulares se observa una disminución a las 24 horas de evaluación y un progresivo aumento en las siguientes horas para posteriormente volver a disminuir a las 48 horas, esta disminución es más drástica para INBL. (Fig. 5. Tabla 2).

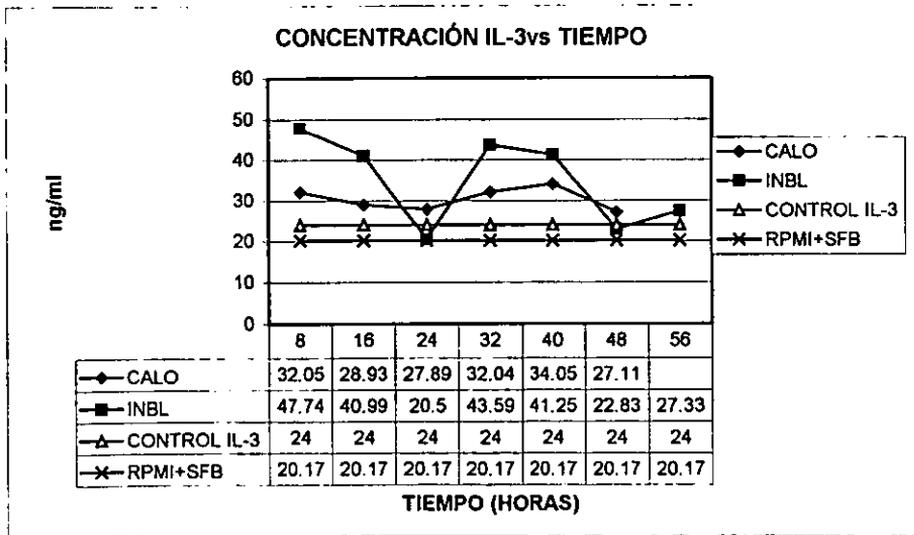


Figura 5. Presencia de IL-3 en el medio condicionado de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL. Se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10% de SFB, se colectó el medio condicionado a las 8, 16, 24, 32, 40, 48 y 56 hrs. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en (ng/ml). Se observa la mayor concentración de IL-3 para CALO a las 40 hrs de 34.05 ng/ml, mientras que para INBL, esta se observa a las 8 hrs de 47.74 ng/ml. Se utilizó como control positivo 24 ng/ml de rhIL-3 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO no es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

Evaluación de la secreción de IL-6 de 8 a 56 horas

En el caso de IL-6, esta se detectó en los medios condicionados de ambas líneas celulares. El comportamiento de la citocina en la línea CALO presenta un máximo a las 24 horas y un ligero descenso en los siguientes puntos de evaluación, mientras que para INBL se observa un aumento a las 8 horas y un progresivo descenso hasta por debajo del control positivo (como control positivo se utilizaron 9.1 ng/ml de rhIL-6). (Fig. 6 Tabla 2).

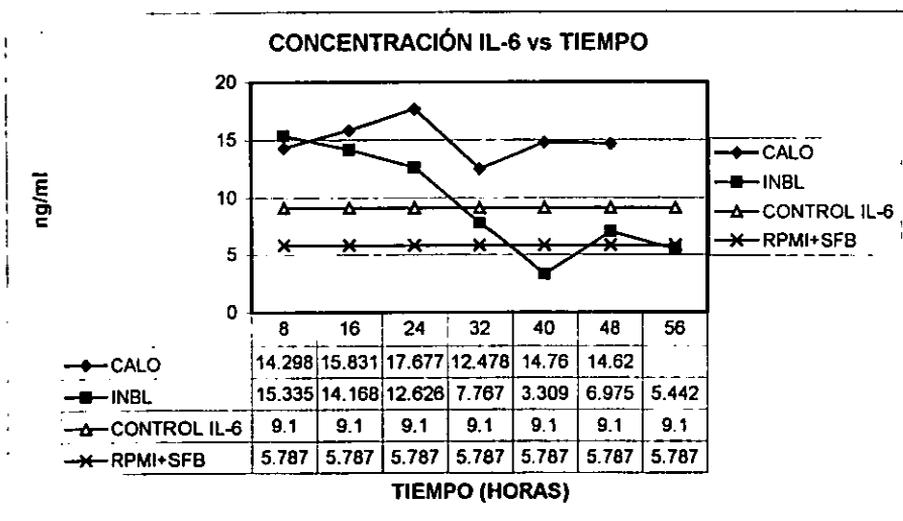


Figura 6. Presencia de IL-6 en el medio condicionado de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL. Se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10 % de SFB, se colectó el medio condicionado a las 8, 16, 24, 32, 40, 48 y 56 hrs. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en (ng/ml). Se observa la mayor concentración de IL-6 para CALO a las 24 hrs con 17.67 ng/ml, mientras que para INBL, esta se observa a las 8 hrs de 15.33 ng/ml. Se utilizó como control positivo 9.1 ng/ml de rhIL-6 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

INTERLEUCINA (IL)	CALO (ng/ml)	INBL (ng/ml)
IL-2	6.23-13.66	7.06-17.74
IL-3	27.11-34.05	22.83-47.74
IL-6	12.47-17.07	3.03-15.33

Tabla 2. Rango de concentración de las citocinas detectadas en el medio condicionado de las líneas de CaCu CALO e INBL, evaluado a diferentes intervalos de tiempo en horas.

SECRECIÓN DE CITOCINAS CON RELACIÓN AL CICLO CELULAR.

Con el propósito de relacionar la producción de las interleucinas IL-2, IL-3 e IL-6 al ciclo celular de cada línea, se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10% SFB. Los resultados representan la media de tres experimentos diferentes expresados en nanogramos por mililitro determinados por el método de ELISA.

CALO

En la línea celular de carcinoma de cérvix CALO cuyo ciclo celular tiene una duración de 0-10 hrs para la fase G₁, 10-14 hrs para la fase S y de 14-24 hrs para la fase G₂M (Chávez1997). Se observa que las células de manera general, posiblemente secretan las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6 en la fase G₁ de su ciclo celular y que posiblemente la utilizan en las fases G₂M para iniciar su proliferación. Para esta línea se observa una mayor concentración de IL-3. (Fig. 7.).

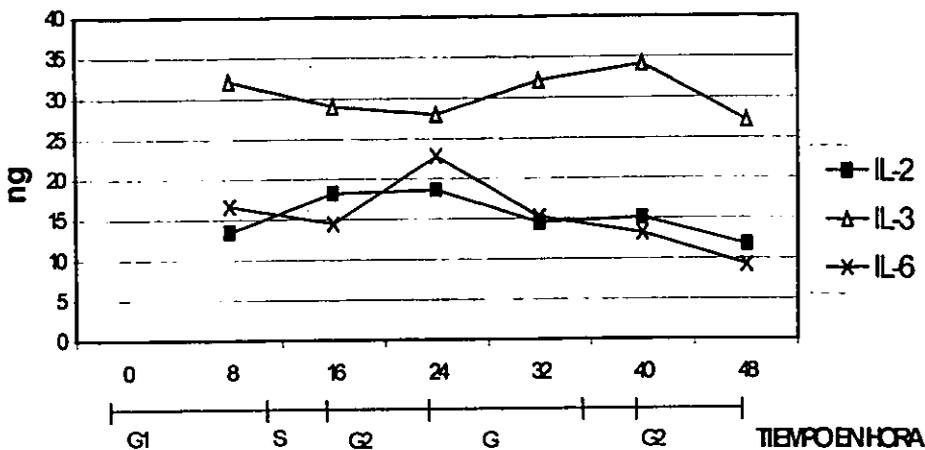


Figura 7. Producción de IL-2, IL-3 e IL-6 con relación al ciclo celular de la línea de CaCu CALO. Se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10 % de SFB y se colectó el medio condicionado a las 8, 16, 24, 32, 40, 48 y 56 horas. Los resultados representan la media de tres experimentos expresados en ng/ml determinados por el método de ELISA. Se observa una mayor concentración de IL-3.

INBL

En la línea celular de carcinoma de cérvix INBL las fases de su ciclo celular tienen un tiempo de duración de 0-11 hrs para G₁, 11-13 hrs para la fase S y de 13-29 hrs para la fase G₂M (Chávez 1997). Se observa que las células de manera general también posiblemente secretan las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6 en la fase G₁ de su ciclo celular y que posiblemente la utilizan en la fase G₂M para iniciar su proliferación. En este caso nuevamente IL-3 es la citocina con mayor concentración. (Fig. 8).

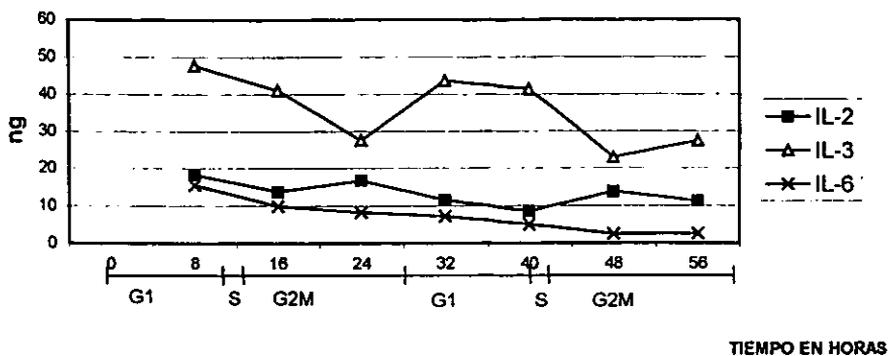


Figura 8. Producción de IL-2, IL-3 e IL-6 con relación al ciclo celular de la línea de CaCu INBL. Se sincronizaron y sembraron 1.5×10^6 células por botella con RPMI al 10 % de SFB y se colectó el medio condicionado a las 8, 16, 24, 32, 40, 48 y 56 horas. Los resultados son expresados de la media de tres experimentos en ng/ml determinados por el método de ELISA. Se observa una mayor concentración de IL-3.

Para corroborar los resultados anteriores y tener una mayor exactitud para definir en cual de las fases del ciclo es en la que posiblemente se lleva a cabo la secreción de las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6 por parte de las células de (CaCu), CALO e INBL y en cual de ellas, estas citocinas son posiblemente utilizadas, se procedió a sincronizar y sembrar 5×10^5 células por botella y se evaluó su secreción cada 2 horas en un periodo de 60 horas. Cabe aclarar que a partir de este ensayo el número celular fue reducido en una tercera parte por optimizar el medio condicionado, suero fetal de bovino, y anticuerpos monoclonales considerando que hasta este momento ya se había comprobado la presencia de las citocinas en el medio condicionado obtenido de las líneas tratadas.

La secreción de estas citocinas en el medio condicionado se determinó por medio de anticuerpos monoclonales específicos utilizando el método de ELISA. Los ensayos fueron realizados tres veces y por duplicado, usando como control positivo la citocina recombinante humana y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB.

Evaluación de la secreción de IL-2 cada 2 horas en un periodo de 60 horas

En ambas líneas celulares se detectó la secreción de IL-2 en los medios condicionados, detectando variación de concentración en los puntos evaluados para ambas líneas. En la línea CALO, sobresale la concentración de IL-2 en el medio condicionado de 44 hrs que es mayor al control positivo (se utilizó como control positivo 10 ng/ml de rhIL-2) (Fig. 9. Tabla 2). Para el caso de la línea INBL se obtuvo una concentración mayor de citocina en comparación al control positivo en los puntos de evaluación de 2, 10, 14 y 18 horas del medio de cultivo siendo las restantes también menores al control positivo. (Fig. 10. Tabla 2).

IL-2 CALO

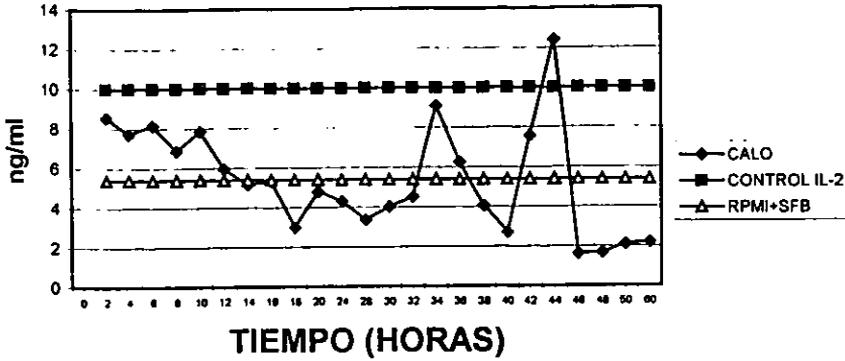


Figura 9. Presencia de IL-2 en el medio condicionado de la línea celular de CaCu CALO. Se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10% de SFB. Se colectó el medio condicionado cada 2 horas hasta las 60 horas de cultivo. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en (ng/ml). Se observa la mayor concentración con 12.40 ng/ml a las 44 horas. Se utilizó como control positivo 10 ng/ml de rhIL-2 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO no es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

IL-2 INBL

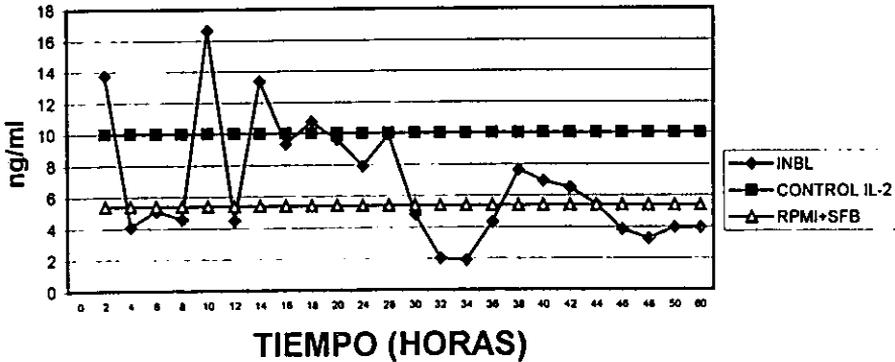


Figura 10. Presencia de IL-2 en el medio condicionado de la línea celular de CaCu INBL. Se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10 % de SFB. Se colectó el medio condicionado cada 2 horas hasta las 60 horas de cultivo. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en (ng/ml). Se observa la mayor concentración de la citocina a las 10 horas de 16.63ng/ml. Se utilizó como control positivo 10 ng/ml de rhIL-2 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO no es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

Evaluación de la secreción de IL-3 cada 2 horas en un periodo de 60 horas

De la misma forma se detectó la secreción de IL-3 en los medios condicionados de ambas líneas celulares, observando variaciones en la concentración de tal modo que se obtiene para la línea CALO una mayor concentración de citocina en algunos puntos de evaluación siendo el más sobresaliente el de las 30 horas de cultivo, todos los puntos evaluados son menores en comparación con el control positivo (en este caso se utilizó como control positivo 24 ng/ml de rhIL-3) (Fig. 11. Tabla 2). Para INBL se detectó una variación en la concentración en el medio condicionado de los puntos evaluados siendo todos menores al control positivo. (Fig. 12. Tabla 2).

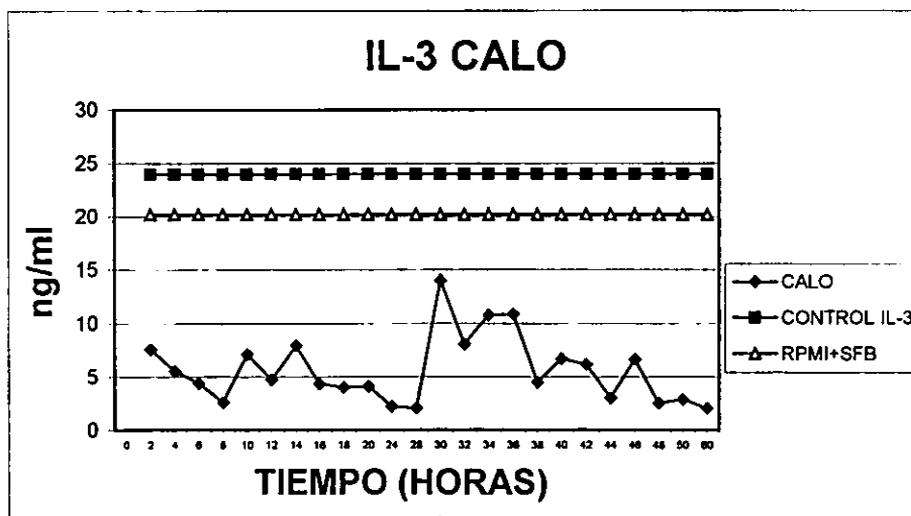


Figura 11. Presencia de IL-3 en el medio condicionado de la línea celular de CaCu CALO. Se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10 % de SFB. Se colectó el medio condicionado cada 2 horas hasta las 60 horas de cultivo. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en ng/ml. Se observa la mayor concentración de la citocina a las 30 horas de 13.99ng/ml. Se utilizó como control positivo 24 ng/ml de rhIL-3 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

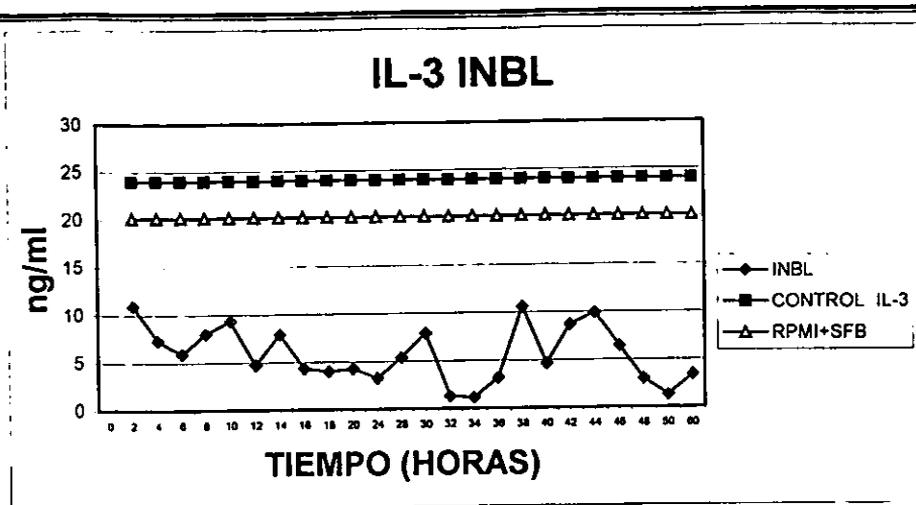


Figura 12. Presencia de IL-3 en el medio condicionado de la línea celular de CaCu INBL. Se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10 % de SFB. Se colectó el medio condicionado cada 2 horas hasta las 60 horas de cultivo. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en ng/ml. Se observa la mayor concentración de la citocina a las 2 horas de 10.94 ng/ml. Se utilizó como control positivo 24 ng/ml de rhIL-3 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

Evaluación de la secreción de IL-6 cada 2 horas en un periodo de 60 horas

En el caso de IL-6 fue detectada la presencia en los medios condicionados de ambas líneas celulares, obteniendo comportamientos similares de CALO e INBL en los puntos de evaluación de 14, 24 y 36 horas de cultivo donde se observa una mayor concentración de citocina. Para la línea CALO se obtuvo una concentración mayor de IL-6 en 2, 8, 14 y 60 horas de cultivo en comparación con el control positivo (se utilizó como control positivo 9.1 ng/ml de rhIL-6) y los siguientes puntos fueron menores al control positivo. (Fig. 13. Tabla 2). En la línea celular de INBL se observó una mayor concentración de citocina en las 14 y 36 horas de cultivo en comparación a la concentración del control positivo. (Fig. 14 Tabla 2).

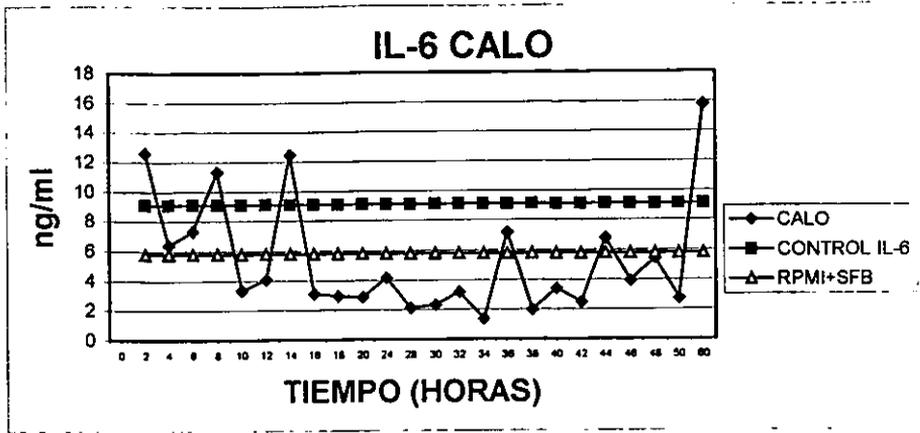


Figura 13. Presencia de IL-6 en el medio condicionado de la línea celular de CaCu CALO. Se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10 % de SFB. Se colectó el medio condicionado cada 2 horas hasta las 60 horas de cultivo. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en ng/ml. Se observa la mayor concentración de la citocina a las 60 horas de 15.79 ng/ml. Se utilizó como control positivo 9.1 ng/ml de rhIL-6 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

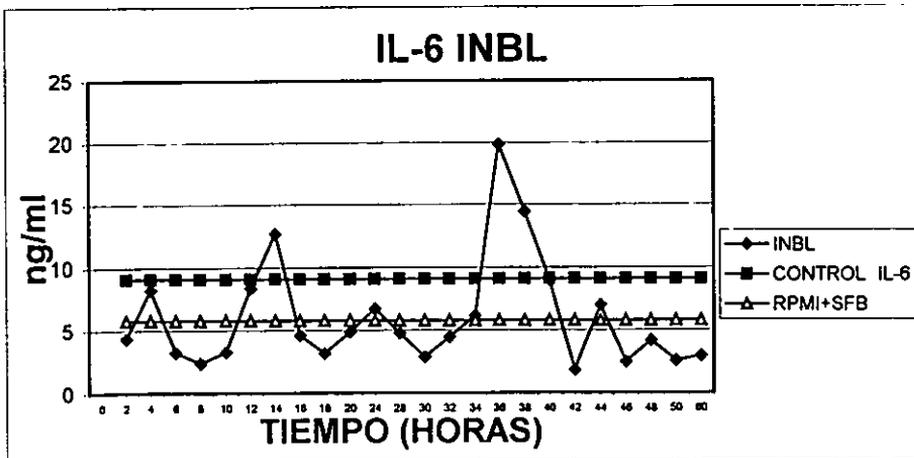


Figura 14. Presencia de IL-6 en el medio condicionado de la línea celular de CaCu INBL. Se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10 % de SFB. Se colectó el medio condicionado cada 2 horas hasta las 60 horas de cultivo. Los resultados obtenidos por el método de ELISA son la media de tres experimentos expresados en ng/ml. Se observa la mayor concentración de la citocina a las 36 horas de 19.88 ng/ml. Se utilizó como control positivo 9.1 ng/ml de rhIL-6 y como control negativo RPMI adicionando 10% SFB. La concentración de citocina de la línea CALO es significativamente diferente a la concentración de citocina de la línea INBL con $\alpha=0.05$.

SECRECIÓN DE CITOCINAS EN RELACIÓN AL CICLO CELULAR

Con el fin de relacionar la secreción de las interleucinas IL-2, IL-3 e IL-6 con el ciclo celular de cada línea con mayor precisión, se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10% SFB. Los resultados son la media de tres experimentos diferentes expresados en nanogramos por mililitro determinados por el método de ELISA.

CALO

Para la línea celular de carcinoma de cérvix CALO como fue mencionado su ciclo celular tiene un tiempo de duración de las fases de 0-10 hrs para G_1 , 10-14 hrs para la fase S y de 14-24 hrs para la fase G_2M (Chávez 1997). Se observa al igual que en el experimento anterior que las células, de manera general, secretan las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6 en la fase G_1 de su ciclo celular y éstas posiblemente se utilizan en la fase G_2M para iniciar su proliferación (Fig. 15. Tabla 3).

INBL

Con respecto a la línea celular INBL su ciclo celular muestra pequeñas variaciones con respecto a CALO con un tiempo de duración de las fases de 0-11 hrs para G_1 , 11-13 hrs para la fase S y de 13-29 hrs para la fase G_2M (Chávez 1997). Se observa al igual que en el experimento anterior que las células de manera general secretan las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6 en la fase G_1 de su ciclo celular y posiblemente se utilizan en la fase G_2M para iniciar su proliferación (Fig. 16. Tabla 3 y 4).

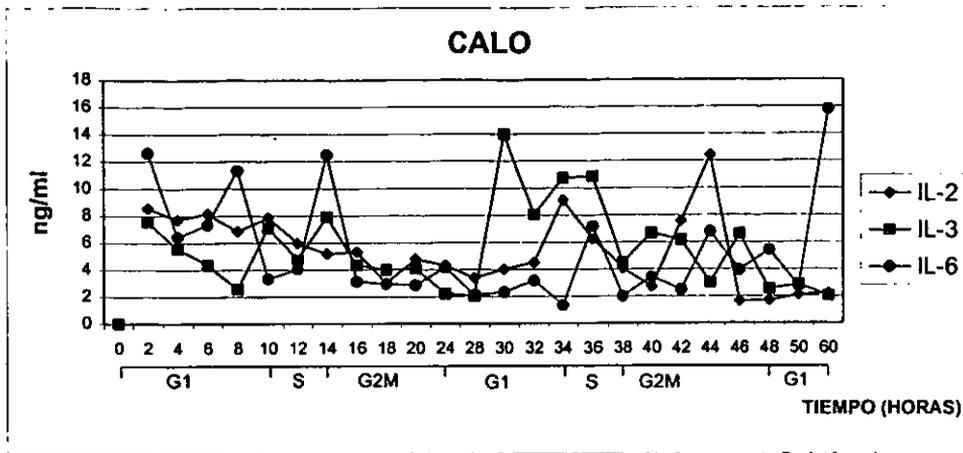


Figura 15. Producción de IL-2, IL-3 e IL-6 con relación al ciclo celular de la línea de CaCu CALO. Se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10 % de SFB y se colectó el medio condicionado cada 2 horas hasta las 60 horas de cultivo. Los resultados representan la media de tres experimentos expresados en ng/ml determinados por el método de ELISA.

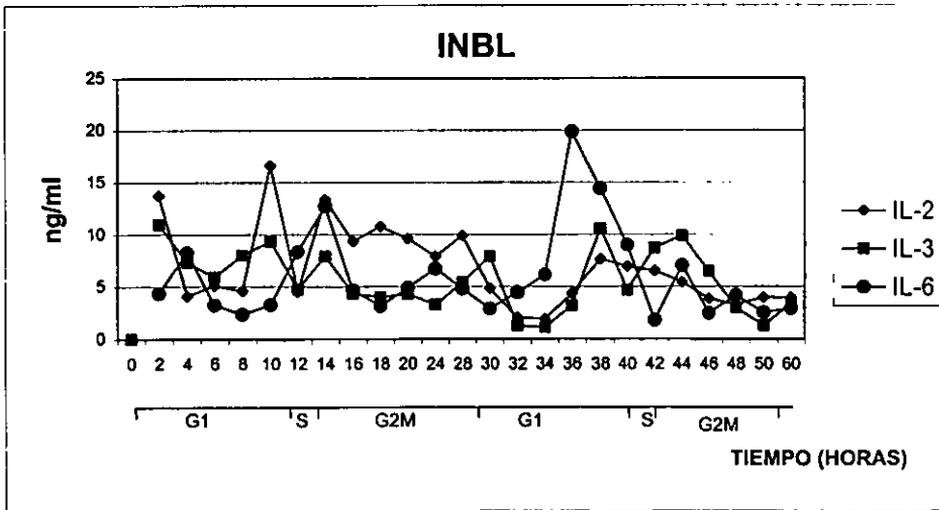


Figura 16. Producción de IL-2, IL-3 e IL-6 con relación al ciclo celular de la línea de CaCu INBL. Se sincronizaron y sembraron 5×10^5 células por botella con RPMI al 10 % de SFB y se colectó el medio condicionado cada 2 horas hasta las 60 horas de cultivo. Los resultados representan la media de tres experimentos expresados en ng/ml determinados por el método de ELISA.

	CITOCINAS		
LINEA CELULAR	IL-2	IL-3	IL-6
CALO	G1 / G1	G1 / G1	G1 / S
INBL	G1 / G1	G1 / G1	S / G1

Tabla 3. Posible secreción de citocinas en relación al ciclo celular de cada línea.

	CITOCINAS		
LINEA CELULAR	IL-2	IL-3	IL-6
CALO	G2M / G2M	G2M / G2M	G2M / G1
INBL	G2M / G2M	G2M / G2M	G2M / G2M

Tabla 4. Posible utilización de citocinas en relación al ciclo celular de cada línea.

PROLIFERACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CÉRVIX CALO E INBL.

Con el propósito de evaluar el efecto de los medios condicionados concentrados de las líneas de CaCu CALO e INBL sobre la proliferación de estas células, se procedió a sincronizar y sembrar 7,500 células de cada línea por pozo, adicionando los medios condicionados concentrados, previamente filtrados de acuerdo al tamaño de cada citocina IL-2, IL-3 e IL-6, y colectados a diferentes intervalos de tiempo, para observar el efecto que estas interleucinas tenían sobre la proliferación, de las propias líneas celulares.

ESTÍMULO CON MEDIO CONDICIONADO DE LA LÍNEA CALO

Al estimular células de la línea CALO con los medios condicionados concentrados de la misma línea (los cuales contienen las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6) éstas presentan una respuesta de proliferación positiva. Se observa una mayor proliferación al utilizar los medios colectados a las 24, 32, 40 y 50 horas de cultivo, incluso llegan a superar el efecto observado al estimular con 10 UI/ml de rhIL-2, 10 UI/ml de rhIL-3 y 50 UI/ml de rh IL-6 que son las unidades óptimas mencionadas por la literatura para inducir la proliferación mismas que se utilizaron como control positivo, mientras que el menor efecto proliferador se observa al utilizar el medio colectado a las 2 horas de cultivo. (Fig. 17. Tabla 2).

ESTÍMULO CON MEDIO CONDICIONADO DE LA LÍNEA INBL

Para la línea celular INBL, al estimular las células con los medios condicionados concentrados de esta línea (los cuales contienen las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6) éstas al igual que las línea CALO también tuvieron una respuesta de proliferación positiva. Se observa una mayor proliferación al utilizar los medios colectados a las 28 30 y 48 horas de cultivo en este caso también llegan a superar el efecto observado al estimular con 10 UI/ml de rhIL-2, 10 UI/ml de rhIL-3 y 50 UI/ml de rh IL-6 que son las unidades óptimas mencionadas por la literatura para inducir la proliferación y mismas que se utilizaron como control positivo, observando el menor efecto proliferador al utilizar el medio colectado a las 8 horas de cultivo. (Fig. 18. Tabla 2).

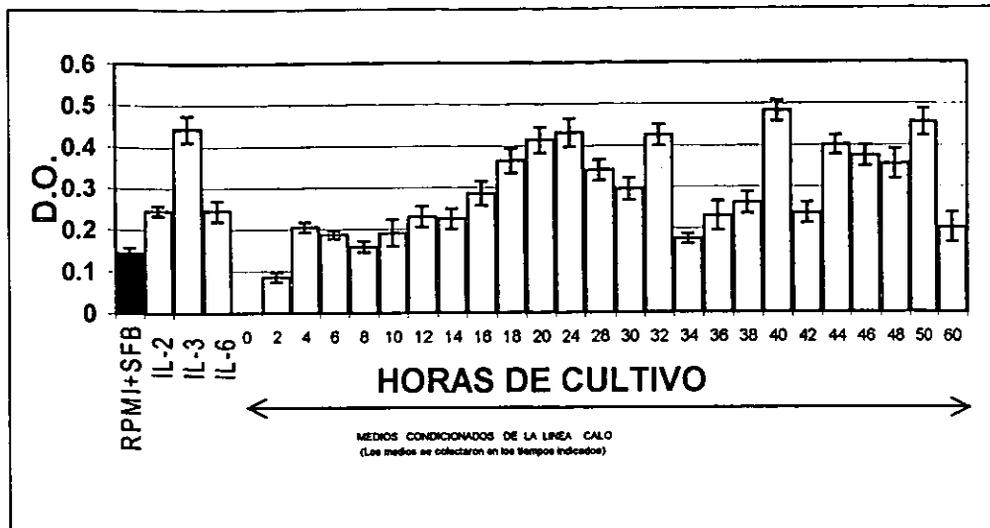


Figura 17. Proliferación con los medios condicionados de la línea CALO a diferentes intervalos de tiempo. Se sembraron 7.5×10^3 células por pozo, se estimularon con 10 UI/ml de IL-2, 10UI/ml de IL-3, 50UI/ml de IL-6 y con los medios condicionados concentrados y filtrados de la propia línea CALO. Los resultados por el método de cristal violeta son la media de tres experimentos expresados en Densidad Óptica (D.O).

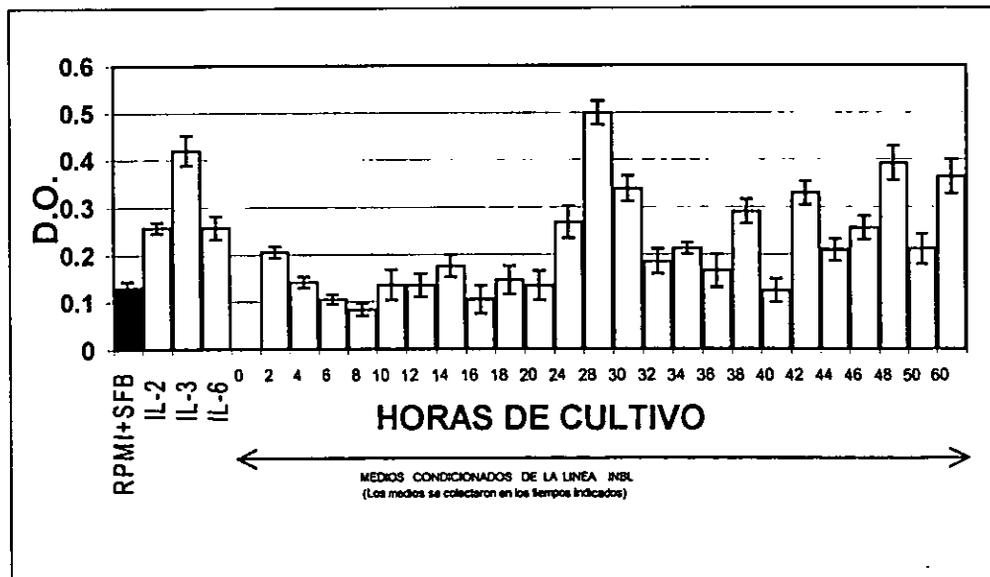


Figura 18. Proliferación con los medios condicionados de la línea INBL a diferentes intervalos de tiempo. Se sembraron 7.5×10^3 células por pozo, se estimularon con 10UI/ml de IL-2, 10UI/ml de IL-3, 50UI/ml de IL-6 y con los medios condicionados concentrados y filtrados de la propia línea INBL. Los resultados obtenidos por el método de cristal violeta son la media de tres experimentos expresados en Densidad Óptica (D.O).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La mayoría de los componentes de la célula se producen continuamente a lo largo de la interfase, generalmente a una velocidad creciente a medida que aumenta el tamaño y la capacidad de biosíntesis de la célula. La capacidad sintetizadora de la célula aumenta a medida que ésta se vuelve mayor, por lo que cada uno de estos tres parámetros aumenta a una velocidad creciente a medida que la célula pasa de G_1 a G_2 . Muchas proteínas que se producen a una velocidad uniforme a lo largo del ciclo celular también pueden actuar en momentos concretos del ciclo celular (Murray y Hunt, 1993). Las células cancerosas presentan diversas propiedades que las hacen peligrosas para el huésped, incluida la capacidad de invadir otros tejidos y de inducir la vascularización capilar, la cual les asegura un buen abastecimiento de sangre que les permiten proliferar. Sin embargo, uno de los rasgos característicos de las células cancerosas estriba en que responden de manera anormal a los mecanismos de control que regulan la división de las células normales, y continúan dividiéndose de una forma relativamente incontrolada hasta producir la muerte del huésped (Pontén *et al.*, 1995). Esta ausencia mortal de límites de proliferación ha constituido un gran incentivo para el estudio del control de la división celular en este tipo de células. Los mecanismos moleculares precisos que intervienen en este proceso son desconocidos, pero está claro que las células cancerosas están menos sujetas a la mayoría de los mecanismos de retroalimentación que controlan la división celular tanto en tejidos como en cultivos celulares. Además, las células cancerosas requieren para sobrevivir y dividirse en cultivo, menos factores de crecimiento que las normales (Stonans *et al.*, 1999, Wadhwa *et al.*, 2000).

En algunos casos, esto es debido a que producen sus propios factores de crecimiento (Alberts 1994). Se sabe que las células sintetizan sus propios factores de crecimiento entre los que se encuentran las interleucinas (ILs). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que las líneas celulares de CaCu CALO e INBL secretan las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6. Las variaciones de dichas citocinas en el medio condicionado nos puede hablar de la participación de estos moduladores biológicos en la proliferación de células tumorales. Las variaciones que se observan en su concentración en función del tiempo, parecen indicar que las citocinas se secretan en el medio de cultivo durante los primeros tres días (72 horas) de cultivo y transcurrido ese tiempo se detecta una disminución en la concentración de dichas citocinas, lo cual se interpreta como un consumo por parte de las propias células para mantener su proliferación, de manera autócrina (Mizuno *et al.*, 1994, Castrilli *et al.*, 1997, Hsu *et al.*, 1997, Okamoto *et al.*, 1997).

Detectamos la presencia de IL-2 en el medio condicionado de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL, lo cual es alentador ya que si las células tumorales producen IL-2 esta citocina producida, podría ser capaz de activar al linfocito T y así despertar la respuesta inmune, sin embargo, la concentración de esta citocina calculada en el medio condicionado es baja y de acuerdo con los datos reportados en la literatura no es suficiente para poder diferenciar linfocitos T a células citotóxicas específicas (CTLs) que requieren para su generación una concentración 5 ó 10 veces mayor que la máxima detectada para IL-2 en el medio condicionado de CALO e INBL, pero al parecer las células de CaCu la utilizan para su proliferación.

En este caso a pesar de que exista un estímulo de linfocitos por la presencia de células tumorales éstas últimas pueden estar consumiendo la IL-2 del medio de manera más eficiente que los linfocitos. Esto podría explicar uno de los mecanismos del CaCu que a pesar de ser altamente inmunogénico por expresar proteínas virales, no puede ser controlado eficientemente por el sistema inmune y llega a estadios terminales después de largos periodos de tiempo. (Alvarado, 1997).

Con fundamento en las concentraciones de IL-2 detectadas en ambas líneas celulares CALO e INBL, con respecto al tiempo en horas, y considerando el ciclo celular de cada línea que es de 24 hrs para CALO y 29 hrs para INBL, tenemos que la mayor producción se realiza en las fases G₁ (0-10 hrs para CALO y 0-11 hrs para INBL). Por otro lado, las variaciones observadas en la concentración de IL-2 en los diferentes intervalos de tiempo, así como los ensayos de proliferación utilizando esta citocina como control y los medios condicionados concentrados donde se encuentra, nos indican que las células de CaCu CALO e INBL utilizan la IL-2 para su proliferación en un proceso autócrino. Por lo tanto, la IL-2 producida ya sea por células tumorales o algunos linfocitos estaría favoreciendo la progresión del tumor.

La concentración de IL-3 detectada en el medio condicionado con respecto al tiempo en horas en las dos líneas de CaCu, CALO e INBL nos indica que la fase del ciclo celular en donde se encuentra mayor producción de esta citocina es también en la fase G₁. Para CALO (Estadio IIB), e INBL (Estadio IVB), se detectaron además disminuciones en la concentración de citocina en el medio lo cual podría implicar una dependencia por IL-3. No obstante, el consumo de esta citocina en ambas líneas parece ser importante para su

proliferación, ya que se observan las grandes disminuciones en la concentración como en IL-2. Además, al realizar cinéticas de proliferación utilizando esta citocina como mitógeno se obtuvo mayor información sobre el efecto de IL-3 en las células tumorales, y generalizó los resultados tal como sucedió con IL-2. Independientemente de esto si consideramos que las células tumorales en su proceso de malignidad pueden generar infinidad de cambios, entre los que se encuentran la producción de diversos factores de crecimiento, podemos sugerir que las células tumorales adquieren las características de responder a moduladores biológicos de la respuesta inmune, en menor o mayor grado, como un mecanismo de depleción de citocinas del microambiente para evadir la respuesta inmune independientemente de que las células sean capaces de producirlas para adquirir mayores ventajas. En particular la determinación de IL-3 en CaCu es de gran importancia ya que no se contaba con datos sobre la producción de esta citocina en este tipo de tumor ni el efecto sobre el mismo, a diferencia de la literatura sobre su producción por leucemias y linfomas (Bukowski, *et al.*, 1996, Nair *et al.*, 1999).

Del mismo modo, se detectó la presencia de IL-6 en ambas líneas celulares CALO e INBL, la concentración de esta citocina nos indica que la fase del ciclo celular en la que se encontró la mayor producción es así mismo en la fase G₁. Los resultados encontrados en la literatura nos hacen pensar que quizá esta citocina podría ser mucho más importante que IL-2 o IL-3 en la proliferación de las células neoplásicas, ya que datos recientes indican que las células de epitelio normal y neoplásico de cérvix responden a IL-6 (Castrilli G. *et al* 1997), por lo cual pensamos que esta producción de IL-6 puede jugar un papel importante en la proliferación celular. Al realizar ensayos de proliferación se obtuvo que las células de

carcinoma de cérvix tanto CALO como INBL responden al ser estimuladas con las interleucinas recombinantes (rhILs) IL-2, IL-3 e IL-6; esta respuesta sobre la proliferación es positiva, al igual que la respuesta que se encontró en los medios condicionados concentrados. Esto parece confirmarnos que la presencia de las IL-2, IL-3 e IL-6 en los medios condicionados parece estar relacionada directamente con la progresión de este tipo de tumor y sugiere la existencia de un posible mecanismo de escape inmunológico que presentan las células para proliferar a expensas del organismo. En la literatura se indica que tienen un efecto sinérgico, ya que por ejemplo IL-2 e IL-6 participan en la diferenciación de linfocitos T citolíticos (CTLs) y células auxiliares, además estimulan también el crecimiento y la diferenciación de linfocitos B; IL-3 e IL-6 participan en la maduración de diferentes linajes hematopoyéticos como megacariocitos, basófilos y eosinófilos (Habenicht, 1990).

Con base en los resultados obtenidos, los cuales nos indican que las células de CaCu secretan IL-2, IL-3 e IL-6 y que además estas citocinas tienen un efecto positivo sobre la proliferación, el mecanismo de escape que proponemos es el siguiente:

Tenemos que el linfocito T es el encargado de la respuesta inmune adquirida o específica, un sistema de alta defensa en el cual se produce lisis de las células blanco; sabemos que la respuesta inmune específica se divide en fase de reconocimiento, fase de activación y fase efectora. En la primera de estas fases, la célula presentadora de antígenos tiene como función básica el procesar moléculas extrañas y expresar en su membrana moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I y II y linfocitos CD8⁺

reconocen agentes externos, como proteínas virales, cuando estos son unidos a la molécula del CMH Clase I y por otro lado los linfocitos CD4 reconocen antígenos unidos a moléculas CMH clase II. En la fase de activación se produce la expansión clonal de linfocitos específicos dirigidos contra el antígeno (célula tumoral de CaCu), es en esta fase cuando se requieren y se generan citocinas como IL-2, IL-3 e IL-6, entre otras, con el fin de inducir la proliferación de células efectoras, ya sea de manera autócrina, parácrina o sinérgica.

En este caso proponemos que la célula tumoral de CaCu que se encuentre más cercana a la fuente de citocinas sería más eficiente en utilizar estas proteínas, debido a que es posible que expresen los receptores para éstas, por ejemplo RIL-2 y suponemos que pueden estar presentes los receptores para IL-3 e IL-6, ya que se observó que estas citocinas IL-2, IL-3 e IL-6 tienen un efecto positivo sobre la proliferación de estas células de CaCu y además utilizan concentraciones más bajas para proliferar que los mismos linfocitos.

Asimismo, las células tumorales poseen la capacidad de secretar estas citocinas y utilizarlas de manera autócrina y parácrina para su proliferación. Lo anterior nos hace suponer que estas citocinas no realizan la activación correspondiente sobre el linfocito T, impidiendo que se lleve a cabo la fase efectora de la respuesta inmune, donde los linfocitos T activados específicamente eliminan a los antígenos que despertaron la respuesta inmune, en este caso células tumorales de CaCu (Fig. 19).

:

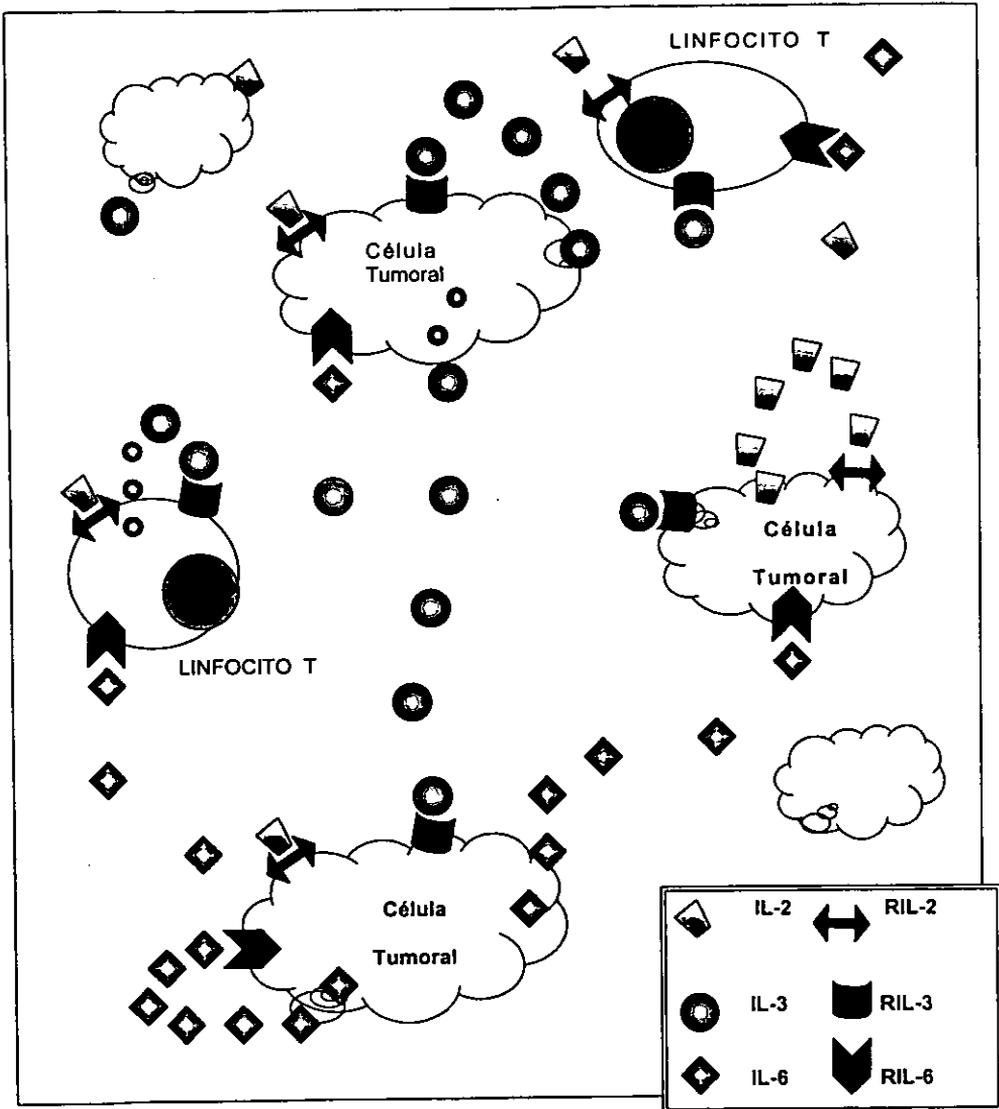


Figura 19. Posible mecanismo de escape inmunológico. Las células de CaCu producen sus propios factores de crecimiento (IL-2, IL-3 e IL-6). Estas células en comparación con los linfocitos T, requieren una menor concentración de dichos factores para su supervivencia.

CONCLUSIONES

1.- Se detectó la presencia de IL-2, IL-3 e IL-6 en el medio condicionado de las dos líneas celulares de CaCu CALO e INBL .

2 .- Esta interleucinas tienen efecto positivo sobre la proliferación de las células de CaCu CALO e INBL .

3.- Las células de CaCu CALO e INBL secretan IL-2, IL-3 e IL-6 en la fase G₁ y es posible que la consuman en la fase G₂ M.

SUGERENCIAS

1. En futuros experimentos sería conveniente evaluar la presencia de estas citocinas en células normales de cérvix.
2. Ampliar el número de muestras de líneas celulares de CaCu, en los que se determine la presencia de estas citocinas para poder generalizar estos resultados.
3. Confirmar la síntesis de IL-2, IL-3 e IL-6, a través de la cuantificación de ARNm por medio de RT-PCR.
4. Determinar si existe dependencia de estas citocinas para proliferar y evaluar proliferación por medio de la incorporación de timidina tritiada.
5. Determinar la presencia de receptores para estas citocinas por medio de RT-PCR.
6. Sería conveniente bloquear los receptores de estas citocinas de manera que se evite la unión a su receptor y así determinar si son esenciales para controlar la proliferación, por medio de la incorporación de timidina tritiada.
7. Evaluar si existe actividad sinérgica entre las citocinas IL-2, IL-3 e IL-6.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas K.J; Lichtman A.H; Pober S.J. (1994). Cellular and Molecular Immunology. Ed.W. B. Saunders Company .U. S A. pp 226-243.

Aggarmal B.B., Gutterman J.u. (1992). Human Cytokines: Handbook for basic and clinical research. Ed. Blackwell Scientific Publications., U.S.A., pp. 1-141.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Robertes K., Watson J. (1994). Molecular Biology of the Cell. 3 rd edition, Garland Publishing, Inc, New York & London, pp 269- 996.

Alexandroff A., Jackson A., Chisholm G., James K. (1995). Cytokine modulation of epidermal growth factor receptor expression on bladder cancer cells is not a major contributors to the antitumour activity of cytokines. *J Cancer* 31*(12):2059-2066.

Alvarado Moreno J.A. (1997). Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis presentada para obtener el título de Biólogo U.N.A.M. F.E.S Zaragoza. 101pp.

Andrzejewska E., Niewiadowska H. (2000). Evaluation of selected parameters of the cytokine system in burn wounds in children. *Pediatr Surg Int* 16(1-2):80-84.

Armitage R.J; Brian M.M; June E; Raymond Paxton, and Kenneth H.Grabstein. (1995). IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol.*7: 438-490.

Azimi N. (1999). Interleukin-15: a new player in pathogenesis of neurological disease. *Avances en Biotecnología Moderna* 5:O26.

Bell J. (1998). Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc* 19(6):337-341.

Benacerraf B y Unanue E. (1990). Inmunología Ed Panamericana 2ª edición.Buenos Aires, Argentina. pp 11-49.

Bendtzen K. (1994). Cytokines and regulators of cytokines. *Immunol Let* 43:111-123.

Billadeau D,Liu P, Jelinek D, Shah N, LeBien T, Nass B. (1997). Activating Mutations in the N-and K ras Oncogenes Differentially Affect the Growth properties of the IL-6-dependent Myeloma Cell Line ANBL6. *Cancer Res* 57:2268-2275.

Blais Y., Sugimoto K., Carrier M., Haagensen D., Labrie F., Simard J. (1995). Interleukin-6 inhibits the potent stimulatory action of androgens glucocorticoides and interleukin 1 alpha on apolipoprotein D and GCDFP-15 expression in human breast cancer cells. *J Cancer* 62(6):732-737.

Brinton L.A. (1992). Epidemiology of cervical cancer-Overview. In: N. Muñoz, F.X. Bosch, K.V. Shah, A.Meheus (eds.), *The epidemiology of Human Papillomavirus and cervical cancer.*, Oxford University Press, Oxford. pp.3-22.

Bukowski R., Olencki T., Gunn H., Mclain D., Budd G., Sanstrom K., Tuason L., Redovan C., Rayman P., Tubbs R., Resta., Elson P., Finke J. (1996). Phase I trial of subcutaneous interleukin-3 in patients with refractory malignancy: hematological, immunological, and pharmacodynamic findings. *Cancer Res* 2 (2):347-357.

Carson E.W; Judith G.G; Matthew J.L; Michael L.L; Mínoo A; Raymond Paxton; Dirk A; June E; Kenneth G; and Michael A.(1994).Interleukin 15 is a Novel Cytokine That Activates Human Natural Killer Cells via components of the IL-2 Receptor. *J Exp.Med.* 180: 1395-1402.

Castrilli G, Tatone,D; Dioro,MG; Rosini, S; Piantelli, m; Lusiani, PAF. (1997). Interleukin 1 alpha and interleukin 6 promote the in vitro growth of both normal and neoplasia human cervical epithelial cells. *Brit. J. Cancer* 75 (6): 855-859.

Chávez G. M. (1997). Purificación del Factor Inhibidor de la Proliferación (FIP) y evaluación de su efecto en el ciclo celular de fibroblastos de cérvix humano. Tesis presentada para la obtención del título de Biólogo. U.N.A.M. F.E.S. Zaragoza 71 pp.

Clary C., Coveney E., Blazer D., Philip R., Lyerly H. (1996). Active immunotherapy of pancreatic cancer with tumor cells genetically engineered to secrete multile cytokines. *Surgery* 20(2):174-181.

Coligan J., Kruisbeck M., Margulies H., Shevach M. (1993). *Current Protocols in Immunology Vol II.* Ed. Grenne Publishing, pp 10.3

Coveney E., Clary B., Iacobucci M., Philip R., Lyerly K. (1996). Active immunotherapy with transiently transfected cytokine-secreting tumor cell inhibits breast cancer metastases in tumor-bearing animals. *Surgery* 120(2):265-272.

Culver K. (1994) Clinical applications of gene therapy for cancer. *Clin Chem* 40(4):510-520.

Danforth D., Sgagias M. (1993).Interleukin -1 alpha and interleukin-6 act additively to inhibit growth of MCF-7 breast cancer cells in vitro. *Cancer Res* 53(7):1538-1545.

Deisseroth A, (1995). Cáncer cervicouterino: En busca de una etiología infecciosa. *Ciencia Básica de Oncología*, 1: 13-21.

De Robertis, E; Saez, F.A; y E.M.F. Robertis. (1994). *Cell biology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. E.U.A. pp 388-450.

Douglas A., Goss G., Shuterland R., Hilton D., Berndt m., Nicola N., Begley C. (1997). Expression and function of members of the cytokine receptor superfamily on breast cancer cells. *Oncogene* 14(6):661-669.

Euhus D., Kimur L., Arnold B. (1997) Expansion of CD3+CD56+ lymphocytes correlates with induction of cytotoxicity by interleukin-2 gene transfer in human breast tumor cultures. *Oncology* 14(5):432-439.

Evans CH., Flugelman A., DiPaolo J.(1993). Cytokine modulation of immune defenses in cervical cancer. *Oncology* 50(4):245-251.

Freshney I.R. (1991). *Culture of animal cells. A Manual of Basic technique*. 2ª edición Ed. A Jhon Wiley & sons. New York pp 7-126.

Gómez J., González A., Martínez A., Rebollo A (1998). IL-2-induced cellular events. *Crit Rev Immunol* 18(3):185-220.

González. I. , Nazabal. M. , Claro. A. , Peralta. A. , Méndez. D. , Cruz. E., (1995). Presencia de Papilomavirus humano en lesiones genitales. *Bioquímica* 20:266-270.

Gotlieb W., Watson J., Rezai A., Johnson M., Martinez-Maza O., Berek J. (1994). Cytokines induced modulation of tumor suppressor gene expression in ovarian cancer cell: up-regulation of p53 gene expression and induction of apoptosis by tumor necrosis factor alpha. *J Obstet Gynecol* 170(4):1121-1128.

Guarini A., Riera L., Cignetti A., Montacchini L., Massaia M., Foa R. (1997). Transfer of the interleukin-2 gene into human cancer cells induces specific antitumor recognition and restores the expression of CD3/T-cell receptor associated signal transduction molecules. *Blood* 89(1):212-218.

Habenich A., (1990). *Growth factors differentiation factors, and Cytokines*. Ed. Springer-verlag. London pp. 115-128.

Hamblin S. A. (1993). *Cytokines and Cytokines Receptors*. Ed IRLPRESS Oxford, England 90 pp.

Heyworth C. M., Vallance S. J., Whetton A. D. (1990). The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors. *Cell* 13: 57-74.

Hollingsworth S., Darling D., Gaken J., Hirst W., Patel p., Kuiper M., Towner P., Humphreys S., Farzaneh F., Mufti G.(1996). The effect of combined expression of interleukin 2 and interleukin 4 on the tumorigenicity and treatment of B16F10 melanoma. *Cancer* 74(1):6-15.

Hsu S., Glaves D., Sood A. (1997). Interleukin-2 secretion by kht sarcoma cells leads to loss of their vaccine potencial. *Immunol Immunother.* 44(2):117-124.

Huang M., Wang J., Lee P., Sharma S., Mao J., Meissner H., Uyemura K., Modlin R., Wollman J., Dubinett S.(1995). Human non-small cell lung cancer cell express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* 55(17):3847-53.

Hunter T. (1993). Breaking the cycle. *Cell* 75:839-841

Iseki H., Kajimura N., Ohue C., Tanaka R., Akiyama Y., Yamaguchi K. (1995). Cytokine production in five tumor cell lines with activity to induce cancer cachexia syndrome in nude mice. *Cancer Res* 86(6):562-567.

Jelinek D., Witzig T., Arendt B. (1997). A role for insulin-like growth factor in the regulation of Il-6-responsive human myeloma cell line groth. *Immunology* 159(1):487-496.

Kagi D., Ledermann B., Burki K., Zinkernagel R.M., Hengartner Hans. (1995). Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: mecanisms and significance. *Immunol. Rev.* 146:95.

Kaplan D. (1996). Autocrine Secretion and the Physiological concetration of Cytokines. *Immunol. Today* 17:304-315.

Kawakami Y., Nagai N., Ota S., Ohama K., Yamashita U. (1997). Interleukin-1 as an autocrine stimulator in the growth human ovarian cancer cells. *J Med Sci* 46(1):51-59.

Khanna C, Anderson P,Katsanis E, Neville M, Klausner J. (1997) Interleukin-2 Liposome Inhalation Therapy Is Safe and Effective for Dogs with Spontaneous Pulmonary Metastases.*Cancer* 7(79):1409-1421.

Kube D., Janda J., Johannsmeyer K., Bergmann S., Kiessling U. (1994). Characterization of human papillomavirus type 16 activity in separate biopsies from a carcinoma of the cervix uteri. *Virchows Archiv* .425(5):473-480.

Landgraf E.B; Byrin G; Diane P. Williams; John R Murphy; Theodore R.S; Kendall A.S; and Thomas L.C.(1992). Recombinant Interleukin-2 Analogs.. *The Journal of Biological chemistry.* 267 :18511-18519.

Lauwery B., Renauld J., Houssiau F.(1999). Synergistic proliferation and activation of natural killer cell by interleukin-12 and interleukin 18. *Cytokine* 11(11):822-830.

-
- Lazcano E. C., Nájera A. P., Lonso R. P. Buiatti E., Hernández A. M. (1996). Programa de detección oportuna de cáncer cervical en México. Diagnostico situacional. Rev. Inst. Nal. Cancerología. 42: 123.
- Leclerc C.(1999). New non replicative vectors to induce protective anti-viral and antitumor cytotoxic T cell responses. Avances en biotecnología Moderna 5:019.
- Lissoni P., Barni S., Cazzaniga M., Ardizzoia A., Rovell F., Brivio F., Tancini G. (1994). Efficacy of the concomitant administration of the pineal hormone melatonin in cancer immunotherapy with low-dose IL-2 in patients with advanced solid tumors who had progressed on IL-2 alone. Oncology 51(4):344-347.
- López M.R.(1997). Caracterización de la respuesta antiproliferativa de células endoteliales humanas al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Tesis presentada para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Biomedicas U.N.A.M. 89 pp.
- Lorenz, M. Hieronymus, T. Grunke, M. Manger, B. Kalden, J.R. (1997). Differential Role for IL-2 and IL-15 in the Inhibition of Apoptosis in Short Term Activated Human Lymphocytes. Scan J. Immunol 45:660-669.
- Lynch S., Houghton A.(1993). Cancer Immunology. Oncology 5(1):145-150.
- Marques, M. J., (1991). Probabilidad y Estadística para ciencias químico-biológicas. Ed. McGraw-Hill. México 657 pp.
- McMillan D.N, N.M Kernohan, M.E. Flett, S.D. Heys, D.J. Dechan, H.F. Sewell, F. Walker and O. Eremin. (1995). Interleukin 2 Receptor expression and interleukin 2 localisation in human solid tumour cell in situ and invitro: evidence for a direct role in the regulation of tumour cell proliferation. Int. J. Cancer: 60, 766-772.
- Meager A. (1991). Cytokines. Advanced reference series. Prentice Hall. U.S.A. pp7-78.
- Mizel S. B. (1989). The Interleukins FASEB J. 3:2379-2388.
- Mizuno K., Sone S., Orino E., Nii a., Ogura T. (1994). Autonomous expressions of cytokine genes by human lung cancer cell and their paracrine regulation. Cancer Res. 85(2):179-186.
- Moller A., Henz B., Grutzkau A., Lipper U., Aragane Y., Schwarz T., Kruger-Krasagakes S.(1998). Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cell. Immunology 93(2):289-295.
- Moradi M., Carson L., Weinberg B., Haney A., Twigg L., Ramakrishnan S. (1993). Serum and ascitic fluid levels of interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with ovarian epithelial cancer. Cancer 72(8):2433-2440.

Moriyama K., Williams P., Niewolna M., Dallas M., Uehara Y., Mundy G., Yoneda T. (1996). Herbimycin A, a tyrosine kinase inhibitor, impairs hypercalcemia associated with a human squamous cancer producing interleukin-6 in nude mice. *J Bone Miner Res* 11(7):905-911.

Moya G., González L., García Y., Huerta W., Araña M., Castellanos L and Morera V. (1999). Characterization of less hydrophobic species of mutated (Cys 126-Ala) recombinant human Interleukin-2. *Avances en biotecnología Moderna* 5: E9.

Muñoz N and Bosch F. (1999). Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological and perspectives for prevention. *Salud Pública México* 39(4):274-282.

Muraguchi A., Tago H., Kitagawa T., Nagata T., Kishi H. (1998). Stromal cells and cytokines in the induction of recombination activating gene (RAG) expression in a human lymphoid progenitor cell. *Leuk Lymphoma* 30(1-2):73-85.

Murray A.W, Hunt T. (1993). *The cell cycle: an introduction*. Oxford University Press, New York NY, USA. pp 1-65.

Nair A., Hirsch H., Colombi M., Moroni C. (1999). Cyclosporin A promotes translational silencing of autocrine interleukin-3 via ribosome-associated deadenylation. *Mol Cell Biol* 19(1):889-898.

Nakamura, Y., Russell, S. M., Mess, S. A., Friedmann, M., Erdos M., Francois, C., Jaques, Y., Adelstein, S., Leonard, W. D. (1994). Heterodimerization of the IL-2 receptor β - and γ -chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*, 369: 330-332.

Nelson, B. H., Lord, J. D., Greensberg, P. D. (1994). Cytoplasmic domains of the Interleukin-2 receptor β and γ mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature*. 369:333-336

Nilsen E., Johansen F., Jahnsen F., Lundin K., Scholz T., Brandtaeg P., Haraldsen G. (1998). Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cell from the human intestine. *Cytokine* 42(5):635-642.

Oettgen H. (1991). Cytokines in clinical cancer therapy. *Cancer* 3:699-705.

Offner F., Obrist P., Stadlmann S., Feichtinger H., Klingler P., Herold M., Zwierzina H., Hittmair A., Mikuz G., Abendstein B. (1995). IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells. *Cytokine* 17 (6):542-547.

Oh W., Revel M., Chebath J. (1996). A soluble interleukin-6 receptor isolated from conditioned medium of human breast cancer cells is encoded by a differentially spliced mRNA. *Cytokine* 8(5):401-409.

Okamoto M; Lee C; Oyasu R., (1997). Interleukin-6 as a Paracrine and Autocrine Growth Factor in Human Prostatic Carcinoma Cells *in vitro*. *Cancer Res* 57:141-146.

Ortiz L.O. (1987) *Inmunología* Ed. Interamericana México pp 7-53.

Pardee, B.A. (1989). G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. *Science*, 246:603.

Pastore C., Gaidano G., Ghia P., Fassone L., Cilia A., Gloghini A., Capello D., Buonaiuto D., Gonella S., Roncella S., Carbone A., Saglio G. (1998). Patterns of cytokine expression in AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *Brit J Haematol* 103(1):143-149.

Pontén J; Hans O.A; Reinhold B; Joakim D; Lars G.F; Leif G; Anthony B.M; Max P; Par S; and Dimitrois T: (1995) Strategies for global control of cervical cancer. *Int J Cancer* (60):1-26.

Post W (1996). The immune system. *Oncol Nurs* 12(29):89-96.

Reed M., Topping L., Coldham N., Purohit A., Ghilchik M., James V. (1993). Control of aromatase activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors. *Biochem Mol Biol* 44(4-6):589-596.

Rougier F., Cornu E., Praloran V., Denizot Y. (1998). IL-6 and IL-8 production by human bone marrow stromal cells. *Cytokine* 10(2):93-97.

Sato M., Iwakabe K., Ohta A., Sekimoto M., Kimura S., Nishimura T. (1999). Self-priming cell culture system for monitoring genetically-controlled spontaneous cytokine-producing ability in mice. *Immunology* 70(3):173-178.

Shih-Chung Hsu., Dorothy. G., Ashwani K., (1997) Interleukin-2 secretion by KHT sarcoma cells leads to loss of their vaccine potential. *Cancer Immunol Immunother* 44:117-124.

Sirota L., Straussberg R., Gurary N., Aloni D., Bessler H. (1999). Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J. Pediatric* 158(11):910-9113.

Song J., Haleem-Smith H., Arudchandran R., Gomez J., Scott P., Mill J., Tan T., Rivera J., (1999). Tyrosine phosphorylation of Vav stimulates IL-6 production in mast cells by a Rac/c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway. *Immunology* 163(2):802-810.

Soto C. I., Cáceres C. J., Mendoza R. J., Weiss S. B. (1999). Las citocinas en la hematopoyesis y sistema inmunológico: Mecanismos Celulares y Moleculares. Ed Plaza y Valdés Editores. México 347 pp.

Steinbach F., Tanabe K., Alexander J., Edinger M., Tubbs R., Brenner W. (1993). The influence of cytokines on the adhesion of renal cancer cells to endothelium. *5(2):169-172.*

Stock J., Coderre J., DeVito W., Baker S. (1998). Effects of human lymphocyte-conditioned medium on MG-63 human osteosarcoma cell function. *Cytokine* 10(8):603-612.

Stonans I., Stonane E., Russwurm S., Deigner H., Bohm K., Wiederhold M., Jager L., Reinhart K. (1999). HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes. *Cytokine* 11(2):151-156.

Svenson M., Hansen M., Ross C., Diamant M., Rieneck K., Nielsen H., Bendtzen K. (1998). Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant ant-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood* 91(6):2054-2061.

Tahara E. (1994). Cancer-stromal interaction through growth factor/cytokine networks implicated in growth of stomach cancer. *Princess Takamatsu Symp* 24:187-194.

Takahasi T., Mitsuhashi N., Sakurai H., Niibe H. (1995). Modifications of tumor-associated antigen expression on human lung cancer cells by hyperthermia and cytokines. *Anticancer Res* 15(6B):2601-2606.

Takizawa H., Ohtoshi T., Ohta K., Yamashita N., Hirohata S., Hirari K., Hiramatus K., Ito K. (1993). Growth inhibition of human lung cancer cell lines by interleukin-6 in vitro: a possible role in tumor growth via an autocrine mechanism. *Cancer Res* 53(18):4175-4181.

Taniguchi T and Yasuhiro Minami. (1993). The IL-2/IL-2 Receptor System: A current overview. *Review cell* 73:5.

Terranova P., Rice V. (1997). Cytokine involvement in ovarian processes. *J Reprod Immunol* 37(1):50-63.

Troye-Blomberg M., Worku S., Tangteerawatana P., Jamshaid R., Soderstrom K., Elghazail G., Moreta L., Hammarstrom M., Mincheva-Nilson L. (1999). Human gamma delta T cell that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Immunol* 50(6):642-650.

Vassiliadis S., Ranella A., Papadimitrion L., Makrygiannakis A., Athanassakis I. (1998). Serum levels of pro-and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion. *Mediators Inflamm* 7(2):69-72.

Wadhwa M., Meager A., Dilger P., Bird C., Dolman C., Das R., Thorpe R. (2000). Neutralizing antibodies to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-1 alpha and interferon-alpha but not other cytokines in human immunoglobulin preparations. *Immunology* 99(1):113-123.

Watson J., Berek J., Martinez-Maza O. (1993). Growth inhibition of ovarian cancer cells induced by antisense IL-6 oligonucleotides. *Gynecol Oncol* 49(1):8-15.

Werness A.B.(1995). Cáncer cervico-uterino: En busca de una etiología infecciosa. *Ciencia Básica de Oncología* pp 23-30

Yanase M., Tsukamoto T., Kumamoto Y.(1995). Cytokines modulate in vitro invasiveness of renal cell carcinoma cell through action on the process of cell attachment to endothelial cells. *Journal Urol* vol 153(3):844-848.

Zentella A, López R, Gómez E, Paredes R.E, Ibarra M.J, (1996). El ciclo celular su regulación: la interacción entre la proteínas cinasas cdk's y la familia de las ciclinas, *BEB*, 15: 4-15.

Zhang J., Nakatsugawa S., Niwa O., Ju G., Liu S. (1994). Ionizing radiation-induced IL-1 alpha, IL-6 and GM-CSF production by human lung cancer cells. *Chin Med* 107(9):653-657.

APÉNDICES

1) PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se mide aproximadamente el 90% del volumen final requerido de agua destilada y desionizada y se coloca en un recipiente de tamaño la más cercano posible a la medida del volumen final a preparar. La temperatura del agua debe ser de 15 a 20°C. Bajo agitación lenta y constante se adiciona el RPMI-1640 (RPMI-1640 Medium Sigma Chem. U.S.A.) Hasta su disolución, no debe aplicarse calor al agua. Con un volumen menor al 5% del total de agua se enjuaga el paquete que contenga el medio en polvo para remover cualquier traza de este que hubiera quedado adherido y se adiciona al recipiente.

A la solución obtenida se le adiciona 2.0 g de bicarbonato de sodio ó 26.8 ml de solución de bicarbonato de Sodio al 75% por cada litro de volumen final de medio a prepararse. El medio en su presentación comercial contiene ya el aminoácido L-glutamna, sin embargo, el cultivo celular requiere de una mayor concentración del mismo. Por tal motivo, en esta etapa de la preparación se adiciona L-glutamina (Sigma, Chem. U.S.A) en una concentración 2 mM. Para mantener condiciones de asepsia el medio es suplementado con 1000 U/ml de penicilina (Farmacéuticos Lakeside) y 1 mg/ml de estreptomina (Farmacéuticos Lakeside). La agitación es útil para la total disolución de estos compuestos.

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

Se adiciona la cantidad de agua requerida para complementar el volumen final y se esteriliza la solución filtrándola con membrana de poro de 0.22µ.

Composición del RPMI-1640

Sales inorgánicas	Concentración (g/l)
Nitrato de calcio 4H ₂ O	0.100
Sulfato de Magnesio anhidro	0.04884
Cloruro de Sodio	6.0
Fosfato Dibásico de Sodio anhidro	0.8

Aminoácidos

L-arginina	0.2
L-aspargina	0.050
L-ácido aspártico	0.20
L-cistina 2HCL	0.0652
L-ácido glutámico	0.2
L-glutamina	0.300
Glicina	0.10
L-histidina	0.015
L-hidroxiprolina	0.020
L-isoleucinas	0.050

L-leucina	0.050
L-lisina HCL	0.040
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.020
L-serina	0.030
L-treonina	0.020
L-triptofano	0.005
L-tirosina	0.02883
L-valina	0.020

Vitaminas

D-biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Acido-p-Amino Benzoico	0.001
Acudo-D-Pantoténico	0.00025
Piridoxina HCL	0.001
Riboflavina	0.0002

Tiamina HCL	0.001
Vitamina B-12	0.000005

Otros

D-Glucosa	2.0
Glutation reducido	0.001
HEPES	5.958

2) DESACTIVACIÓN DE SUERO

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

3) PREPARACIÓN DEL COLORANTE AZUL DE TRIPANO

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

4) SOLUCIÓN SALINA DE VERSENO

Esta solución se emplea para despegar células tumorales adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares.

Para su preparación se pesan las siguientes sustancias:

Tribase	3.04g
Cloruro de Sodio	8.00g
Cloruro de Potasio	0.40g
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA)	0.40g

Los reactivos (Sigma Chemical Co. U.S.A.) se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCL 10 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 minutos.

5) SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

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

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

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

6) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

PRUEBA DE HIPÓTESIS ACERCA DE LA DIFERENCIA DE DOS MEDIAS μ_1 Y μ_2 CON σ_1 Y σ_2 DESCONOCIDAS.

Esta prueba es utilizada cuando las desviaciones estándar poblacionales σ_1 y σ_2 no se conocen y se desea estimar la diferencia de medias poblacionales μ_1 y μ_2 . La prueba considera que las poblaciones están normalmente distribuidas, son aleatorias e independientes. Inicialmente se debe realizar una prueba de igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, antes de probar una hipótesis acerca de la diferencia de medias. Después de probar si las varianzas son iguales o diferentes se utiliza la prueba de hipótesis correspondiente (Marques, 1991).

Prueba de hipótesis acerca del cociente de dos varianzas σ_1^2 / σ_2^2 de dos poblaciones normalmente distribuidas.

Para comparar las varianzas se colocan en forma de razón σ_1^2 / σ_2^2 . Si las varianzas son iguales su razón es igual a 1. Para este caso se utilizan las varianzas muestrales s_1^2 y s_2^2 , al usar estos estimadores se sigue una distribución F de Fisher o distribución F, y el estadígrafo de prueba correspondiente es:

$$F_{\text{calculada}} = \frac{s_1^2}{s_2^2 R_0}$$

donde R_0 , es el valor supuesto del cociente de σ_1^2 / σ_2^2 . La hipótesis nula supone la igualdad de las varianzas: $H_0: \sigma_1^2 / \sigma_2^2 = 1$.

El valor de la $F_{teórica}$ para establecer las regiones de aceptación y rechazo de la H_0 , se obtiene de tablas considerando $\alpha = 0.05$ y como grados libres del numerador: $n_1 - 1$ y grados libres del denominador: $n_2 - 1$ (Marques, 1991).

Prueba de hipótesis acerca de la diferencia de dos medias μ_1 y μ_2 con σ_1 y σ_2 desconocidas e iguales.

Cuando se cumple la igualdad de las varianzas, el estadígrafo de prueba para la hipótesis sobre la diferencia de medias poblacionales es:

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{X} - \Delta_0}{s_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

donde $\Delta_0 = 0$ y s_p es la varianza común de las dos muestras s_1^2 y s_2^2 , las cuales no son exactamente iguales, sino significativamente diferentes, y se calcula:

$$s_p = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

La hipótesis nula supone la igualdad de medias: $H_0: \mu_1 = \mu_2$ o $\mu_1 - \mu_2 = 0$

El valor de la $t_{teórica}$ para establecer las regiones de aceptación y rechazo de la H_0 , se obtiene de tablas considerando $\alpha = 0.05$ y como grados libres: $n_1 + n_2 - 2$ (Marques, 1991).

Prueba de hipótesis acerca de la diferencia de dos medias μ_1 y μ_2 con σ_1 y σ_2 desconocidas y diferentes.

Cuando no se cumple la igualdad de las varianzas, el estadígrafo de prueba para la hipótesis sobre la diferencia de medias poblacionales es:

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{X} - \sigma_0}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

donde $\sigma_0 = 0$ y la hipótesis nula supone la igualdad de medias: $H_0: \mu_1 = \mu_2$ o $\mu_1 - \mu_2 = 0$

El valor de la $t_{teórica}$ para establecer las regiones de aceptación y rechazo de la H_0 , se obtiene de tablas considerando $\alpha = 0.05$ y como grados libres (Marques, 1991):

$$gl = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1+1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2+1}} - 2.$$