

50322  
28



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

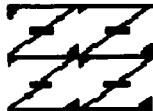
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA  
CARRERA DE BIOLOGÍA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR  
Y CÁNCER  
LABORATORIO DE ONCOLOGÍA

"REDUCCIÓN DE TUMORES DE CARCINOMA DE CÉRVIX  
INDUCIDOS EN RATONES SINGÉNICOS DE LA CEP  
CBA/ca POR LA ADMINISTRACIÓN DE IL-2 Y  
PROTEÍNAS DE FUSIÓN ENCAPSULADAS  
EN LIPOSOMAS POSITIVOS"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
MIRIAM ENRIQUETA NIEVES RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS:  
M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA

ASESORA:  
DRA. TERESA CORONA VALDÉZ



Lo Humano Eje  
de Nuestra Reflexión

MÉXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*Mi sincero agradecimiento a todo aquel  
organismo del Laboratorio.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A toda la gente que tuve la oportunidad de conocer durante mi travesía estudiantil en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM y me dio la oportunidad de aprender y conocer los valores humanos.

Todos mis amigos (Eric Hernández Hernández, Lilia Mondragón Urbina, Alejandro Abundis Santamaría, Rigoberto Rodríguez Becerra, Jaime López Aguayo, Guadalupe Ávila Rivera, Lourdes Alonso De la Rosa, Laura Ventura Ayala) quienes además de ser a todo dar, me escucharon y apoyaron en todo momento.

Al M. en C. Antonio Alvarado Moreno, por brindarme sus enseñanzas.

Al Sr. Ricardo Gerardo Silvestre y la Sra. Elia Roldán Sinbrón quienes sin su ayuda y apoyo no hubiese podido dar una en el manejo y cuidado de los ratones en el Bioterio.

A la Dra. Martha Legorreta Herrera, quien me brindó su apoyo en la obtención de las ratoncitas de la cepa CBA/ca.

Al Dr. Miguel Ibáñez del Laboratorio de Biomembranas IPN por brindarme su apoyo y asesoría en la preparación de los liposomas catiónicos.

Al Sr. Javier Velázquez M, por proporcionarme su ayuda en la inclusión de tumores y cortes histológicos.

Al Sr. José Chavarría y Sr. Ranulfo Pedraza quienes siempre tuvieron el material, los reactivos y equipo listos para mis ensayos.

A la Dra. Elia Roldán y al Dr. Mario Altamirano del Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, quienes me brindaron su apoyo para las fotografías de los cortes histológicos.

A mis sinodales (Dr. Benny Weiss Steider, Dra. Teresa Corona Ortega, M. en C. Luis Sánchez Sánchez, M. en C. Rosalva Rangel Corona y Dr. Enrique Mendieta ), por sus acertadas recomendaciones y sugerencias.

A todos los profesores que integran a la UIDCC por sus conocimientos, sugerencias y apoyo. En especial al Dr. Alberto Monroy y el M. en C. Jorge Hernández

**MUCHAS GRACIAS A TODOS**

**TESIS CON  
FALLA DE URGEN**

## **DEDICATORIAS**

**A ti Oswaldo Partida Rodríguez, quien siempre has sido mi amigo, mi apoyo, mi aliento de esperanza y sobre todo me haz ofrecido siempre tu amor incondicional.**

**A ti Mamá, que siempre has tenido para mi las palabras apropiadas para poder valorar lo que tengo.**

**A ti Papá, que me has consentido toda la vida.**

**A mis hermanos Paco e Iván y mis sobrinos (Sebitas, Ivana, Prisma y Mauricio) quienes me han apoyado con su cariño y respeto.**

**En especial a ti Tío Poncho<sup>1</sup> y toda mi familia: Abuelita Chuy, Tía Lili, Tía Sonric's, Tía Lucas, Tía Dulce, Tío Ale, Tío Alfre, Betza, Dulce, Iris, Bere, Karla, Ana, Lucerito y Jimena.**

**A la Sra. Gloria Ángeles Rodríguez Hernández y toda su familia, quien me ha brindado siempre su apoyo, amistad y cariño.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA Y LA ASESORÍA DE LA DRA. TERESA CORONA VALDÉZ.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

DURANTE EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYADO ECONÓMICO DEL PROGRAMA DE BECAS PARA TESIS DE LICENCIATURA EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN (PROBETEL) DE FUNDACIÓN UNAM.

ASIMISMO POR EL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PROYECTO: IN215300).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
Sistema Inmunológico	5
Citocinas	9
Interleucina 2 (IL-2)	9
Receptor de Interleucina 2 (RIL-2)	11
Presencia de RIL-2 en células tumorales	13
Receptor para el Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR)	13
Presencia del Receptor de HER2/ <i>neu</i> (RHER2/ <i>neu</i> ) en células tumorales	17
Anticuerpos Monoclonales	17
Anti HER2/ <i>neu</i> (Trastuzumab, Herceptin o TANL)	18
Proteínas de Fusión (Anticuerpos Biespecíficos)	19
Proteína de Fusión "TAPW" (anti-HER2/ <i>neu</i> -IL-2)	20
Inmunoterapia con IL-2	20
Liposomas	21
Carcinoma Cérvico-uterino (CaCu)	23
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>26</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>83</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>84</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>85</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>100</b>

TESTIS COM  
FALLA DE ORIGEN

G



## RESUMEN

La capacidad de IL-2 para modular la respuesta inmunológica mediada por células T ha permitido que sea utilizada como una buena alternativa de terapia clínica. Sin embargo, su aplicación vía sistémica genera alteraciones fisiológicas que causan otros trastornos, por lo que se ha buscado disminuir sus efectos colaterales encapsulándola en liposomas.

Otra alternativa que ha presentado grandes beneficios en pacientes con cáncer, es el uso de anticuerpos monoclonales para receptores que se sobreexpresan en células tumorales, tal como el anti-HER2/*neu* (TANL). La transfección genética de estos anticuerpos monoclonales con la IL-2 ha generado proteínas de fusión que conservan la especificidad del anticuerpo y las propiedades inmunológicas de la citocina, un ejemplo de ello es la proteína de fusión TAPW (anti-HER2/*neu*-IL-2).

En este estudio se evaluó el efecto de TAPW en forma libre y encapsulada en liposomas catiónicos sobre cultivos de la línea de Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu) INBL y su efecto en masas tumorales inducidas con la línea INBL en la cepa de ratones singénicos CBA/ca y compararlas con el efecto que tiene la IL-2.

Los resultados demostraron que la proliferación *in vitro* de la línea INBL se ve inhibida con TAPW en concentraciones de 100 UI/ml y estimulada al usar concentraciones de 1 y 10 UI/ml, presentando un comportamiento semejante al encontrado para la IL-2. Sin embargo, el tiempo de respuesta a IL-2 o TAPW es diferente ya que TAPW es capaz de producir los mismos efectos que IL-2 veinticuatro horas antes que ésta, lo cual muestra la eficiencia de TAPW sobre IL-2.

En los ensayos *in vivo* el resultado más sobresaliente del presente trabajo fue el efecto que causó TAPW libre y encapsulada en bajas concentraciones (1 y 10 UI/ml) ya que se observaron reducciones de masas tumorales en un porcentaje similar al de aquellos ratones tratados con IL-2 en altas

TRIS CON  
FALLA DE ORIGEN

concentraciones (100 UI/ml), no obstante, existen diferencias relevantes en la disminución de los efectos colaterales provocados por altas concentraciones de IL-2.

Por otro lado, se comprobó la naturaleza neoplásica y el origen de las masas inducidas con células de CaCu INBL en ratones CBA/ca, a través de un análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos anti-citoqueratinas del tipo 10/13 y 18 en cortes histológicos de los tumores encontrados. También se detectó la mayor cantidad de cuerpos celulares infiltrantes en los cortes de tumores provenientes de ratones que no fueron inmunosuprimidos.

Con los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, proponemos que TAPW, puede ser utilizada como alternativa terapéutica en pacientes con CaCu dado que esta vía permite dirigir IL-2 a las células tumorales disminuyendo su masa, además de reducir los efectos colaterales asociados a esta citocina.

TRABAJOS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu), representa aproximadamente un 30 por ciento de todos los padecimientos y muertes por cáncer en las mujeres mexicanas (**Cáceres et al., 2001**), así como, entre las mujeres de otros países del tercer mundo (**Polednak, 1993; González et al., 1995**). El CaCu es una enfermedad progresiva, por lo cual los investigadores la dividen en estadios del I al V (**Pontén et al., 1995**).

El conocimiento de los efectos de citocinas como la IL-2, que activa células de la respuesta inmunológica, ha permitido realizar diversos estudios cuyo objetivo es encontrar la mejor manera de aplicarla como terapia clínica contra el cáncer (**Talmadge et al., 1987; Loeffler et al., 1991; Gridley et al., 1993; Vuist et al., 1993; Zeng et al., 1994; Harvill et al., 1996a; Meager, 1998**). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la línea celular de CaCu INBL inhibe su proliferación al ser estimulada *in vitro* con altas concentraciones de IL-2 (**Alvarado, 1997**). Sin embargo, IL-2 produce graves alteraciones fisiológicas como: alteración en vías de regulación hematopoyética, síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolores de cabeza, edema, oliguria e hipotensión que la hacen tener un empleo restringido (**Talmadge et al., 1987; Smith, 1988; Maas et al., 1993; Smith, 1993; Ardizzoni et al., 1994; MacFarlane et al., 1994; Becker et al., 1996 a y b**). Por lo anterior, actualmente se realizan investigaciones para activar una respuesta antitumoral con IL-2 disminuyendo sus efectos colaterales tóxicos.

Por otra parte se ha demostrado que el receptor HER2/*neu* se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de células cancerosas, entre ellas el CaCu, llegando a rebasar 5 veces su expresión normal y en las últimas dos décadas se han producido anticuerpos monoclonales que bloquean la activación de este receptor en células tumorales. De hecho, un anticuerpo anti-HER-2/*neu* (4D5), conocido como Trastuzumab (Herceptin) o TANL, que reconoce el dominio extracelular del RHER-2/*neu*, ha presentado grandes beneficios al ser aplicados

en pacientes con cáncer de mama (**Baselga et al., 1998; Baselga et al., 1999; Sliwkowski et al., 1999**).

Otra terapia prometedora se basa en el uso de la proteína de fusión creada por el Dr. Penichet de la Universidad de Los Angeles California (UCLA) a través de la transfección genética del anticuerpo anti-HER2/*neu* con el gen de la citocina IL-2, llamada TAPW (**Chen et al., 1994; Challita et al., 1998 a y b; Peng et al., 1999**). Dicha proteína cuenta con la especificidad del anticuerpo por el receptor HER2/*neu* en las células tumorales y al mismo tiempo con las propiedades de la IL-2, de manera que la citocina puede ser aplicada en altas concentraciones garantizando que su efecto estará localizado preferentemente en la vecindad tumoral, induciendo la respuesta inmunológica y reduciendo efectos colaterales.

Una opción más para reducir los efectos secundarios de la IL-2 ha sido el uso de liposomas (**Khanna et al., 1997 a y b; Moran, 2000**), que han funcionado como acarreadores de drogas o como parte activa de ellas. Su uso ha demostrado que son muy eficaces como acarreadores pues se modifica drásticamente la farmacocinética del material encapsulado y porque se reducen sus efectos tóxicos. Por esta razón, se decidió encapsular TAPW y TANL en liposomas catiónicos y comparar su efecto antitumoral con el de la IL-2 tanto libre como encapsulada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MARCO TEÓRICO

### SISTEMA INMUNOLOGICO

El sistema que se encarga de la vigilancia y protección del organismo es conocido como Sistema Inmunológico. Éste se encarga de eliminar microbios, virus, sustancias y moléculas externas que actúan como antígenos (**Abbas et al., 1994**). El Sistema Inmunológico tiene la capacidad de reconocer diferentes antígenos y genera una respuesta contra ellos, además de mantener a su vez, una tolerancia con los componentes del propio organismo.

Existen dos mecanismos dependientes uno de otro a través de los cuales el Sistema Inmunológico genera una respuesta para defender al organismo: uno es la inmunidad innata y el otro es la inmunidad adaptativa. La finalidad de ambos mecanismos es la eliminación de antígenos, cada uno de estos mecanismos difieren en la manera específica para reconocer antígenos (**Regueiro y Lopez, 1996; Lydyard et al., 2000**).

La inmunidad innata, se caracteriza por ser la primera línea de defensa del organismo, en ella participan los neutrófilos, macrófagos-monocitos y células asesinas naturales (NK); el mecanismo que emplean para lograr su función es la fagocitosis que da como resultado la inhibición y muerte del antígeno (**Langman, 1989; Lydyard et al., 2000**). Fig. 1 y Tabla 1

En la inmunidad adquirida participan los linfocitos T, B y moléculas de membrana; que promueven la lisis, inhibición y muerte de las células blanco antigénicas (**Abbas et al., 1994; Monroe y Rothenberg, 1998**). Este mecanismo específico, se subdivide a su vez en inmunidad adquirida humoral e inmunidad adquirida celular, dependiendo de las células participantes en cada uno de estos procesos.

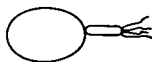
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 1.** Características principales del sistema inmunológico, localización y moléculas que generan la respuesta de la inmunidad innata y adquirida.

<b>Características</b>	<b>Células que participan</b>	<b>Moléculas que median esta actividad</b>
<b>Inmunidad Innata</b> Presentan una rápida respuesta.	Células polimorfonucleares (PMNs)	Citocinas
Tienen alguna especificidad.	Macrófagos	Complemento
No presentan memoria.	Células Naturales Asesinas (NK)	
	Basófilos	
	Células dendríticas	
<b>Inmunidad Adquirida</b> Presenta una gradual respuesta.	Células T y B	Anticuerpos o Inmunoglobulinas
Tiene alta especificidad.		Citocinas
Presentan memoria.		

Tomado de Lydyard *et al.*, 2000

**Fig. 1** Procesos de la Fagocitosis. Las células encargadas reconocen al antígeno (célula tumoral o bacteria) y hacen contacto con él (adhesión). La célula de la inmunidad Innata endocita a la célula blanca para lisaarla y matarla (ingestión y digestión) por medio de mecanismos complejos propios de la célula (neutrófilo, macrófago) Tomado de Langman, 1989.



adhesión



ingestión



digestión

En la inmunidad adquirida humoral, participan los linfocitos B que al diferenciarse producen anticuerpos (Ab) específicos para el antígeno que los estimula, éstos se encuentran alojados en el plasma sanguíneo, mientras que la inmunidad adquirida celular, se activa cuando son los linfocitos T, quienes participan en el reconocimiento de antígeno a través de células presentadoras de antígeno y que promueven la secreción de citocinas que a su vez estimulan células efectoras que eliminan a la célula infectada. Es importante mencionar que estos dos subgrupos de inmunidad específica, funcionan conjuntamente, ya que presentan una serie de interacciones a través de las citocinas secretadas, estimulándose mutuamente para eliminar a los antígenos (**Monroe y Rothenberg, 1998; Lydyard et al., 2000**). Fig. 2

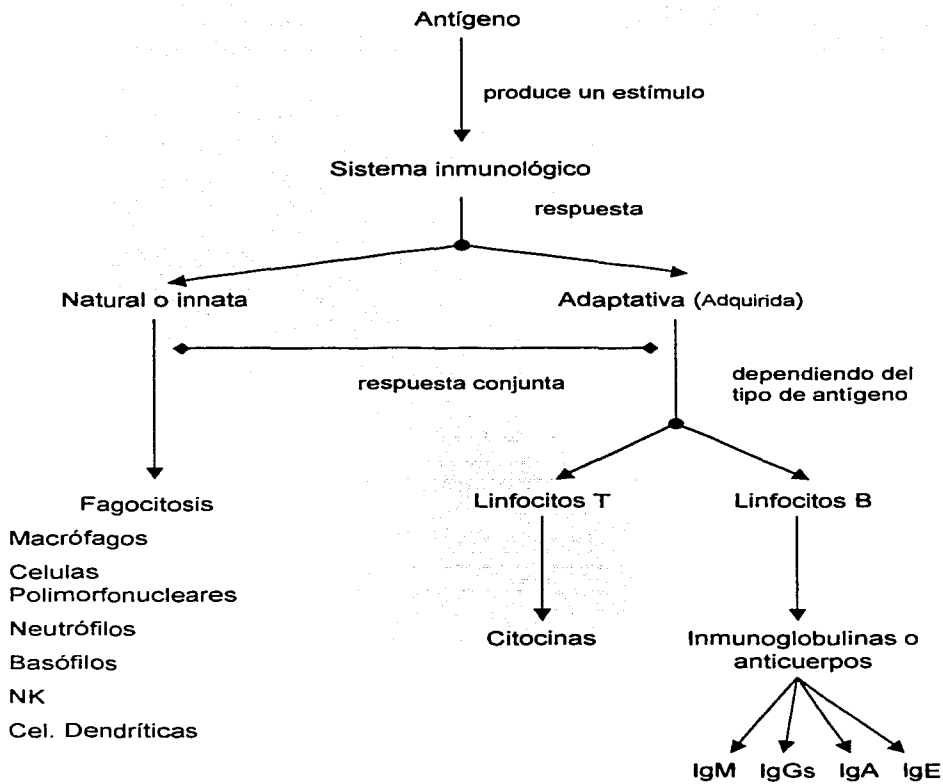


Figura 2. Mecanismos de acción del sistema inmunológico al recibir un estímulo por parte de un antígeno. Cuando el Sistema Inmunológico es activado por un antígeno, éste genera una serie de mecanismos de defensa (inmunidad innata e inmunidad adquirida (humoral y celular)), los cuales a su vez se estimulan para lisar, inhibir y matar a las células blanco. Tomado de Langman, 1989.



## CITOCINAS

Fue el Dr. S. Cohen en 1974, quien usó la palabra "citocina" para describir cualquier sustancia soluble producida por células, que ejercía efectos específicos en sus células blanco (**Meager, 1991**).

Las citocinas son secreciones de diversos tipos celulares como linfocitos T y macrófagos del sistema inmunológico en respuesta a un antígeno. Las funciones de las citocinas son diversas, pero las principales son: generar señalizaciones autócrinas, parácrinas y endócrinas en diferentes células, inducir la proliferación, diferenciación y activación de distintas poblaciones celulares, aumentar la citotoxicidad de las células tales como: las polimorfonucleares, macrófagos, células asesinas naturales y regular la respuesta inmunológica (**Warrens y Lechler, 1992; Lydyard et al., 2000**).

Entre las citocinas se encuentran las linfocinas, monocinas, quimioquinas, interleucinas, interferones y factores estimuladores de colonias, que se secretan en respuesta a estímulos directos o indirectos.

Históricamente, las citocinas han sido usadas en cuatro áreas de investigación principalmente (**Oettgen, 1991**): Virología, con el uso de interferones (**Oettgen, 1991**), Inmunología, con el uso de interleucinas (**McMillan et al., 1995; Han et al., 1996**), Hematología, usando factores estimuladores de colonias (**Dela Cruz et al., 2000**) y Biología Celular, usando factores polipeptídicos de crecimiento (**Meager, 1991**).

## INTERLEUCINA 2 (IL-2)

La Interleucina 2 (IL-2) es una citocina de 133 aa, secretada principalmente por Linfocitos T y macrófagos activados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fue originalmente descrita como un "Factor de crecimiento de células T" y en el Segundo Taller Internacional de Linfocinas (Suiza, 1979) se le renombra como Interleucina 2 (IL-2). El gen para IL-2 humana está presente en el cromosoma 4q26-28; la molécula natural contiene tres residuos cisteínicos en las posiciones 58, 105 y 125; dos de los cuales (58 y 105) forman enlaces disulfuros que son esenciales para la actividad de la molécula. Es una glucoproteína de 13 a 17.5 kDa y con punto isoeléctrico entre 6.6 y 8.2, es una molécula hidrofóbica la cual es estable en pH bajo. (Mire-Sluis y Thorpe, 1998)

La IL-2 es producida por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Las subpoblaciones T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 de células T cooperadoras también pueden producirla y son las células T<sub>H</sub>1, las que presentan una mayor secreción, comparadas con las células T<sub>H</sub>2. Algunos clones de las células T, líneas e hibridomas, también la producen (Mire-Sluis y Thorpe, 1998; vanderSpek *et al.*, 1996; Coventry, 1996).

Una función de la IL-2 es la activación de leucocitos, aunque existe también una activación menor en otros tipos celulares. Como muchas citocinas, la IL-2 estimula a células que pueden secretar otras citocinas y sustancias con actividad biológica, que pueden medir efectos secundarios.

La IL-2 estimula la proliferación de los linfocitos T, actúa en todas las poblaciones de células T y promueve su progresión desde la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, lo que permite un incremento en el número celular; asimismo, estimula la actividad citolítica de subtipos de linfocitos T, aumenta la motilidad de linfocitos T e induce la secreción de otras citocinas como: INF- $\gamma$  (Smith, 1988; Smith, 1993), IL-1, IL-3 (Mass *et al.*, 1989; Mass *et al.*, 1993), IL-4 (Hassuneh *et al.*, 1997), IL-5, IL-6 (Schaafsma *et al.*, 1991; Buchli *et al.*, 1997), IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, TNB- $\alpha$  y TNF- $\beta$  (Anderson y Sorenson, 1994; Coventry *et al.*, 1996; vanderSpek *et al.*, 1996; Mire-Sluis y Thorpe, 1998). En timocitos se ha demostrado que la IL-2 tiene un efecto proliferador, por lo que juega un papel importante en el desarrollo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

tímico (**Mire-Sluis y Thorpe, 1998; Avice et al., 1999**). La IL-2 promueve la secreción de inmunoglobulinas y genera un aumento en los efectos inmunológicos mediados por linfocitos B (**Ciacchi et al., 1993; Han et al., 1996; Hassuneh et al., 1997; Vella et al., 1998**). Promueve la proliferación de linfocitos granulares largos; aumenta la actividad celular de las células asesinas naturales (NK) y células asesinas activadas por citocinas (LAK) haciéndolas más eficientes (**vanderSpek et al., 1996**). Aumenta la actividad antitumoral de los macrófagos dependiendo del anticuerpo y oligodendrocitos (**Mire-Sluis y Thorpe, 1998**).

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

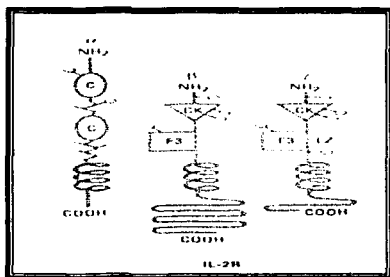
Para que las citocinas lleven a cabo su función, que es transmitir señales que activarán diversos mecanismos de señalización dentro de la célula, primero se deben unir a su receptor (**Bell et al., 1995; Regueiro y Lopéz, 1996**).

El receptor de IL-2 (RIL-2) pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento hematopoyético, está conformado por tres glucoproteínas: La cadena  $\alpha$ , que es una glucoproteína de aproximadamente 55 Kda cuya expresión depende de la activación de células T (**Kaplan, 1991; Mire-Sluis y Thorpe, 1998**). La Tac p55 o cadena  $\alpha$ , es codificada por un gen en el cromosoma 10p 14-15 y une a IL-2 con una baja afinidad ( $10^{-8}$  M Kd).

El segundo componente del RIL-2, es una glucoproteína de 70 a 75 Kda (p70 o p75) conocida como cadena  $\beta$ ; es codificada por un gen en el cromosoma 22 q 11.2-12. Su afinidad para su ligando es intermedia ( $10^{-7}$  M Kd). La tercera cadena llamada  $\gamma$  es una glucoproteína de 64 Kda, codificada por un gen en el cromosoma Xq13, la cual es necesaria para la internalización y señalización de IL-2. El RIL-2 compuesto por las tres cadenas ( $\alpha, \beta$  y  $\gamma$ ) presenta la máxima afinidad por IL-2 ( $10^{-11}$  M Kd) y es el que promueve la proliferación de los linfocitos T (**Taniguchi y Minami, 1993; Mire-Sluis y Thorpe, 1998**). Fig. 3

Fig. 3 Cadenas glucoproteicas que conforman al Receptor de IL-2 (RIL-2). Tomado de Klein y Horejsi, 1997.

El RIL-2 pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento hematopoyético. Está conformado por tres glucoproteínas llamadas cadena  $\alpha$  de 55 Kda, cadena  $\beta$  de 70 a 75 Kda y cadena  $\gamma$  de 84 Kda. Es el RIL-2 conformado con las tres cadenas el que presenta una mayor afinidad por IL-2.



Existen diferentes combinaciones de las cadenas del RIL-2, con diferente constante de asociación a IL-2 (Taniguchi y Minami, 1993; Nakamura *et al.*, 1994) Cuadro 1.

Cuadro 1. Combinaciones de las tres cadenas del RIL-2, mostrando su afinidad de unión dado por la constante de disociación (kd) e indicando que subunidades pueden activar la transcripción.

Subunidad (combinación)	Afinidad de unión (Kd) para IL-2	Activación de la señal de transcripción de IL-2/RIL-2
$\alpha$	$10^8$ M	-
$\beta$	$10^7$ M	-
$\gamma$	No se detecta anclaje	-
$\alpha\beta$	$10^{10}$ M	-
$\alpha\gamma$	$10^8$ M	+
$\beta\gamma$	$10^9$ M	+
$\alpha\beta\gamma$	$10^{11}$ M	+

Se determinó en fibroblastos transfectados con DNAc Tomado de Taniguchi y Minami, 1993

Se ha comprobado que el heterodímero de IL-2  $\beta\gamma$ , es necesario para llevar a cabo la señalización intracelular. Evidencias de esta señalización son la fosforilación de proteínas tales como la cinasa Raf-1 específica de serina/treonina,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

la fosforilación de STAT3 y STAT5 por la vía de JAK3, el rápido incremento en el pH intracelular, el cual activa los puentes de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la activación de la tirosina cinasa *src* que es responsable de la proliferación celular (Nakamura *et al.*, 1994; Mire-Sluis y Thorpe, 1998).

## PRESENCIA DEL RIL-2 EN CÉLULAS TUMORALES

El Receptor para IL-2 (RIL-2), no se encuentra exclusivamente en células hematopoyéticas ya que se ha observado su presencia en células pancreáticas y fibroblastos de pulmón, así como en células neoplásicas de tumores sólidos humanos, tales como: mama, colorectal, pulmón, hígado, células epiteliales intestinales, renal y melanomas (Maas *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1991; Ciacci *et al.*, 1992; McMillan *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1996; Mire-Sluis y Thorpe, 1998; Lustgarten *et al.*, 1999).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia del RIL-2 en células de carcinoma de cérvix, tanto en cortes histológicos como en cultivos celulares. Además, experimentos realizados con las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL, establecidas en nuestro laboratorio, demostraron que altas concentraciones de IL-2 tienen un efecto inhibitorio sobre su proliferación *in vitro* y que su receptor es funcional porque se detectó la presencia de las tres cadenas que lo conforman (Alvarado, 1997).

## RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFR)

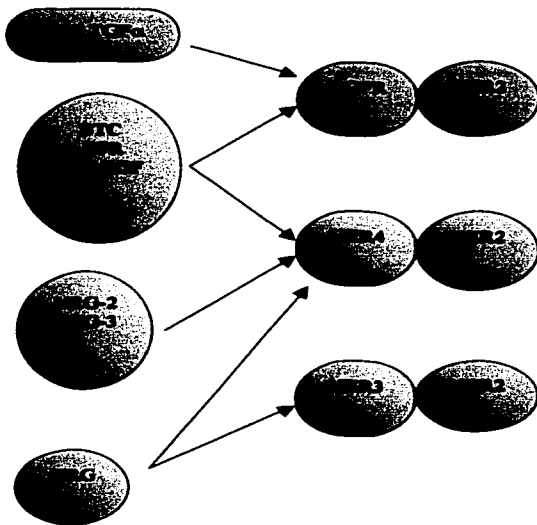
El Receptor para el Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR), es miembro de la familia de receptores de superficie celular *erbB*. Esta familia está compuesta de cuatro receptores: EGFR o *erbB-1/HER1*, *erbB-2 (HER2/neu)*, *erbB-3 (HER3)* y *erbB-4 (HER4)*. En células de alto recambio la expresión de estos receptores es

bajo. Su estructura conformacional está compuesta de: un dominio extracelular que sirve de anclaje para su ligando, rico en cisteína, un segmento transmembranal y un dominio intracelular proteico, el cual presenta actividad intrínseca de tirosina cinasa que puede llevar a cabo la señal de transducción (Penichet *et al.*, 1999 a; Mendelsohn y Baselga, 2000; Molina *et al.*, 2001).

Estos receptores se activan cuando forman dímeros, ya sea entre ellos mismos (homodímeros) o entre receptores distintos de la misma familia (heterodímeros) (Baselga y Averbuch, 2000; Mendelsohn y Baselga, 2000). De estos, los heterodímeros donde HER2/*neu* esta presente son los que pueden activar la vía de señalización de factores de crecimiento como: EGF, TGF- $\alpha$ , AR, BTC, EPR, HB-EGF, NRG-2 y 3 y HRG involucrados en la proliferación celular (Silwowski *et al.*, 1999). Fig. 4.

Para el caso EGFR se propone que la activación de la región tirosina-cinasa, fosforila diversas vías intracelulares, en particular en aquellas donde el complejo ligando-receptor incluye a HER2/*neu*, como Ras/Raf/MEK/MAP/p62<sup>TCF</sup>, c-myc así como Ras/MEKK/SEK/SAPK/c-jun que tienen una gran participación en el estímulo de la proliferación celular (Hung y Lau, 1999; Silwowski *et al.*, 1999; Albanell *et al.*, 2001) Fig. 5.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Tomado de **Sliwkowski et al., 1999**

**Figura. 4. Representación esquemática de factores intracelulares que permiten las heterodimerizaciones de la familia de receptores para factores de crecimiento epidérmico (HER). Entre las heterodimerizaciones que se encuentran más comúnmente entre receptores de la familia EGFR están EGFR/HER2/neu, HER4/HER2/neu, HER3/HER2/neu, los cuales activan a factores como TGF $\alpha$ , HB-EGF, NRG-2 que están involucradas en la proliferación celular tumoral.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

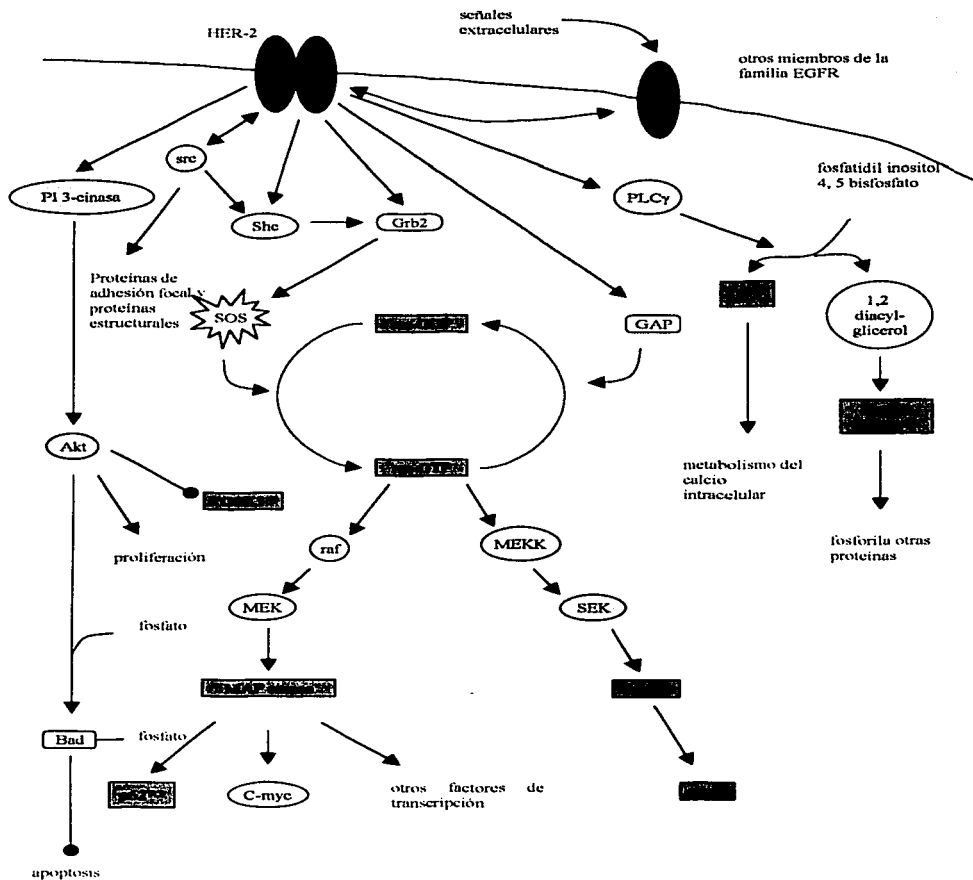


Figura 5. Representación de algunas vías de señalización estimuladas a través de la homodimerización *HER2<sup>neu</sup>:HER2<sup>neu</sup>*. Se ha observado que el homodímero *HER2<sup>neu</sup>:HER2<sup>neu</sup>* es el más agresivo de todos los homodímeros de la familia de EGFR, debido a que permite la activación de diferentes vías de señalización intracelular que conducen la transcripción de proteínas como *p62<sup>src</sup>*, *c-myc*, *c-jun* y otros factores de proliferación. Tomado de Hung y Lippman, 1998

TEMA CON FALLA DE ORIGEN



## PRESENCIA DEL RECEPTOR DE HER2/*neu* (RHER2/*neu*) EN CÉLULAS TUMORALES

El gen HER-2/*neu* (*c-erbB-2/neu*) está ubicado en el cromosoma 17q21 y codifica una proteína transmembranal p185 con actividad tirosina-cinasa estructuralmente semejante al EGFR. Este gen puede ser alterado por una mutación puntual o amplificación, creándose un oncogén el cual presenta alteraciones en su funcionamiento y expresión (Slamon *et al.*, 1989; Kersemaekers *et al.*, 1999).

La sobreexpresión del oncogén HER2/*neu* fue inicialmente detectada en cáncer de mama y ovario (Schneider *et al.*, 1994; Hung y Lau, 1999), posteriormente se observó sobreexpresado en adenocarcinomas de pulmón, de tracto gastrointestinal, colorectal, bucal, así como en CaCu (Hung *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1997; Brossart *et al.*, 1998; Hung y Lau, 1999; Kersemaekers *et al.*, 1999; Mitchell y Press, 1999).

Algunos investigadores informan que la sobreexpresión del oncogén HER2/*neu* es un mal pronóstico para los pacientes con cáncer ya que este oncogén se asocia potencialmente al desarrollo de metástasis y puede generar quimioresistencia a drogas, aunque esta última característica no está claramente comprobada (Hung *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1997; Hung y Lau, 1999; Ravidin, 1999). Sin embargo, en la actualidad existen anticuerpos comerciales dirigidos contra el oncogén HER2/*neu* que inhiben la proliferación de carcinoma de mama.

### ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales (MoAb<sub>s</sub>) son actualmente usados para combatir y tratar diferentes tipos de cánceres humanos (Winter, 1998). Las terapias con anticuerpos ofrecen considerables ventajas con respecto a la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Radioterapia y a la Quimioterapia, que aunque solas o en conjunto, han tenido resultados prometedores en pacientes con una variedad de cánceres sólidos o hematológicos, su aplicación produce graves efectos secundarios así como resistencia al tratamiento empleado (Weissman, 1985; Weiner, 1999).

Actualmente los MoAbs, así como sus fragmentos, se usan para el diagnóstico y terapia en un 30 por ciento de los tratamientos clínicos contra cáncer de mama y gastrointestinal (Colchiovius *et al.*, 1999; Hudson, 1999).

Se ha demostrado que los tratamientos con anticuerpos monoclonales son más selectivos. Algunos de los criterios empleados para aplicar esta terapia son: la presencia de una alta afinidad de anclaje al antígeno tumoral, la sobreexpresión del antígeno en la superficie de las células tumorales, expresión del antígeno específico de tumor y la mediación de la toxicidad celular por el anticuerpo. De estos la sobreexpresión es el más relevante para elegir una terapia con MoAbs (Penichet y Morrison, 2001).

#### **Anti-HER2/*neu* (Trastuzumab, Herceptin o TANL)**

Actualmente hay varios MoAbs, dirigidos contra el receptor HER2/*neu* para inhibir la proliferación celular de aquellas células que lo sobreexpresan (Pergram *et al.*, 1998; Baselga *et al.*, 1999; Pergram y Slamon, 1999; Shack, 1999; Weiner, 1999; Baselga y Averbuch, 2000; Molina *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001).

Los MoAbs, anti-HER2/*neu* han recibido diferentes nombres, siendo el anticuerpo monoclonal de ratón 4D5-8 (anti-HER2/*neu*), dirigido contra el dominio extracelular del RHER2/*neu* el mas empleado porque su mecanismo de acción es inhibir el crecimiento tumoral (Shack, 1999; Penichet *et al.*, 1999 a). Debido a sus efectos inmunogénicos los MoAbs, de ratón tienen uso clínico limitado, de ahí que

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

el equivalente al MoAb 4D5-8 fuera producido por células humanas; actualmente se comercializa como Trastuzumab (Herceptin) y es empleado en diferentes fases clínicas en cáncer de mama con resultados alentadores (**Baselga et al., 1999; Fleming, 1999; Osoba y Burchmore, 1999; Shack, 1999; Molina et al., 2001**). Sin embargo, es bajo el porcentaje de los pacientes que muestran los beneficios del Trastuzumab (**Ewer et al., 1999; Dela Cruz et al., 2000; Molina et al., 2001**); por lo que, en la actualidad se desea mejorar su actividad conjugándolo con isótopos, drogas, citocinas y toxinas, dando origen a nuevas moléculas conocidas como proteínas de fusión (**Chiao, 1988; Skrepnik et al., 1996**).

#### **PROTEÍNAS DE FUSIÓN (Anticuerpos biespecíficos)**

Mediante técnicas de ingeniería genética, se han producido anticuerpos biespecíficos que sirven de tratamientos inmunoterapéuticos contra el cáncer que mejoran la respuesta antitumoral directa o indirecta cercana al microambiente tumoral (**Hank et al., 1996; Barouch et al., 1998**), evitando efectos tóxicos o secundarios que muchas drogas o citocinas inducen (**Becker et al., 1996 a y b; Harvill et al., 1996; Harvill y Morrison, 1996; Bulfone-Paus et al., 1998; Challita et al., 1998 a y b; LeMaistre et al., 1998; Melani et al., 1998; Penichet et al., 1999 b; Bulfone-Paus et al., 2000**).

Por tal motivo, se ha empleado al anticuerpo Trastuzumab como la base para generar proteínas de fusión, usando la especificidad del anticuerpo anti-HER2/*neu*, aunado al efecto de citocinas como IL-2, IL-12 y GM-CSF (**Harvill y Morrison, 1996; Peng et al., 1999; Dela Cruz et al., 2000**); aumentando la eficiencia tanto de Trastuzumab como de las citocinas (**Harvill et al., 1996; Challita et al., 1998 a y b; Peng et al., 1999; Penichet et al., 1999 b**), debido a que incrementan el tiempo de vida media de las citocinas, la afinidad para anclarse al receptor y su efectividad antitumoral y antiproliferativa. Las proteínas de fusión que portan citocinas como: IL-2 (**Sabzevari et al., 1994; Becker et al.,**

1996 b; Hank *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Hornick *et al.*, 1999; Craiu *et al.*, 2001), IL-4 (Lode *et al.*, 1999a), IL-10 (Zheng *et al.*, 1997), IL-12 (Gillies *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1999), IL-15 (Rückert *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 1998) y GM-CSF (Dela Cruz *et al.*, 2000) producen mejores efectos antitumorales que cuando se utilizan MoAb<sub>s</sub> y citocinas por separado (Chen *et al.*, 1994; Penichet y Morrison, 2001). Los resultados de mayor interés han sido obtenidos al usar proteínas de fusión que portan IL-2 ya que los efectos tóxicos de la citocina, administrada de manera independiente, son disminuidos notablemente.

#### **PROTEÍNA DE FUSIÓN 'TAPW' (anti-HER2/*neu*-IL-2)**

Estudios en el departamento de Microbiología, Inmunología y Genética Molecular, y en el Instituto de Biología Molecular de la Universidad de Los Angeles California (UCLA), han producido, a partir de la transfección del gen del anticuerpo anti-HER2/*neu* (Trastuzumab) con el gen para IL-2 (Hu *et al.*, 1996; Gillies *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1999; Challita *et al.*, 1998a), la proteína de fusión TAPW (anti-HER2/*neu*-IL-2), que reconoce al RHER2/*neu* en células que lo expresan y permite la acumulación de IL-2 en el microambiente celular para inducir una respuesta inmunológica (Fell *et al.*, 1991).

#### **INMUNOTERAPIA CON IL-2**

En el tratamiento del cáncer en estadios avanzados se ha empleado IL-2 sola o en combinación para inducir la respuesta citotóxica anti-tumoral con resultados alentadores (LoRusso *et al.*, 1990; Szoka *et al.*, 1994; Lode *et al.*, 1999 a y b). Sin embargo, su administración en altas dosis, vía sistémica, perturba vías de regulación hematopoyética y puede generar una serie de efectos secundarios adversos, como son: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas (Smith, 1988;

**Ardizzoni et al.,1994; Becker et al., 1996 a)**, por lo que se ha limitado su uso en la clínica y se buscan otras formas de administración sin disminuir su actividad. Con el propósito de administrar altas dosis de IL-2 vía sistémica se piensa en el uso de liposomas como una alternativa. Actualmente sirven como medio de transporte de diferentes medicamentos y citocinas, ya que además de proteger el contenido permite dirigir el liposoma a un tipo celular en particular dependiendo de la carga eléctrica de éste (**Ciacchi et al., 1993; Vagge et al., 1994; Uno et al., 1995; Meager, 1998; Mire-Sluis y Thorpe, 1998; Peng et al., 1999; Cralu et al., 2001**).

## **LIPOSOMAS**

La tecnología farmacéutica ha diseñado liposomas, que han servido como excelentes acarreadores de fármacos, ya que permiten disminuir su toxicidad, prolongar su efecto terapéutico y en ocasiones aumentar su efectividad (**Habib y Rogers, 1989; Perez-Soler et al., 1990; Loeffler et al., 1991; Betageri, 1993; Lopes de Menezes et al., 1998; Medina et al., 2001**).

Los liposomas son vesículas lipídicas organizadas en forma esférica, compuestos de una (unilaminares) o varias (multilaminares) bicapas lipídicas, las cuales se alternan con espacios acuosos (**Ostro, 1987**), tienen un radio de 20 a 250 nanómetros (**Dass et al., 1997**), pueden presentar diferentes cargas eléctricas superficiales dependiendo del tipo de lípido utilizado para su preparación (**Shargel y Yu, 1993**). Su formación es mediante diversas técnicas, siendo la "sonicación" la más usada, aunque recientemente se ha utilizado la extrusión. Los liposomas multilaminares (vesículas multilaminares VML) son los más comúnmente usados y son preparados por la técnica clásica de Bangham, la cual consiste en disolver las capas de lípido en cloroformo y subsecuentemente agitar. En su preparación, es posible modificarlos para aumentar su eficiencia y tiempo de circulación (**Zuldman et al., 1995; Dass et al., 1997; Janoff, 1999**).

Son las propias características químicas de los fármacos, los que controlan la forma y preparación del liposoma. Si la droga o fármaco a encapsular es hidrofílico, su encapsulación será dentro del o de los volúmenes acuosos internos, mientras que si es hidrofóbico su encapsulación será dentro de la o las bicapas lipídicas (**Dass et al., 1997; Villa, 1998**). Con estas características se han podido encapsular: drogas, hormonas, antígenos, enzimas, material genético (DNA y RNA), virus, bacterias, citocinas y anticuerpos monoclonales (**Ostro, 1987; Mayer et al., 1989; Huang et al., 1992 b; Nabel et al., 1993; Allen et al., 1995; Lasic y Papahadjopoulos, 1995; Park et al., 1995; Uno et al., 1995; Dass et al., 1997; Khanna et al., 1997 a; Idani et al., 2000**).

El uso de los liposomas se basa en sus características, ya que presentan una relativa permeabilidad en sus membranas, pueden ser reconocidos por el sistema reticuloendotelial en la sangre, activan a monocitos-macrófagos, y son capaces de eliminar infecciones intracelulares parasitarias (**Janoff, 1999; Villa, 1998**).

Las combinaciones de lípidos utilizados en la formulación de los liposomas aumentan su efectividad. Algunos de los liposomas diseñados son los liposomas estéricamente estabilizados, inmunoliposomas, liposomas termosensibles, liposomas neutros, aniónicos, catiónicos y sensibles a pH, y liposomas catiónicos-fusogénicos (**Nabel et al., 1993, Allen et al., 1995, Lasic y Papahadjopoulos, 1995; Dass et al., 1997**). Para asegurar una buena selección del tipo de liposoma a usar se toma en cuenta la enfermedad, las características químicas del fármaco a encapsular, el método de preparación para los liposomas y el número de bicapas lipídicas (**Mayer et al., 1989; Janoff, 1999**).

Son innumerables los fármacos encapsulados que aportan ventajas en cuanto a la reducción de efectos tóxicos para combatir diferentes enfermedades, ya que además de reducir su toxicidad, aumentan la farmacocinética (distribución

y tasa de liberación del agente activo), y protegen al fármaco de la hidrólisis catalítica (Ostro, 1987; Habib y Rogers, 1989; Huang *et al.*, 1992 a y b; Gabinzon *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1995; Khanna *et al.*, 1997 a y b).

Recientemente nuestro grupo de trabajo realizó experimentos preliminares encapsulando IL-2 en liposomas catiónicos con el propósito de evaluar su efecto sobre la proliferación *in vitro* de células de carcinoma de cérvix; demostrando que altas concentraciones de IL-2 encapsulada inhiben la proliferación de las células tumorales. Asimismo, probó la capacidad de la citocina encapsulada y libre para disminuir masas de carcinoma de cérvix inducidas en ratones hembra de la cepa CBA/ca, observando que la IL-2 encapsulada es mas eficaz que la libre para la reducción de masas tumorales y que los efectos secundarios fueron menores cuando la citocina fue encapsulada (Morán, 2000).

Con el perfeccionamiento de la preparación de los liposomas, se propone su uso como una excelente vía de administración de citocinas, anticuerpos monoclonales (Trastuzumab) y proteínas de fusión (TAPW), ya que se reduce su toxicidad, aumenta el tiempo de circulación evita que los contenidos sean desviados o hidrolizados, disminuyendo el secuestro por células no tumorales e induciendo una mayor respuesta antitumoral, que en nuestro caso particular podríamos dirigir contra el carcinoma cérvico-uterino (Loeffler *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1995; Uno *et al.*, 1995; Khanna *et al.*, 1997 a y b; Morán, 2000).

### **CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO (CaCu)**

El Carcinoma Cérvico-Uterino (CaCu), representa aproximadamente un 30 por ciento de todos los padecimientos en mujeres mexicanas y es la principal causa de decesos (Cáceres *et al.*, 2001), así como entre las mujeres de otros países del tercer mundo (Polednak, 1993; González *et al.*, 1995).

El CaCu es un cáncer que puede ser curable si se detecta en estadios tempranos. La clasificación se lleva a cabo en función del tamaño del tumor y la invasión del estrato basal (Pontén *et al.*, 1995); se inicia con lesiones llamadas displasias, que responden a tratamientos médicos en un 85 por ciento de los casos, prosigue a un condiloma, que de no ser tratado genera una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), que conduce al establecimiento de un carcinoma *in situ* que de no ser detectado a tiempo se convierte en un carcinoma invasor en un periodo de 10 a 20 años (DeVita, 1993; Cortinas, 1998). **Tabla 2**

**Tabla 2.** Definición de los estadios de cáncer invasivo en el cérvix.

**Estadio I**

El crecimiento esta estrictamente limitado al cérvix.

**Estadio II**

El carcinoma se extiende más allá del cérvix pero no llega a la pared pévica y/o involucra la vagina pero no su tercio inferior.

**Estadio III**

El carcinoma alcanza la pared pévica y/o involucra el tercio inferior de la vagina.

**Estadio IV**

El carcinoma invade la vejiga o el recto y/o se extiende más allá de los límites descritos.

Tomado de Pontén *et al.*, 1995

Este tipo de carcinoma tiene un origen multifactorial, asociado primordialmente al uso del tabaco, la multiparidad, el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, higiene genital deficiente o nula, gran número de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales y la carencia de vitamina A, C,  $\beta$ -carotenos y folatos en la dieta cotidiana (Polendnak, 1993; DeVita *et al.*, 1993; González *et al.*, 1995; Morán, 2000). Se ha confirmado que el CaCu está fuertemente ligado con una etiología viral, y son: el Papillomavirus (HPV), el Herpesvirus y en menor grado el Citomegalovirus los que se asocian a la enfermedad (Ho *et al.*, 1995). Son los subtipos 16 y 18 del HPV los que se encuentran con mayor frecuencia y ambos inducen progresivamente la



transformación de células epiteliales de cérvix a cáncer *in situ* para finalmente establecerse un cáncer invasor (Pontén *et al.*, 1995; Gariglio *et al.*, 1998).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país, el carcinoma cérvico-uterino (CaCu) es responsable del 30 por ciento de muertes por cáncer en la mujer mexicana (Cáceres, *et al.*, 2001). Por esto se han diseñado una serie de estrategias basadas en la acción del sistema inmunológico. Algunos laboratorios han producido y aplicado vacunas contra el Papillomavirus Humano (HPV), uso de citocinas y la formulación de anticuerpos monoclonales (MoAb<sub>s</sub>) como alternativa terapéutica para el CaCu.

En particular nuestro grupo de trabajo (Lab. Oncología) ha utilizado IL-2, libre o encapsulada en liposomas para inhibir *in vitro* el crecimiento de la línea de carcinoma de cérvix INBL así como de tumores de CaCu inducidos en ratones de la cepa CBA/ca, encontrando que la IL-2 encapsulada posee la misma capacidad inhibidora que la libre con menos efectos adversos.

En el presente trabajo, pretendemos, en colaboración con el Departamento de Microbiología, Inmunología y Genética Molecular de la Universidad de Los Angeles California (UCLA) bajo la dirección del Dr. Manuel Penichet, probar el efecto antitumoral de la proteína de fusión TAPW, libre y encapsulada en liposomas, en cultivos de la línea de carcinoma de cérvix INBL así como en tumores de CaCu inducidos con la misma línea celular en ratones de la cepa CBA/ca.

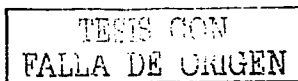
Dado que TAPW es una proteína de fusión formada por la transfección del anticuerpo anti-HER2/*neu* (Trastuzumab) con el gen para IL-2 que reconoce al RHER2/*neu* en células tumorales que lo sobreexpresan y acerca al microambiente tumoral IL-2 para inducir células citotóxicas; pensamos que TAPW puede inducir simultáneamente una respuesta antiproliferativa e inmunológica contra tumores de CaCu. De confirmar este efecto dual de TAPW, así como la reducción de efectos adversos con el uso de proteínas encapsuladas en liposomas en nuestro modelo *in vitro* e *in vivo*; estaríamos en condiciones de proponer su uso como una novedosa alternativa terapéutica para carcinoma de cérvix.

## JUSTIFICACIÓN

En México, el carcinoma cérvico-uterino (CaCu) puede ser previsible o erradicado en los primeros estadios de la enfermedad; no obstante es responsable de alrededor de un 30 por ciento de muertes por cáncer en las mujeres mexicanas (Cáceres *et al.*, 2001). Un factor muy importante del desarrollo de la enfermedad es la presencia de virus, de hecho se ha confirmado que está fuertemente ligado con los subtipos 16 y 18 del Papillomavirus (HPV), el Herpesvirus y en menor grado el Citomegalovirus (Ho *et al.*, 1995; Pontén *et al.*, 1995; Gariglio *et al.*, 1998), por lo que es una enfermedad que puede ser tratada con inmunoterapia.

Por esta razón, el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación y Cáncer (UIDCC) ha utilizado IL-2 en cultivos de la línea celular de CaCu INBL y en tumores inducidos en ratones singénicos CBA/ca y ha encontrado que el uso de altas concentraciones de IL-2 inhibe la proliferación celular y reduce las masas tumorales, pero con los efectos secundarios provocados por la citocina. Por tal motivo, han utilizado otra alternativa que es encapsular a la IL-2 en liposomas catiónicos, los cuales han sido de gran utilidad para transportarla y se ha observado que los efectos colaterales se ven disminuidos.

Por otro lado, han demostrado que las células INBL sobreexpresan el receptor HER2/*neu*. Actualmente nuestro equipo de trabajo tiene una colaboración con la UCLA, la cual ha diseñado una proteína de fusión conocida como TAPW que es un MoAb anti-HER2/*neu* (Trastuzumab) fusionado con dos moléculas de IL-2, el cual puede usarse para dirigir con mayor precisión a la citocina hacia las células tumorales. Sin embargo, aun la IL-2 asociada en TAPW puede causar efectos secundarios. Por consiguiente, este trabajo tiene como finalidad, probar que la administración de TAPW encapsulada en liposomas catiónicos puede disminuir las masas tumorales de carcinoma de cérvix inducidas en ratones singénicos de la cepa CBA/ca y evitar sus efectos adversos.



De confirmar *in vivo* el efecto de TAPW podríamos estar en condiciones de sugerir su uso "in situ" de forma segura y dirigida como una alternativa terapéutica para las pacientes con CaCu.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

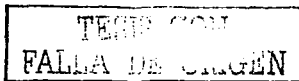
## OBJETIVOS

### GENERAL :

- Evaluar el efecto de IL-2, TANL y la proteína de fusión TAPW en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos, sobre la proliferación *in vitro* de la línea celular de CaCu INBL y sobre tumores de CaCu inducidos en ratones singénicos de la cepa CBA/ca.

### PARTICULARES :

- ✓ Encapsular la citocina IL-2, el anticuerpo TANL y la proteína de fusión TAPW en liposomas catiónicos.
- ✓ Evaluar *in vitro* el efecto de IL-2, TANL y TAPW en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos sobre la proliferación de la línea celular de CaCu INBL.
- ✓ Inducir tumores en ratones hembras de las cepas singénicas CBA/ca con células de la línea de CaCu INBL.
- ✓ Determinar el efecto de IL-2, TANL y TAPW en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos en ratones singénicos CBA/ca con tumores inducidos de CaCu INBL.
- ✓ Comprobar por medio de análisis inmunohistoquímico (anti-citoqueratinas) que los tumores encontrados en ratones CBA/ca hayan sido originados por células de CaCu INBL.
- ✓ Registrar los daños colaterales que genera la aplicación de IL-2, TANL y TAPW en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos en ratones singénicos CBA/ca con tumores inducidos de CaCu INBL.



## HIPÓTESIS

Conociendo la estructura de TAPW (anti-HER2/*neu*-IL-2) cuya función es la de reconocer el receptor para HER-2, normalmente sobreexpresado en células neoplásicas malignas, y acumular IL-2 en el microambiente de las células blanco, produciendo una acción antiproliferativa y antitumoral. Por lo cual, en el presente trabajo, se espera que al usar la proteína de fusión TAPW encapsulada en liposomas catiónicos, se reduzcan notablemente las masas tumorales de CaCu inducidos en ratones singénicos CBA/ca, evitando los efectos adversos producidos por IL-2.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consistió en una línea celular de Carcinoma de Cérvix (CaCu) establecida en el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Zaragoza), UNAM a partir de una biopsia de una paciente mexicana del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) denominada INBL. La línea celular de CaCu INBL proviene de un tumor de estadio clínico IVB metastásico y es mantenida en la reserva criopreservada de la UIDCC.

La línea celular de CaCu INBL, se cultivó en medio líquido Iscove's (Gibco BRL, USA) (**Apéndice I**) adicionado con antibióticos, complementado con 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB) (Gibco BRL, USA) (v/v) inactivado (**Apéndice II**). Se mantuvo en incubadora (Form Scientific, USA) a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad. La cantidad de las células tumorales se determinó en una cámara de Neubauer (American Optical, USA) y su viabilidad se evaluó por exclusión con azul de tripano (**Apéndice III**) (Sigma, Chem.USA).

### RATONES SINGÉNICOS DE LAS CEPAS CBA/ca

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones hembras singénicas de la cepa CBA/ca con un rango de 18 a 24 meses de edad, donados por la Dra. Martha Legorreta Herrera, del Laboratorio de Inmunología de la FES-Zaragoza, UNAM. La cepa se mantuvo en el Bioterio de Ratones de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo condiciones ambientales de esterilidad, periodos de día y noche controlados y libre demanda de alimento y agua.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IL-2

Como fuente de IL-2 se utilizó el medio condicionado elaborado por Morán (2000) a partir de la línea celular de fibroblastos humanos C<sub>63</sub> transfectada con el gene para sintetizar IL-2, y obtenida de la reserva criopreservada del mismo laboratorio. También fue utilizada IL-2 recombinante humana (Sigma, Chem.USA).

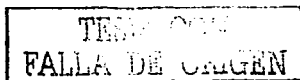
Es importante aclarar que la IL-2 utilizada en los ensayos de proliferación fue obtenida de la línea celular C<sub>63</sub> ya que como demostró Morán (2000) el medio condicionado purificado tiene un mismo efecto que la IL-2 recombinante humana (rhIL-2) (Sigma, Chem.USA).

## TANL

TANL (conocido también como Trastuzumab o Herceptin) es un anticuerpo anti-HER-2/*neu*, el cual tiene la capacidad de reconocer al RHER-2/*neu* en células que lo sobreexpresan, obtenido de una generosa donación del Dr. Manuel Penichet del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Los Angeles California (UCLA). Este anticuerpo es usado como control para evaluar la proteína de fusión TAPW.

## TAPW

La proteína de fusión TAPW (anti-HER2/*neu*-IL-2), fue fabricada y donada por el grupo de trabajo del Dr. Manuel Penichet de la UCLA y se obtuvo de una transfección genética en el anticuerpo TANL con dos moléculas de IL-2 en su región carboxilo-terminal. Esta proteína presenta una doble función, debido a que la porción de TANL reconoce al RHER2/*neu* y sus moléculas de IL-2, pueden estimular la respuesta inmunológica.





## PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS CATIONICOS

Los liposomas fueron preparados a partir de una modificación de la técnica de Szoka (Szoka y Papahadjopoulos, 1978), formados de fosfatidilcolina (PC) y espermidín-colesterol (Esp-Ch) 1:1, esté último sintetizado y donado por el Dr. Miguel Ibañez Hernández, miembro del Laboratorio de Biomembranas, (ENCB-IPN). La presencia de Esp-CH le confiere una carga eléctrica positiva a las membranas de las vesículas que se formaron.

La preparación de los liposomas cationicos, consistió en disolver perfectamente 5 $\mu$ mol de ambos lípidos en 1 ml de cloroformo puro, bajo condiciones de esterilidad; continuamente con la ayuda de una bomba de aire estéril se evaporó el cloroformo hasta sequedad total. Para la preparación de los liposomas cationicos vacíos, a la capa de lípido que se formó en el fondo del tubo se le adicionó medio de cultivo Iscove's (Gibco, USA) o PBS (Apéndice IV), enseguida en un sonicador (Laboratory Supplies, Co., USA) se provocó la formación de los liposomas mediante 2 ciclos de 5 segundos, separados por 30 segundos cada ciclo. Para concluir se aforo en 6ml del mismo medio de cultivo y se mantuvieron a 4° C, hasta su utilización la cual no debería rebasar los 7 días, para evitar su degradación por hidrólisis y oxidación (Zuidam *et al.*, 1995; Janoff, 1999; Hicks, 2000).

## ENCAPSULACIÓN DE TAPW, TANL e IL-2 EN LIPOSOMAS CATIONICOS

Para la preparación de los liposomas cationicos con la proteína de fusión TAPW, TANL e IL-2, se agregó a la capa de lípido formada después de la evaporación del cloroformo una concentración de las diferentes proteínas equivalentes de 1 UI/ml, 10 UI/ml y 100 UI/ml y se utilizó el sonicador de la misma manera que en la preparación de los liposomas cationicos vacíos. Por último, TAPW, TANL e IL-2 encapsuladas fueron sometidos a un ciclo de centrifugación

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de 45 minutos a 40 000 rpm, para eliminar el exceso de las proteínas que no fueron encapsuladas.

El sobrenadante se decantó y los liposomas catiónicos con las proteínas encapsuladas, se resuspendieron en 6 ml de medio Iscove's (Gibco BRL, USA) o PBS y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

### **ENSAYO DE CRISTAL VIOLETA PARA EVALUAR LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE INBL EN PRESENCIA DE TAPW, TANL E IL-2 LIBRES Y ENCAPSULADAS EN LIPOSOMAS CATIONICOS**

La técnica espectrofotométrica de cristal violeta, se utilizó para evaluar el efecto de las proteínas TAPW, TANL e IL-2 libres y encapsuladas en liposomas catiónicos sobre la proliferación de la línea celular de CaCu INBL (González, 1995).

Cultivos en fase exponencial fueron re-sembrados colocando  $5 \times 10^3$  células por pozo en placas de 96 de fondo plano con 200 µl de medio Iscove's complementado con 10% SFB y 1, 10 y 100 U/ml de TAPW, TANL y la citocina IL-2 en forma libre.

Se evaluó la proliferación celular por medio de la técnica de cristal violeta, cada 24 horas durante 4 días. Para ello las células se fijaron con glutaraldehído 1.1% (**Apéndice V**) (Sigma, Chem.USA) por 20 minutos, se lavaron con agua desionizada y se dejó secar la placa a temperatura ambiente. Se añadieron 75 µl de cristal violeta al 0.1% (**Apéndice VI**) en cada pozo (Sigma, Chem.USA) manteniéndolos por 10 minutos con agitación (RED ROTOR, Hofer Scientific Instruments, USA), transcurrido este tiempo se lavó nuevamente de forma exhaustiva con agua desionizada y se dejó secar a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de ácido acético al 10% en cada pozo (**Apéndice VII**) (Sigma, Chem.USA) posteriormente se mantuvieron 20 minutos en agitación, y por último

se procedió a leer la solución obtenida a una absorbancia de 570 nm en un aparato ELISA (BIO-TEK, Instruments, Inc.USA).

Para la evaluación del efecto de las proteínas encapsuladas en liposomas, sobre la proliferación de los cultivos de la línea INBL se procedió a sembrar  $5 \times 10^3$  por pozo con 200  $\mu$ l de medio Iscove's suplementado con 10% de SFB. Cada 24 horas por 4 días se retiró el medio y se estimuló durante una hora con 35 $\mu$ l de liposomas catiónicos vacíos o con TAPW, TANL o IL-2, en concentraciones de 1, 10 y 100 UI/ml. Al término de la estimulación se desechó el sobrenadante. Posteriormente las células se fijaron con glutaraldehído para continuar con la técnica de cristal violeta. Cada experimento se realizó por triplicado en 15 ensayos. Por último, se elaboró el trabajo estadístico y gráfico correspondiente.

#### **INDUCCIÓN DE TUMORES DE CaCu EN RATONES HEMBRAS SINGÉNICOS DE LA CEPA CBA/ca**

Para realizar la inducción de los tumores se utilizó la línea de CaCu INBL. Se establecieron cultivos en medio Iscove's-10% SFB; cuando se encontraron en fase exponencial se despegaron de la caja de cultivo con verseno-tripsina 2:1 (Apéndice VIII y Apéndice IX) y se resuspendieron  $8 \times 10^6$  células en 300  $\mu$ l de medio Iscove's o PBS, por cada ratón a tratar. En seguida las células fueron inoculadas a los ratones de forma intraperitoneal (i.p.), y los animales se mantuvieron en sus jaulas con libre demanda de alimento y agua durante 20 días.

En general, se establecieron tres condiciones de inducción, las cuales se clasifican como protocolos I, II y III.

##### **Protocolo I)**

Ratones inmunodeprimidos cada 48 horas por 6 ocasiones consecutivas, con dosis de 3 mg/ml de hidrocortisona antes de la inoculación i.p. de células tumorales. Una vez inoculados los ratones con las células tumorales, los animales

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

se continuaron inmunodeprimiendo con hidrocortisona cada 48 horas hasta la fecha de sacrificio.

**Protocolo II)**

Ratones inmunodeprimidos cada 48 horas por 6 ocasiones, con dosis de 3 mg/ml de hidrocortisona antes de la inyección i.p. de células tumorales (Weissman *et al.*, 1985).

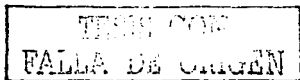
**Protocolo III)**

Ratones inoculados i.p. con células tumorales.

Transcurridos 20 días, después de haber inoculado las células tumorales. A los ratones se les aplicó de forma intraperitoneal el tratamiento correspondiente de TAPW, TANL e IL-2 libres o encapsuladas en liposomas catiónicos en concentraciones de 1, 10 y 100 UI/ml, durante cinco días consecutivos usando PBS en el control (Tratamientos 1, 2 y 3).

**OBTENCION Y MEDICIÓN DE TUMORES DE CaCu EN RATONES HEMBRAS SINGÉNICOS DE LA CEPA CBA/ca**

Los ratones se sacrificaron al día siguiente de la última dosis de tratamiento por asfixia con cloroformo o dislocación craneal (Vogel y Vogel, 1997). Se realizó la disección del área abdominal y se buscaron los tumores dentro o fuera de la cavidad peritoneal. Se tomó el diámetro de cada tumor con ayuda de un vernier y se estimó el volumen tumoral a partir de la fórmula  $4/3 \pi r^3$ , donde r es el radio del tumor (Khanna *et al.*, 1997 b). Cada tumor obtenido se colocó por separado en solución BOUIN (Apéndice X) y después en formol para su posterior inclusión en parafina, corte histológico e identificación inmunohistoquímica (citoqueratinas 10/13 y 18) (González, 1996).



Para el análisis de los resultados obtenidos *in vivo*, se utilizó la carga tumoral obtenida de la suma de los volúmenes tumorales por ratón para su conversión en porcentajes y así comparar la regresión tumoral de aquellos ratones inyectados con los tratamientos de IL-2, TANL y TAPW con respecto a los ratones control que fueron inyectados con PBS.

#### **Cálculo de carga tumoral**

Para determinar la carga tumoral se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Carga tumoral} = \Sigma \text{ volumen de los tumores por ratón}$$

#### **Cálculo de regresión tumoral**

Para determinar la regresión tumoral se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Regresión tumoral} = (\%CTTra) (100\%) / (\%CT \text{ control})$$

CTTra= carga tumoral de ratón tratado

CT control= carga tumoral de ratón control

Considerando como 100% la carga tumoral de los ratones que sólo recibieron PBS como tratamiento.

#### **Evaluación de la regresión tumoral en ratones CBA/ca usando el protocolo I, tratados con IL-2, TAPW y TANL a 1, 10 y 100 UI/ml en forma libre.**

Se estableció un primer experimento con 9 ratones hembras aplicando el protocolo I, en condiciones ambientales estériles para evaluar el efecto de la proteína de fusión TAPW y el anticuerpo TANL, en forma libre, en concentraciones de 1, 10 y 100 UI/ml, resuspendidas en 300  $\mu$ l de Iscove's para cada ratón. (Tabla 3).

Tratamiento	Inmu <sup>antes</sup>	Inmu <sup>después</sup>	INBL	Nomenclatura
PBS	•	•	•	H+i+H+PBS
IL-2 100 UI/ml	•	•	•	H+i+H+IL-2
TAPW 100 UI/ml	•	•	•	H+i+H+TAPW
TANL 100 UI/ml	•	•	•	H+i+H+TANL
IL-2 10 UI/ml	•	•	•	H+i+H+IL-2
TAPW 10 UI/ml	•	•	•	H+i+H+TAPW
IL-2 1 UI/ml	•	•	•	H+i+H+IL-2
TAPW 1 UI/ml	•	•	•	H+i+H+TAPW

**Tabla 3. Protocolo I de inducción de tumores CaCu en ratonas hembras CBA/ca inoculadas con  $8 \times 10^6$  células INBL en 300  $\mu$ l de medio Jacove's via i.p. El ratón control fue tratado con 300  $\mu$ l de PBS, al resto de los animales se les aplicó como tratamiento 1, 10 y 100 UI/ml de IL-2, TAPW y TANL en forma libre como se muestra en la tabla anterior.**

20 días, después de inocular las células tumorales. A los ratones se les inyectó de forma intraperitoneal, 300  $\mu$ l de TAPW, TANL e IL-2 a 1, 10 y 100 UI/ml, durante cinco días consecutivos usando PBS en el control (Tratamiento 1).

#### Tratamiento 1

PBS  
 IL-2 100 UI/300 $\mu$ l  
 TAPW 100 UI/300 $\mu$ l  
 TANL 100 UI/300 $\mu$ l  
 IL-2 10 UI/300 $\mu$ l  
 TAPW 10 UI/300 $\mu$ l  
 IL-2 1 UI/300 $\mu$ l  
 TAPW 1 UI/300 $\mu$ l

Los ratones se sacrificaron al día siguiente de la última dosis de tratamiento por asfixia con cloroformo o dislocación craneal (Vogel y Vogel, 1997), siguiendo el procedimiento antes descrito para obtener la carga tumoral, regresión tumoral e identificación inmunohistoquímica.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Evaluación de la regresión tumoral en ratones singénicos CBA/ca usando los protocolos I, II y III Tratados con IL-2, TAPW y TANL libres y encapsuladas en liposomas a 100 UI/ml.**

Se estableció un segundo experimento con 22 ratones hembras singénicas de la cepa CBA/ca, en condiciones ambientales estériles para evaluar el efecto de la IL-2, proteína de fusión TAPW y TANL en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos a 100 UI/ml.

La distribución de ratones por protocolo: **protocolo I) 7 ratones, protocolo II) 8 ratones y protocolo III) 7 ratones (Tabla 4).**

Tratamiento	Inmu <sup>antes</sup>	Inmu <sup>después</sup>	INBL	Nomenclatura
<b>PROTOCOLO I</b>				
PBS	•	•	•	H+I+H+PBS
IL-2	•	•	•	H+I+H+IL-2
TAPW	•	•	•	H+I+H+TAPW
TANL				ND
Lipos Vacíos	•	•	•	H+I+H+LIP-VAC
IL-2 en Lipos <sup>+</sup>	•	•	•	H+I+H+LIP-IL-2
TAPW en Lipos <sup>+</sup>	•	•	•	H+I+H+LIP-TAPW
TANL en Lipos <sup>+</sup>	•	•	•	H+I+H+LIP-TANL
<b>PROTOCOLO II</b>				
PBS	•		•	H+I+PBS
IL-2	•		•	H+I+IL-2
TAPW	•		•	H+I+TAPW
TANL	•		•	H+I+TANL
Liposomas Vacíos <sup>+</sup>	•		•	H+I+LIP-VAC
IL-2 encapsulada	•		•	H+I+LIP-IL2
TAPW encapsulada	•		•	H+I+LIP-TAPW
TANL encapsulada	•		•	H+I+LIP-TANL
<b>PROTOCOLO III</b>				
PBS			•	I+PBS
IL-2			•	I+IL-2
TAPW			•	I+TAPW
TANL				ND
Liposomas Vacíos <sup>+</sup>			•	I+LIP-VAC
IL-2 encapsulada			•	I+LIP-IL-2
TAPW encapsulada			•	I+LIP-TAPW
TANL encapsulada			•	I+LIP-TANL
Control				

**Tabla 4. Protocolos I, II y III de inducción de tumores CaCu en ratones hembras CBA/ca inoculadas con 8X10<sup>6</sup> células INBL en 300µl de medio Iscove's via I.p. El ratón control fue tratado con 300 µl de PBS, el resto de los animales se les aplicó 100 UI/ml de IL-2, TAPW y TANL libres y encapsuladas y con Liposomas Vacíos como se muestra en la tabla anterior. ND: no determinado.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

20 días después de la inoculación de las células tumorales, a los ratones se les administraron 5 dosis del tratamiento 2; cada 24 horas.

**Tratamiento 2**

PBS  
IL-2 100 UI/300 $\mu$ l  
TAPW 100 UI/300 $\mu$ l  
TANL 100 UI/300 $\mu$ l  
Liposomas Vacíos  
IL-2 encapsulada 100 UI/300 $\mu$ l  
TAPW encapsulada 100 UI/300 $\mu$ l  
TANL encapsulada 100 UI/300 $\mu$ l

Los ratones se sacrificaron al día siguiente de la última dosis de tratamiento por asfixia con cloroformo o dislocación craneal (Vogel y Vogel, 1997), y se procedió al cálculo de la carga tumoral, regresión tumoral e identificación inmunohistoquímica.

**Comparación de la regresión tumoral entre TAPW e IL-2 a 100 UI/ml en forma libre y encapsuladas en ratones singénicos CBA/ca.**

Se estableció un tercer y último experimento con 24 ratones hembras singénicas de la cepa CBA/ca de 18 a 24 meses de edad, en condiciones ambientales estériles para evaluar la proteína de fusión TAPW e IL-2, en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos, usando una concentración de 100 UI/ml, inoculando  $10 \times 10^6$  células de INBL i.p., resuspendidas en 300  $\mu$ l de PBS para cada ratón.

En este experimento los ratones fueron distribuidos de la siguiente forma: **protocolo I)** 12 ratones y **protocolo III)** 12 ratones. Este experimento se realizó por duplicado (**Tabla 5**).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Tratamiento	Inmu <sup>antes</sup>	Inmu <sup>después</sup>	INBL	Nomenclatura
<b>PROTOCOLO I</b>				
PBS	•	•	•	H+I+H+PBS
IL-2 100 UI/ml	•	•	•	H+I+H+IL-2
TAPW 100 UI/ml	•	•	•	H+I+H+TAPW
Liposomas Vacíos*	•	•	•	H+I+H+LIP-VAC
IL-2 encaps 100 UI/ml	•	•	•	H+I+H+LIP-IL-2
TAPW enc 100 UI/ml	•	•	•	H+I+H+LIP-TAPW
<b>PROTOCOLO III</b>				
PBS			•	I+PBS
IL-2 100 UI/ml			•	I+IL-2
TAPW 100 UI/ml			•	I+TAPW
Liposomas Vacíos*			•	I+LIP-VAC
IL-2 encaps 100 UI/ml			•	I+LIP-IL-2
TAPW enc 100 UI/ml			•	I+LIP-TAPW

Tabla 5. Protocolos I y III de inoculación de tumores CaCu en ratones hembras CBÁ/ca inoculadas con  $10 \times 10^6$  células INBL en 300  $\mu$ l de PBS vía i.p. El ratón control fue tratado con 300  $\mu$ l de PBS, al resto de los animales se les aplicó 100 UI/ml de IL-2 y TAPW libres y encapsuladas y Liposomas vacíos como se muestra en la tabla anterior.

20 días después de la inoculación de las células tumorales, a los ratones se les administraron 5 dosis de tratamiento 3; cada 24 horas.

#### Tratamiento 3

PBS  
 IL-2 100 UI/300 $\mu$ l  
 TAPW 100 UI/300 $\mu$ l  
 Liposomas Vacíos  
 IL-2 encapsulada 100 UI/300 $\mu$ l  
 TAPW encapsulada 100 UI/300 $\mu$ l

Los ratones se sacrificaron al día siguiente de la última dosis de tratamiento por asfixia con cloroformo o dislocación craneal (Vogel y Vogel, 1997), se procedió a calcular la carga tumoral, regresión tumoral e identificación inmunohistoquímica.

## INCLUSIÓN EN PARAFINA Y CORTES HISTÓLOGICOS DE LOS TUMORES EXTRAIDOS

Una vez que se extrajeron los tumores inducidos en los ratones, éstos se mantuvieron en solución BOUIN de 1.5 a 3 horas (dependiendo el tamaño). Posteriormente se retiró la solución BOUIN, se rescataron los tumores y se colocaron en sobres de papel filtro del núm. 2 (Whatman); enseguida en un frasco se añadió formol al 100% y se introdujeron los sobres debidamente etiquetados en forma indefinida de tiempo hasta su inclusión en parafina.

Para incluir tumores, se eliminó la solución BOUIN y con la colaboración y manipulación del Técnico Javier Velázquez Mendoza (C.M.F. Núm. 30 IMSS), en un Procesador de Tejidos automatizado (Histoquinet, Leica, USA) se deshidrataron las masas tumorales progresivamente en un gradiente de etanol al 50%, 75%, 96% y absoluto pasando a xilol como paso final. Una vez concluido el tiempo, se continuó con la inclusión de los tumores en parafina (Incluidor de Parafina EG 1160 Leica, USA), disminuyendo gradualmente la temperatura hasta obtener los bloques de parafina con los tumores incluidos (2cm<sup>2</sup>). Por último, los bloques fueron cortados en un micrótopo (MINOT; Alemania) donde se obtuvieron cortes de 5 µm (González, 1996).

## IDENTIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORES DE CaCu INDUCIDOS

Una vez obtenidos los cortes, se procedió a realizar el análisis inmunohistoquímico (Apéndice XI) utilizando anticuerpos anti-citoqueratinas. Las citoqueratinas son un tipo especial de filamentos intermedios pertenecientes al citoesqueleto celular, pero en tumores primarios y metastásicos de tipo epitelial son predominantes (Rangel *et al.*, 1994). Se utilizó un sistema de detección de avidina-biotina-inmunoperoxidasa (Vector Laboratories, Inc. USA)(Apéndice XIV). Los anticuerpos monoclonales primarios utilizados fueron anti-citoqueratina 10/13 y anti-citoqueratina 18 (Dakoparts, USA) (González, 1996).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Como control negativo se utilizaron LSP humanos, fijados con alcohol absoluto, mientras que el control positivo se usó un corte de cáncer de pulmón que sobre-expresa las citoqueratinas, proporcionado por el Departamento de Patología del Hospital General.

### **Detección de citoqueratinas 10/13 y 18 en muestras de tumores inducidos en ratones CBA/ca**

Las muestras de tumores inducidos en ratones CBA/ca incluidos en parafina, se utilizaron para detectar la presencia de citoqueratinas de tipo 10/13 y 18 mediante análisis inmunohistoquímico que se realizó por la Técnica de Peroxidasa, para lo cual se utilizó el Sistema de Detección VECTASTAIN *Elite* ABC (Vector Laboratories). Se obtuvieron dos secciones de 5  $\mu$ m a partir de los tumores inducidos e incluidos en bloques de parafina, que fueron colocadas sobre portaobjetos con grenetina al 1% (Sigma Chemical, U.S.A.), estas muestras fueron desparafinadas colocandolas a 60°C durante 30 min. Las secciones de tejido se rehidrataron por inmersión en xilol, etanol al 100%, etanol al 96% y en agua destilada (tres lavados en cada uno de los alcoholes durante 5 min).

Ya hidratadas las muestras, se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% v/v para bloquear la actividad de peroxidasa endógena, transcurridos 5 min se lavaron con PBS y se adicionó suero bloqueador (**Apéndice XII**) durante 15 min. Se decantó el exceso de suero y posteriormente se incubaron las placas con los anticuerpos primarios anti-citoqueratina 10/13 y 18.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en los 15 ensayos de los experimentos realizados *in vitro* fueron sometidos a un análisis de varianza de un factor en el diseño completamente aleatorio (ANDEVA) con el fin de comparar las medias poblacionales correspondientes a cada tratamiento evaluado. Se utilizó un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , para determinar la diferencia entre tratamientos (Apéndice XVI) (Daniel, 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

### **Evaluación de la proliferación de la línea celular INBL en presencia de la proteína de fusión TAPW y la proteína TANL comparadas con IL-2 encapsuladas en liposomas catiónicos.**

Se evaluó la proliferación de la línea celular INBL estimulada con IL-2, TAPW y TANL en concentraciones de 1, 10 y 100 U/ml, en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos.

Al estimular los cultivos en presencia de 1 y 10 U/ml de IL-2, TAPW y TANL, los resultados muestran que IL-2 induce un aumento en la proliferación de un 14% a las 96 hrs, mientras que TAPW y TANL lo aumentan en un 37%, en comparación al control (**Gráficas 1-a y 1-c**). Cuando las proteínas fueron encapsuladas con la misma concentración, se observó que IL-2 induce una proliferación de 33% a las 96 hrs, mientras que el mayor efecto proliferador se observa al usar TAPW y TANL con un 56 y 47% respectivamente (**Gráficas 1-b y 1-d**).

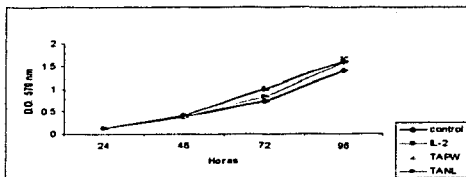
Al utilizar 100 U/ml de las proteínas IL-2, TAPW y TANL, observamos que todas inhiben la proliferación de INBL con respecto al control; con un 56, 34 y 41% respectivamente a las 96 hrs (**Gráficas 1-e**). Por otro lado, cuando los cultivos de INBL fueron estimulados con las proteínas encapsuladas la mayor inhibición se obtuvo con liposomas conteniendo IL-2 llegando a un 64% a las 96 hrs mientras, que TAPW y TANL inhibieron en un 51 y 34% respectivamente con respecto al control (**Gráficas 1-f**).

Los liposomas catiónicos vacíos produjeron una inhibición de la proliferación de las células INBL en un 14% con respecto a su control (**Gráficas 1-b, 1-d, 1-f**).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

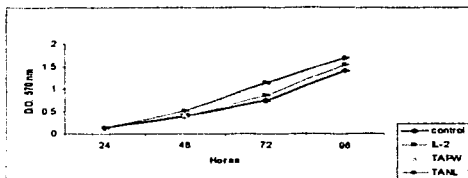
## Proteínas Libres

1 UI/ml



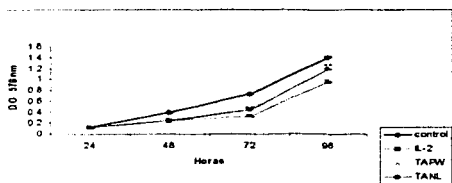
a

10 UI/ml



b

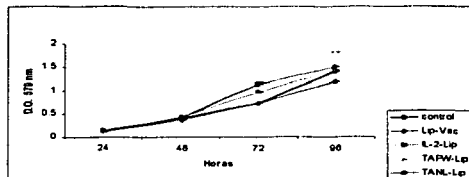
100 UI/ml



c

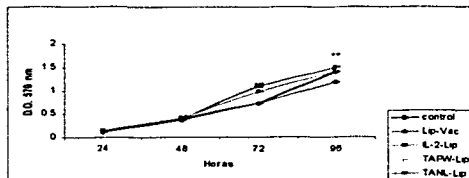
## Proteínas Encapsuladas

1 UI/ml



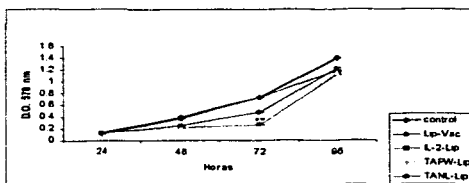
d

10 UI/ml



e

100 UI/ml



f

Gráfica 1.  $5 \times 10^3$  células INBL fueron cultivadas durante 4 días en presencia de proteínas libres (Gráfico a: 1 UI/ml; Gráfico b: 10 UI/ml; Gráfico c: 100 UI/ml). Proteínas encapsuladas (Gráfico d: 1 UI/ml; Gráfico e: 10 UI/ml; Gráfico f: 100 UI/ml). La evaluación se hizo cada 24 horas durante 4 días, usando la Técnica de Cristal Violeta. A concentraciones de 1 y 10 UI/ml las proteínas libres o encapsuladas inducen la proliferación (gráficas a, b, c y d), mientras que a 100 UI/ml se observa una inhibición (gráficas e y f).

### **Efecto *in vivo* de IL-2, TAPW y TANL libres y encapsuladas sobre tumores de CaCu inducidos en ratones CBA/ca**

Después de probar *in vitro* el efecto inhibitor de la proteína de fusión TAPW e IL-2 sobre la línea de CaCu INBL, se procedió a evaluar la actividad de ambas proteínas *in vivo*. Para ello se establecieron tres experimentos utilizando ratones hembras singénicas CBA/ca. En los ensayos se probaron las proteínas en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos usando como control de TAPW el anticuerpo TANL.

El tamaño de los tumores inducidos y extraídos fue entre 4mm<sup>3</sup> y 146mm<sup>3</sup>, principalmente en aquellos individuos inmunodeprimidos (protocolos de inducción I y II), encontrando las masas tumorales frecuentemente en útero (oviductos), intestinos, hígado, grasa y pulmones (Fig. 6).

Cabe destacar que la cepa de ratones CBA/ca, mostró susceptibilidad para la generación de tumores ya que en cada uno de los experimentos realizados se obtuvo más de un 60% de ratones con desarrollo de masas tumorales.

En el primer experimento, el 77.77% de los ratones presentaron masas tumorales. De estos, la mayor carga tumoral con 23.57 mm<sup>3</sup>, se observó en el ratón control tratado con PBS. En general se observó que la administración de las proteínas IL-2, TAPW y TANL disminuyen la carga tumoral con respecto al ratón control (Fig. 7). Al administrar 1 y 10 UI/ml de TAPW se presentó una disminución de la carga tumoral de 91 y 96% con respecto al control, semejante a la obtenida al administrar 100 UI/ml de IL-2 (Tabla 8). Al usar 100 UI/ml de TANL y 10 UI/ml de IL-2, las cargas tumorales presentaron una disminución similar con un 82 y 86% respectivamente en comparación con el ratón control.

CONDICIÓN	NÚM. TUMORES	VOLUMEN TUMORAL (mm <sup>3</sup> )	CARGA TUMORAL (mm <sup>3</sup> )	DISMINUCIÓN DE LA CARGA TUMORAL (%)
<b>PROTOCOLO I</b>				
H+I+H+PBS	12	1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 4.71; 4.71	23.57	—
H+I+H+IL-2 1 UI/ml	2	8.37	8.37	35.51
H+I+H+TAPW 1 UI/ml	2	1.05; 1.05	2.10	91
H+I+H+TANL 1 UI/ml	Ø			100
H+I+H+IL-2 10 UI/ml	3	1.05; 1.05; 1.05	3.25	86.2
H+I+H+TAPW 10 UI/ml	1	1.05	1.05	95.55
H+I+H+IL-2 100 UI/ml	1	1.05	1.05	95.55
H+I+H+TAPW 100 UI/ml	Ø			100
H+I+H+TANL 100 UI/ml	4	1.05; 1.05; 1.05; 1.05	4.20	82

Tabla 6. Carga tumoral total obtenida de la inducción con el protocolo I y tratada con PBS, IL-2, TAPW y TANL a 1, 10 y 100 UI/ml. El volumen tumoral se estimó a partir de la fórmula  $4/3\pi r^3$ , donde r: radio del tumor en mm<sup>3</sup>, se utilizó un ratón por cada tratamiento. La disminución de la carga tumoral, corresponde al porcentaje de regresión con respecto al organismo tratado con PBS. Se observa disminución en la carga tumoral en los tratamientos con TAPW y TANL en todas las concentraciones utilizadas, tal como se reporta con IL-2 a 80 UI/ml. Ø: no hubo presencia de masas tumorales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Adherido en Intestinos



Incluida en Pulmones



Adherido o incrustada en Hígado



Incluida en grasa interna



Dentro de oviducto

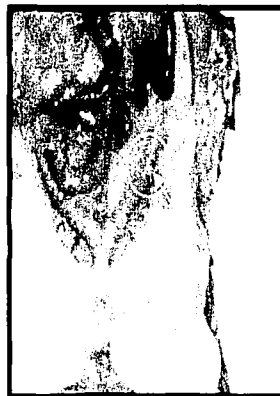


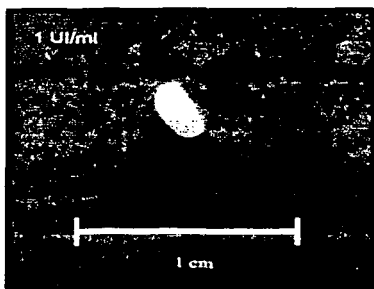
Figura 6. Principal ubicación y apariencia de las masas tumorales inducidas con células de CaCu INBL, en ratones hembras CBA/ca.

TESIS CON  
FALLA DE JURISDICCION

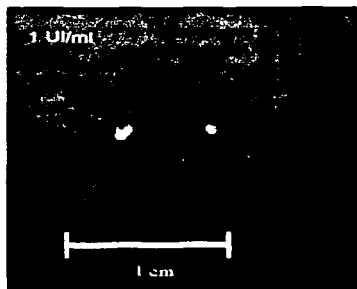
PBS



IL-2



TAPW



**Figura 7. Masas tumorales en ratones CBA/ca. tratados con 1, 10 y 100 UI/ml de IL-2, TAPW y TANL con el protocolo I.** Tumores inducidos en ratones hembras CBA/ca a los cuales se les inoculó  $8 \times 10^6$  células INBL en 300  $\mu$ l de medio Iscove's o PBS via i.p. Los ratones de este primer grupo mostraron una inducción de tumores de CaCu en un 73% y en las concentraciones de 1 y 10 UI/ml los tratamientos TAPW y TANL disminuyeron la carga tumoral en un 82 y 91% a diferencia del ratón tratado con PBS.

TRABAJOS  
FALLA DE ORIGEN

El segundo ensayo con ratones hembras CBA/ca permitió comparar el efecto de 100UI/ml de la proteína de fusión TAPW y TANL con 100 UI/ml de IL-2, en forma libre y encapsuladas en liposomas catiónicos.

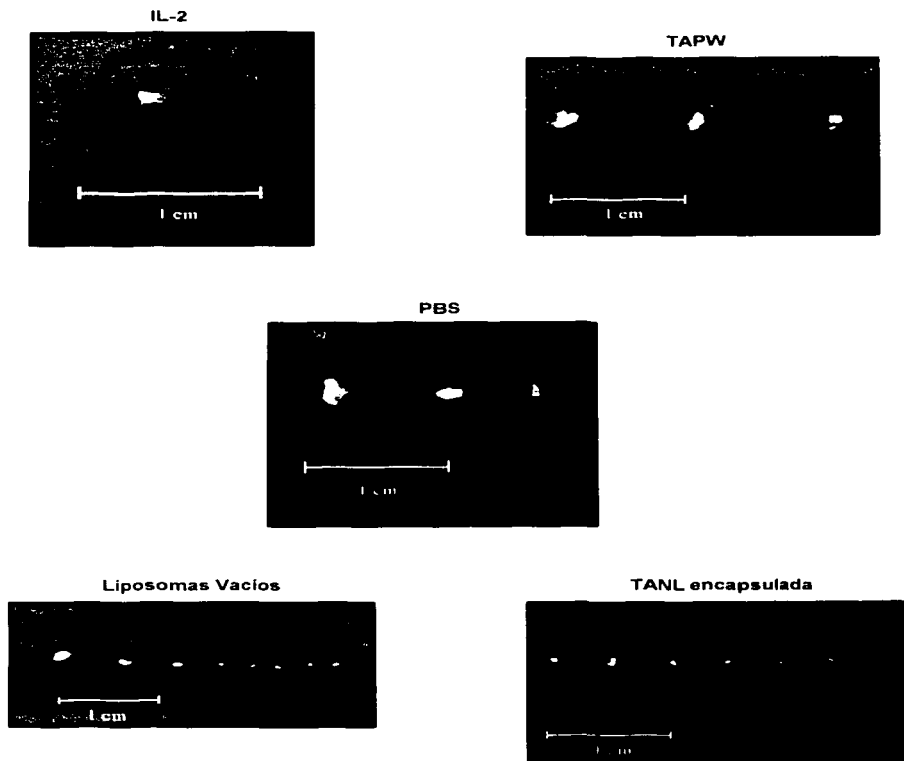
Los resultados de este segundo experimento muestran que el 63.64% de los ratones presentaron masas tumorales. De estos, las mayores cargas tumorales ( $20.42\text{mm}^3$ ,  $146.61\text{mm}^3$  y  $14.29\text{mm}^3$ ), se observaron en los ratones control de los 3 protocolos de inducción. Se observó, que la administración de las proteínas IL-2, TAPW y TANL en forma libre o encapsuladas disminuyen la carga tumoral con respecto al ratón control, sin importar el protocolo de inducción empleado (Fig. 8 y 9). Los ratones incluidos en el protocolo I de inducción tumoral y tratados con IL-2 y TAPW encapsuladas mostraron una reducción de la carga tumoral de 100%. Para el caso de los ratones incluidos en el protocolo II, la menor disminución de carga tumoral se obtuvo en el tratamiento con TAPW libre con un 74.3%. Las cargas tumorales inducidas con el protocolo III y tratadas con las proteínas libres y encapsuladas, presentaron la menor disminución con respecto a los protocolos I y II, en este ensayo, excepto al aplicar TAPW libre y liposomas vacíos donde se observó una disminución del 77.9% y 100% respectivamente, que es mayor a la lograda con los otros dos protocolos (Tabla 9).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

PROTOCOLO Y TRATAMIENTO	NÚMERO TUMORES	VOLUMEN TUMORAL (mm <sup>3</sup> )	CARGA TUMORAL (mm <sup>3</sup> )	DISMINUCIÓN DE LA CARGA TUMORAL (%)
<b>PROTOCOLO I</b>				
H+i+H+PBS	3	14.66; 4.71; 1.05	20.42	—
H+i+H+IL-2	1	1.05	1.05	95
H+i+H+TAPW	3	1.05; 1.05; 1.05	3.15	84.5
H+i+H+Lip-vac	8	1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 5.96	12.20	40.26
H+i+H+IL-2 enca	Ø			
H+i+H+TAPW en	Ø			
H+i+H+TANL en	4	1.05; 1.05; 1.05; 1.05	4.20	79.43
<b>PROTOCOLO II</b>				
H+i+PBS	1	146.61	146.61	—
H+i+IL-2	Ø			
H+i+TAPW	1	37.69	37.69	74.3
H+i+TANL	Ø			
H+i+Lip-vac	Ø			
H+i+IL2 enca	Ø			
H+i+TAPW enca	2	1.05; 1.05	2.10	98.56
H+i+TANL enca	5	1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05	5.25	96.4
<b>PROTOCOLO III</b>				
I+PBS	2	1.05; 13.24	14.29	—
I+IL-2	4	1.05; 1.05; 1.05; 8.38	11.53	19.3
I+TAPW	3	1.05; 1.05; 1.05	3.15	77.9
I+Lip-vacios	Ø			
I+IL-2 encapsul	8	1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 5.96	13.31	7.0
I+TAPW encapsu	7	1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05	7.35	48.56
I+TANL encapsu	Ø			

Tabla 9. Carga tumoral total obtenida de la inducción con los protocolos I, II y III y tratados con PBS, Liposomas Vacíos, IL-2, TAPW y TANL libres y encapsuladas a 100 UI/ml en CBA/ca. El volumen tumoral se estimó a partir de la fórmula  $4/3\pi r^3$ , donde r: radio del tumor en mm, se utilizó un ratón por cada tratamiento. La disminución de la carga tumoral, corresponde al porcentaje de regresión con respecto al organismo tratado con PBS en cada condición. Se observa una mayor disminución en la carga tumoral en los tratamientos con TAPW y TANL encapsuladas igual como se reporta con IL-2 encapsulada. Ø: no hubo presencia de masas tumorales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 8. Masas tumorales del segundo ensayo con ratones CBA/ca, tratados con 100 UI/ml de PBS, IL-2, TAPW, TANL, Liposomas-Vacios, IL-2, TAPW y TANL encapsuladas con el protocolo I.** Tumores inducidos en ratones hembras CBA/ca a los cuales se les inoculó  $8 \times 10^6$  células INBL en 300  $\mu$ l de medio Iscove's o PBS via i.p. En este grupo de ratones hubo una inducción de tumores de CaCu del 63.64%. Los ratones incluidos en este protocolo y tratados con IL-2 y TAPW encapsuladas mostraron una reducción de la carga tumoral en un 100%.

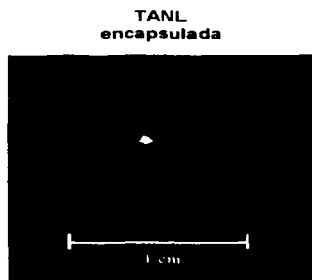
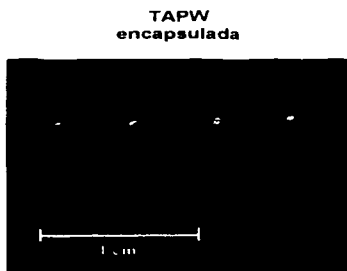
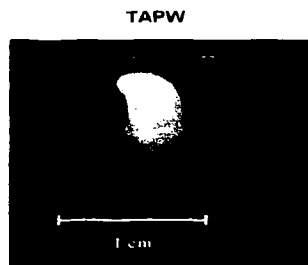
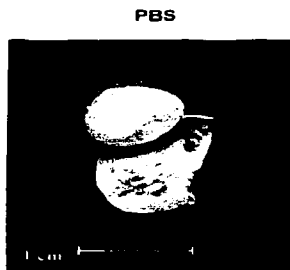


Figura 9. Masas tumorales del segundo ensayo con ratones CBA/ca, tratados con 100 UI/ml con el protocolo II. Tumores inducidos en ratones hembras CBA/ca a los cuales se les inocularon  $8 \times 10^6$  células INBL en 300  $\mu$ l de medio Iscove's o PBS IX vía i.p. En este grupo de ratones fue el ratón tratado con TAPW libre el que presentó la menor disminución de la carga tumoral con un 74.3%.

Con el propósito de tener un mayor control sobre el estado inmunológico de los ratones antes del tratamiento con las proteínas libres o encapsuladas y evaluar su efecto en la disminución de la carga tumoral, en este tercer experimento solo se emplearon los protocolos de inducción I y III en ratones hembras CBA/ca.

Los resultados de este último ensayo muestran que el 91.67% de los ratones presentaron masas tumorales (Figs. 10-13). De estos, las mayores cargas tumorales ( $3.15 \text{ mm}^3$  y  $7.15 \text{ mm}^3$ ), se observaron en los ratones tratados con PBS. La administración de las proteínas IL-2 y TAPW en forma libre y encapsuladas disminuyó la carga tumoral con respecto al ratón control, sin importar el protocolo de inducción empleado.

Los ratones incluidos en el protocolo I de inducción tumoral y tratados con liposomas vacíos e IL-2 encapsulada mostraron la mayor reducción de la carga tumoral con 78% y 52.6% respectivamente; observándose también que los tratamientos de IL-2 libre y TAPW encapsulada disminuyeron la carga tumoral a 45.6%. La cargas tumorales inducidas con el protocolo III y tratadas con las proteínas libres y encapsuladas, presentaron la menor disminución, en este ensayo, excepto al aplicar TAPW libre y liposomas vacíos donde se observo una disminución significativa del 77.9% y 100% respectivamente (Tabla 10).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

PBS

TAPW

IL-2



**Figura 10.** Imágenes de ratones CBA/ca del tercer ensayo donde se compara el efecto de 100UI/ml de TAPW e IL-2 libres que fueron inoculados con  $8 \times 10^6$  de células INBL con el protocolo I. Los ratones de este tercer ensayo muestran que el 91.67% de los ratones presentaron masa tumoral.

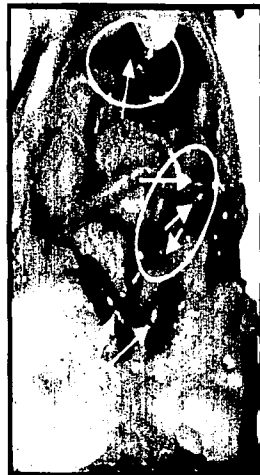
El ratón tratado con PBS, muestra una inflamación e irrigación en el útero, así como ulceraciones en intestinos y áreas de color más oscuro dispersas en el hígado. En el ratón tratado con TAPW, se observan oviductos más delgados y su hígado presenta una coloración parecida al ratón tratado con PBS, mientras que el ratón tratado con IL-2 muestra una mayor sensibilidad capilar en hígado con apariencia completamente anormal, presenta también una ligera inflamación en útero y su oviducto izquierdo tiene un adelgazamiento similar al ratón tratado con TAPW. En los tres tratamientos se observa el desarrollo de grasa intraperitoneal por la aplicación de la Hidrocortisona.



PBS

TAPW

IL-2



**Figura 11.** Imágenes de ratones CBA/ca del tercer ensayo donde se compara el efecto de 100U/ml TAPW e IL-2 libre, que fueron inoculados con  $8 \times 10^6$  de células INBL con el protocolo III. En general se observó que la administración de las proteínas IL-2 y TAPW en forma libre y encapsuladas disminuyen la carga tumoral con respecto al ratón control, sin importar el protocolo de inducción empleado.

El ratón tratado con PBS, presentó inflamación, irrigación y ligera irritación en el útero, sensibilidad capilar nula en el hígado, ulceración en intestinos. El ratón tratado con TAPW presentó una inflamación e irrigación en el útero (no tan severa como el ratón tratado con IL-2), se observó ulceración en intestino, mientras que el ratón tratado con IL-2 presentó una severa inflamación, irrigación e irritación en el útero, presentó también un hematoma en la región de inyección (no observable) y mayor ulceración en intestinos en comparación con TAPW. En los ratones tratados con TAPW e IL-2, se observa una sensibilidad capilar ligera en el hígado.

INSTITUTO  
 FALTA DE CREDITO

Liposomas Vacíos



TAPW encapsulada



IL-2 encapsulada



**Figura 12.** Imágenes de ratones CBA/ca del tercer ensayo donde se compara el efecto de 100 UI/ml de Liposomas Vacíos, TAPW e IL-2 encapsuladas que fueron inoculados con  $8 \times 10^6$  de células INBL con el protocolo I.

En el ratón tratado con Liposomas catiónicos vacíos se observa una mayor sensibilidad capilar en el Hígado, ulceraciones en intestinos y una irritación e inflamación en útero. El ratón tratado con TAPW encapsulada, presenta una inflamación e irrigación en útero, resalta la apariencia normal de los otros órganos. El ratón tratado con IL-2 encapsulada muestra una ligera inflamación e irrigación en útero, también presentó una inflamación en riñones (no observable), los órganos presentaron una ligera sensibilidad capilar. Los tratamientos con TAPW encapsulada no presenta efectos colaterales tan evidentes como Liposomas catiónicos vacíos e IL-2 encapsulada. La grasa intraperitoneal observada en todas las figuras es causa del efecto de la Hidrocortisona aplicada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Liposomas Vacios

TAPW Encapsulada

IL-2 encapsulada



**Figura 13. Imágenes de ratones CBA/ca del tercer ensayo donde se compara el efecto de 100U/ml de Liposomas Vacios, TAPW e IL-2 encapsuladas que fueron inoculados con  $8 \times 10^6$  de células INBL con el protocolo III.**

El ratón tratado con Liposomas vacios, presentó oviductos delgados, con irritación excesiva y ligera irrigación, también presenta ulceración en intestinos y presenta una contracción y sensibilidad capilar en hígado. El ratón tratado con TAPW encapsulada presenta los oviductos preferentemente el izquierdo en apariencia segmentada, con una ligera inflamación e irrigación, el resto de los órganos presentó una apariencia y sensibilidad muy similar al ratón control. El ratón tratado con IL-2 encapsulada, presentó sensibilidad capilar en hígado, el útero presentó una ligera inflamación y nula irrigación, estómago y riñones inflamados (no observable).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

PROTOCOLO Y TRATAMIENTO	NÚM. TUMOR	VOLUMEN TUMORAL (mm <sup>3</sup> )	CARGA TUMORAL (mm <sup>3</sup> )	PROM. CARGA (mm <sup>3</sup> )	DISMINUCIÓN DE LA CARGA TUMORAL
<b>PROTOCOLO I</b>					
H+I+H+PBS	4	1.05; 1.05; 1.05; 3.53	7.73	3.86	—
H+I+H+TAPW	7	1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.39; 2.57	7.11	3.56	7.7
H+I+H+IL-2	4	1.05; 1.05; 1.05; 1.05	4.20	2.10	45.6
H+I+H+Lipos-Vacíos	2	1.05; 0.64	1.69	0.85	78.0
H+I+H+TAPW encapsul	4	1.05; 1.05; 1.05; 1.05	4.20	2.10	45.6
H+I+H+IL-2 encapsul	2	3.53; 0.13	3.66	1.83	52.6
<b>PROTOCOLO III</b>					
I+PBS	2	1.05; 13.24	14.29	7.15	—
I+TAPW	3	1.05; 1.05; 1.05	3.15	1.58	77.9
I+IL-2	4	1.05; 1.05; 1.05; 8.38	11.53	5.77	19.3
I+Lipos-Vacíos	∅				100
I+TAPW encapsulada	7	1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05	7.35	3.68	48.53
I+IL-2 encapsulada	8	1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 1.05; 5.96	13.31	6.65	7.0

**Tabla 10.** Carga tumoral total obtenida de la inducción con los protocolos I y III, tratados con PBS, Liposomas Vacíos, IL-2 y TAPW libres y encapsuladas a 100 U/ml en CBA/ca. El volumen tumoral se estimó a partir de la fórmula  $4/3\pi r^3$ , donde r, radio del tumor en mm, se utilizaron dos ratones por cada tratamiento. La disminución de la carga tumoral, corresponde al grado de regresión con respecto al organismo tratado con PBS en cada condición. ∅: no hubo presencia de masas tumorales.

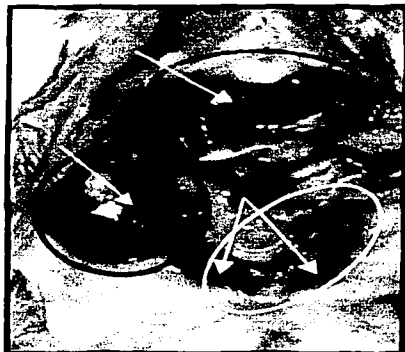
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Alteraciones observadas en los ratones CBA/ca**

En los tres experimentos con ratones CBA/ca se encontraron de forma aleatoria efectos colaterales independientes de las condiciones y tratamientos utilizados en algunos organismos. Se encontró un tumor de ovario que no fue generado por células de CaCu inoculadas (**Fig.14 a**). Los efectos que fueron más comunes fueron: calvicie, flujo vaginal y anal, presencia de esferas traslucidas alojadas arriba de los ovarios con diferentes formas ( bifurcadas, carnosas ) (**Fig. 14 b**).

Las esferas encontradas en los ratones, no pudieron ser evaluadas con las citoqueratinas, debido a que se desintegraron en el tren de alcoholes, proceso que sirve para deshidratar los tejidos para realizar inmunohistoquímica.

Por otro lado, además de evaluar la carga tumoral en los ratones también se realizó un listado de otras alteraciones presentadas por los ratones. De los 56 ratones CBA/ca empleados para los tres ensayos, 36 organismos fueron incluidos en los protocolos I y II de inducción del tumor y como consecuencia de la inyección de hidrocortisona, presentaron un incremento de grasa en la región abdominal y área de los riñones, sangrado en uñas, irritación e inflamación en útero, mientras que en los 19 ratones incluidos en el protocolo III de inducción del tumor en el que solo fueron inoculadas células tumorales los efectos colaterales encontrados fueron: útero irritado e inflamado, hígado y pulmones sensibles y estómago contraído (**Tabla 11**).



a) Masa tumoral de 1.25 cm de diámetro en ovario no generada por la inducción con células INBL (círculo morado). El útero presenta una irrigación e inflamación (círculo amarillo). También se observa el hígado con ligera sensibilidad capilar (círculo verde).

b) Esfera bifurcada con apariencia cristalina adherida al ovario izquierdo (círculo morado). El útero presenta una inflamación, irrigación y ligera irritación (flechas amarillas).



**Figura 14. Trastornos encontrados en los ratones hembras CBA/ca, independientes de la aplicación de tratamientos o condiciones utilizadas.** Las esferas fueron frecuentes en varios ratones, los cuales en ocasiones estaban presentes en ambos ovarios. Sólo se presentó un ratón con un tumor positivo, el cual no fue advertido ya que el organismo presentaba una apariencia y comportamiento normal. Estos trastornos se atribuyen a posibles efectos de la edad o multiparidad de los organismos.

**Registro de efectos colaterales observados para cada condición y tratamiento.**

<b>Cond. y Tratam.</b>	<b>Efectos Secundarios Observados</b>
<b>PROTOCOLO I</b>	
H+I+H+PBS	G; Uirr; ita; in; iDdes; ulc; Rin; Su; flva
H+I+H+TAPW	G; He; Uin; del; Hdes; sen; I; in; ulc; sen; Econ; Met
H+I+H+IL-2	G; Uin; ita; irr; con; ulc; Econ; Rin; Hsen; ita; Pderr; con; Sa
H+I+H+Lipos-Vacios	G; Uita; Rin; Pcon; sen; Hsen; Met; Sa
H+I+H+TAPW encapsu	G; He; Udel; Rin; I; ulc; Econ; Pita; Met
H+I+H+IL-2 encapsulada	G; Uirr; ita; in; I; ulc; in; Esen; in; Hdes; sen; Rin; Pdes; con; atr; Met
H+I+H+TANL encapsu	G; Uirr; in; I; ulc; Rin; Econ; Pnor; Hdes; sen; Met
<b>PROTOCOLO II</b>	
H+I+PBS	G; Uita; in; I; nor; Rnor; Hdes; Econ; flva
H+I+TAPW	G; Uirr; in; Hdes; sen; Econ; I; ulc; Psen
H+I+IL-2	G; Uirr; ita; in; Hdes; sen; Econ; I; ulc; Psen; Met
H+I+TANL	G; Uirr; in; Hdes; Rnor; Econ; Pnor
H+I+Lipos-Vacios	G; Uita; in; Psen; Hsen; Met
H+I+TAPW encapsulada	G; Uin; Pnor; Econ; Hnor; I; ulc; Rin; Met
H+I+IL-2 encapsulada	G; Uin; irr; Econ; Hsen; I; ulc; Rin; Sa
H+I+TANL encapsulada	G; Uin; ita; Hsen; I; nor; Rin; Psen; Met
<b>PROTOCOLO III</b>	
I+PBS	G; He; Uirr; ita; I; ulc
I+TAPW	G; He; Uin; irr; Econ; Hsen; des; Pdes; Rin
I+IL-2	G; He; Uin; irr; ita; I; ulc; Hdes; sen; Pcon; Econ; Rin; Su
I+Lipos-Vacios	G; Uin; irr; ita; I; ulc; Hdes; sen; Rin; flva
I+TAPW encapsulada	G; He; Uin; irr; Econ; Rin; Hdes; Su
I+IL-2 encapsulada	G; He; Uin; irr; ita; I; ulc; in; Rin; Hsen; des; Psen; Met
I+TANL encapsulada	G; He; Uin; irr; I; ulc; Hdes; Pdes; Econ; Su
<b>CONTROLES</b>	
H <sup>entile</sup>	G; Uirr; ita; I; nor; Hnor; sen; Pnor; Econ; Su
H <sup>entile</sup> +H <sup>encapsu</sup>	G; He; Uita; in; irr; I; ulc; Hdes; Pnor; Su
I	G; Uin; ita; irr; Hsen; Psen; Econ; I; ulc; flva

**Tabla 11. Registro de los efectos colaterales o secundarios más representativos por condición y tratamiento.**  
 Efectos más frecuentes por tratamiento: G, grasas; U, útero; ID, intestino delgado; R, riñones; H, hígado; E, estómago; I, intestinos; P, pulmones; u, uñas; a, ano; Met, metástasis; nor, normal; sen, sensible; irr, irrigado; ita, irritado; in, inflamado; con, contraído; atr, atrofiado; ulc, ulcerado; del, delgado; des, descolorido; S, sangrado; cal, calvicie; flva, flujo vaginal.  
 ( \* 15%-30%, normal; \*\* 31%-60%, medio; \*\*\* 61%-90%, obeso); He ( , pequeño; \*\*, medio; \*\*\*, grande); sen ( , nulo; , ligeramente; \*\*, medianamente; \*\*\*, altamente).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Como resultado de los tratamientos aplicados a los grupos de ratones, se observaron otros efectos secundarios además de los producidos por la presencia de las células tumorales o la hidrocortisona (Figs. 15, 16 y 17). Con el propósito de poder asociar estos efectos a los tratamientos aplicados, se descartaron los efectos producidos por estos dos factores y determinamos que el mayor número de efectos secundarios encontrado fue en los animales tratados con IL-2 libre o encapsulada. También observamos que los liposomas vacíos generan problemas de sensibilidad y que los menores efectos secundarios se obtuvieron al encapsular TAPW y el anticuerpo TANL (Tabla 12).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 15. Ratón CBA/ca que fue condicionado con el protocolo III de inducción.**

Los ratones condicionados con el protocolo III, presentaron escasa grasa interna, desarrollada en el contorno del útero sin cubrirlo. En esta figura también se observa una inflamación en la región de vías urinarias (círculo morado) y un hematoma en la región de inyección (círculo amarillo).



**Figura 16. Ratón CBA/ca que fué inmunodeprimido con 3mg/ml de hidrocortisona en los protocolos de inducción I y II.**

Los ratones condicionados a los protocolos II y III de inducción, desarrollaron grasa interna que se depositó en la cavidad intestinal (círculo blanco), cubriendo principalmente al útero (flecha amarilla), riñones (no observable) e intestinos (flecha azul).

NORMAL (nor)



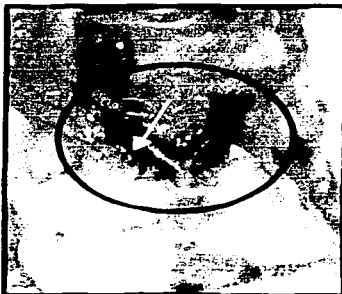
Útero de tamaño normal y apariencia rosada. Presenta una irrigación normal.

INFLAMADO (in)



Útero que presenta una gran inflamación, su color es gineado y presenta una ligera irrigación.

IRRIGADO (irr)



Útero que tiene un aumento en los vasos sanguíneos de color gineado que irrigan al útero. También se observa una inflamación.

IRRITADO (ita)



Útero con una severa irritación, con coloración violácea y ulceraciones a lo largo de los oviductos. Presenta también una irrigación.

**Figura 17. Comparación de los diferentes estados del útero, encontrados en los ratones hembras CBA/Ca.** Los diferentes efectos que presenta el útero se atribuye a: 1) la condición de inmunosupresión por la hidrocortisona y/o 2) la concentración que se ocupó en los tratamientos y que generaron efectos colaterales secundarios.

### Registro de efectos colaterales observados para cada tratamiento

Tratamiento	Efectos Secundarios Observados	Proporción
TAPW	Uin, del*; Hdes**, sen*; I'in*, sen*; P sen, des; Rin; Met	4/10
IL-2	Ucon; I'ulc; Econ*; Rin*; Hsen**, ita, des; Pderr***, con**, sen; Sa; Met	8/10
TANL	Uin; Hdes, Pdes	1/3
Lipos-Vacios	Uita*; Rin; Pcon, sen*; Hsen***, des; Met	5/7
TAPW encap	Udel**; Rin*; Econ; Pita*; Met	2/7
IL-2 encap	Uin; I'ulc*, in; Esen*, in; Hdes, sen**; Rin; Pdes*, con, atr; Met	4/7
TANL encap	Rin*; Pdes; Hdes*, sen*; Met	1/3

Tabla 12. Registro de los efectos colaterales por tratamiento. Efectos más frecuentes por tratamiento: U, útero; ID, intestino delgado; R, riñones; H, hígado; E, estómago; I, intestino; P, pulmones; U, uríñas; a, ano; Met, metastasis; nor, normal; sen, sensible; irr, irrigado; ita, irritado; in, inflamado; con, contraído; atr, atrofiado ulc, ulcerado; del, delgado; des, descolorido; S, sangrado; cal, calvicie; flva, flujo vaginal; sen (% nulo; \*, ligeramente; \*\*, medianamente; \*\*\*, altamente). La diferencia entre el número de animales tratados y los que muestran estos efectos secundarios son aquellos que solo presentaron los efectos de la inoculación de tumorales y/o la hidrocortisona.

### Identificación inmunohistoquímica de tumores inducidos en ratones hembras CBA/ca

Los cortes de las masas tumorales inducidas fueron evaluados inmunohistoquímicamente, con la técnica de inmunoperoxidasa indirecta con los anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina 18 y anti-citoqueratina 10/13 humanos.

Las laminillas de LSP humanos, presentaron una reactividad negativa para ambas anti-citoqueratinas ya que se observó un color azul-verde. Como control positivo se utilizó un corte de cáncer de pulmón que muestra una tinción de color café-marrón. Los cortes provenientes de los tumores inducidos en los ratones CBA/ca a través de los protocolos de inducción presentaron las citoqueratinas 10/13 y 18 ya que se observó el mismo color que el control positivo (Figs. 18-22).

El corte de la masa tumoral del ratón tratado con PBS y e inducido con el protocolo III (inoculación con células INBL), mostró un conjunto de células infiltrantes mas abundante que aquellos cortes de las masas tumorales tratadas con PBS e inducidas con los protocolos I y II (Inmunodeprimidos e inoculados con células INBL) (Figs. 18, 19 y 20).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las muestras de tejido obtenidas del protocolo I, demostraron el menor infiltrado celular en comparación de aquellas de los protocolos II y III. Cabe destacar que, los cortes obtenidos de los animales tratados con IL-2 y TAPW encapsuladas son las que presentan el mayor infiltrado en este protocolo. (Fig. 19). En el caso del protocolo II solo el tejido del ratón tratado con TAPW encapsulada demuestra infiltrado celular (Fig. 20). Los cortes obtenidos siguiendo el protocolo de inducción III, presentan el mayor infiltrado en comparación a los obtenidos del protocolo I y II. Cabe señalar que aunque los cortes de los ratones tratados con IL-2 y TAPW encapsulada de cualquier protocolo son los que presentan el mayor infiltrado, la mayor magnitud se observa en este protocolo (III) (Figs. 21 y 22).

Controles



PBS



IL-2



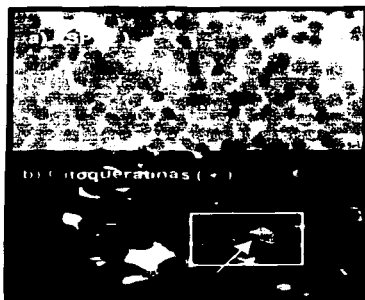
TAPW



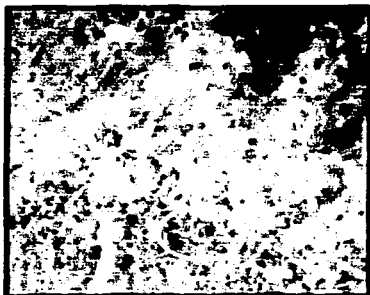
**Figura 18.** Cortes Histológicos de ratones CBA/ca, sometidos al protocolo I. En todos los cortes provenientes de los tumores inducidos en los ratones CBA/ca a través de los protocolos de inducción (I, II y III), en general se encontró reactividad positiva a las citoqueratinas 10/13 y 18 (flecha blanca).

Los LSP no presentaron reactividad positiva para ninguno de los anticuerpos, mientras que las muestras de tejido obtenidas para este protocolo, demostraron el menor infiltrado celular (círculo amarillo) en comparación de aquellas provenientes de los protocolos II y III.

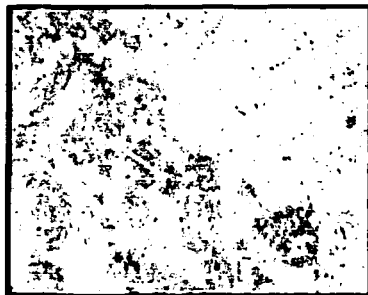
### Controles



### IL-2 encapsulada

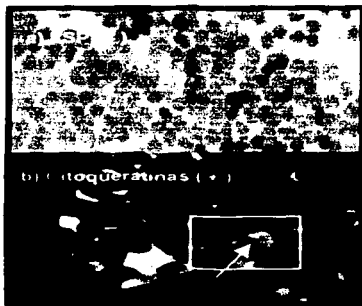


### TAPW encapsulada

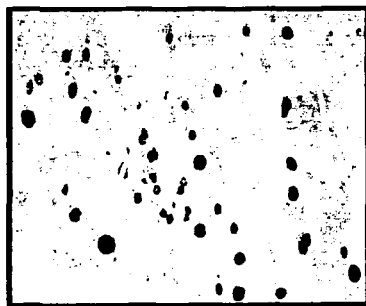


**Figura 19.** Cortes Histológicos de ratones CBA/ca. sometidos al protocolo I. Los LSP no presentaron reactividad positiva para ninguno de los anticuerpos, mientras que las muestras de tejido obtenidas en este protocolo demostraron tener reactividad positiva a las citoqueratinas (flecha blanca) y además presentar el menor infiltrado celular. Los tratamientos con IL-2 y TAPW encapsuladas presentaron el mayor infiltrado (circulo amarillo) en este protocolo.

Controles



PBS

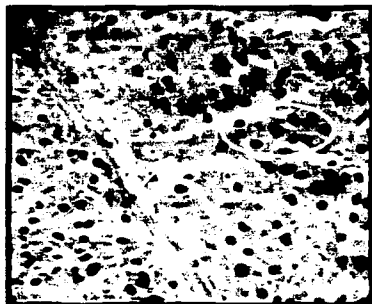
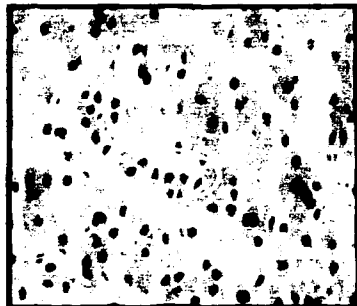


TAPW encapsulada



Figura 20. Cortes Histológicos de ratones CBA/ca, sometidos al protocolo II.

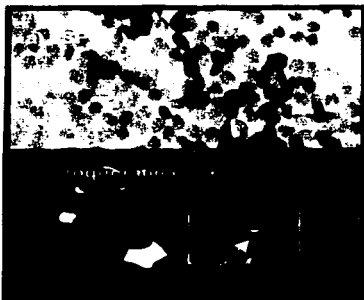
Los LSP no presentaron reactividad positiva para ninguno de los anticuerpos (flecha blanca), mientras que sólo el tejido del ratón tratado con TAPW encapsulada demostró infiltrado celular (círculo amarillo).

**Controles****PBS****IL-2****TAPW**

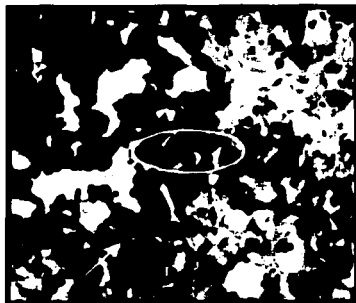
**Figura 21. Cortes Histológicos de ratones CBA/ca, sometidos al protocolo III. Los LSP no presentaron reactividad positiva para ninguno de los anticuerpos, mientras que los cortes obtenidos siguiendo este protocolo de inducción si la presentan (flecha blanca). Además en lo general son estos cortes los que presentan el mayor infiltrado en comparación a los protocolos I y II (círculo amarillo).**



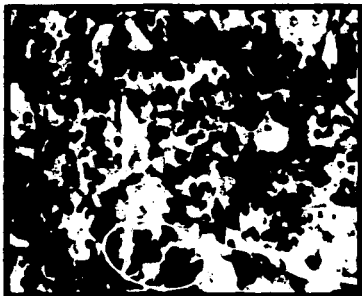
**Controles**



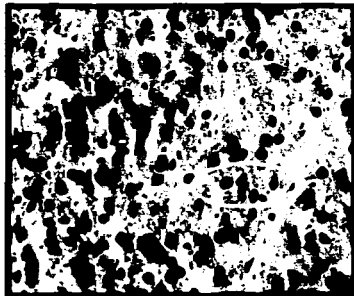
**Liposomas Vacíos**



**IL-2 encapsulada**



**TAPW encapsulada**



**Figura 22. Cortes Histológicos de ratones CBA/c<sub>g</sub>, sometidos al protocolo III. Los LSP no presentaron reactividad positiva para ninguno de los anticuerpos, mientras que los cortes de tumores provenientes de ratones tratados con liposomas-vacíos, IL-2 y TAPW encapsuladas sí la presentan en una tonalidad café marrón (flecha blanca). Y son los cortes de los ratones tratados con IL-2 y TAPW encapsulada los que presentan el mayor infiltrado celular (círculo amarillo) en este protocolo.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En nuestro país el carcinoma cérvico-uterino (CaCu) representa aproximadamente el 30 por ciento de todos los tumores malignos y la primera causa de muerte en la mujer (Cáceres *et al.* 2001). Por tal motivo, estudios recientes han buscado la forma de aplicar terapias inmunológicas que ayuden a combatir dicha enfermedad en mujeres mexicanas. Entre estas terapias, las más estudiadas son las que utilizan citocinas.

Por sus características la IL-2 es muy útil en inmunoterapia; sin embargo su aplicación es limitada pues al usarse en dosis altas genera alteraciones fisiológicas que causan efectos adversos (Talmadge *et al.*, 1987; Maas *et al.*, 1993; Smith, 1993; Ardizzone *et al.*, 1994; MacFarlane *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 1996 b). Las aportaciones de nuestro grupo de trabajo acerca de la inhibición y proliferación producida por IL-2 sobre la línea celular de CaCu INBL (Alvarado, 1997), nos han permitido pensar en su aplicación terapéutica para pacientes con esta enfermedad, buscando una estrategia capaz de reducir sus efectos secundarios.

Por tal razón, hemos probado el efecto *in vitro* de altas dosis de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos, sobre la proliferación de la línea INBL observando el mismo efecto inhibitorio que el producido por IL-2 libre. Al evaluar *in vivo*, el efecto de IL-2 encapsulada, se observó una disminución de las cargas tumorales en ratones, con la reducción de sus efectos tóxicos (Morán, 2000).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de TAPW para disminuir la carga tumoral en ratones de la cepa CBA/ca con masas tumorales inducidas por la inoculación de células INBL.

Se debe destacar el hecho de que al aplicar TAPW libre y encapsulada a los cultivos de células INBL se reducen los tiempos de respuesta de las células

tumorales ya sea inhibiendo o estimulando su proliferación, en comparación con la tiempo de respuesta a IL-2 libre; lo cual es de gran utilidad si se piensa en el uso de TAPW como una alternativa terapéutica para reducir los efectos tóxicos de IL-2, ya que la IL-2 de TAPW estaría circulando menos tiempo en el organismo sin afectar su actividad biológica. Además que las proteínas encapsuladas se liberarían continuamente desde los liposomas o bien podrían fusionarse a la membrana de las células epiteliales (Harvill *et al.*, 1996 b; Xiang *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Penichet *et al.*, 1999 b).

Por otro lado, la pequeña diferencia en la inhibición de la proliferación encontrada al usar 100 UI/ml de TANL y TAPW (34% y 41%) con respecto a IL-2 (56%) se puede atribuir al hecho de que existen diferentes vías de señalización intracelular que posiblemente se activen cuando las células tumorales son estimuladas ya sea con TAPW o con TANL, una de ellas es la que involucra al complejo p23/CDK2, el cual permite la fosforilación intracelular que ocasiona la disminución de la expresión membranal del antígeno HER-2/*neu*, arrestando el ciclo celular de las células tumorales en G<sub>1</sub>. Además existen datos que indican que las proteínas de fusión presentan una menor actividad antitumoral que las citocinas por sí solas, debido a su nueva conformación y tamaño (Chen *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 1995).

Los cultivos de CaCu INBL estimulados con liposomas catiónicos vacíos presentaron una disminución en su proliferación celular (14%), lo que sugiere que la combinación lipídica de fosfatidilcolina:espermidín-colesterol que se utiliza, genera una actividad antitumoral o una inhibición en las vías involucradas en la proliferación celular (Margni, 1996). Algunos autores han sugerido que la concentración que se utiliza de colesterol, es la que permite o no se observe una actividad antitumoral que pueden tener los liposomas formados por este lípido (Mayer *et al.*, 1989; Betageri, 1993).

Una vez comprobado el efecto de TAPW y TANL (anticuerpo anti/HER2) sobre la proliferación *in vitro* de la línea celular INBL se evaluó el efecto que causaría *in vivo* en tumores inducidos en ratones singénicos de la cepa CBA/ca, para comparar con los resultados descritos por Morán al usar IL-2 libre y encapsulada (Morán, 2000).

En este trabajo se utilizó la cepa singénica de ratones CBA/ca, debido a que es una cepa susceptible para la inducción de tumores de CaCu, a partir de la inoculación de células de la línea INBL (Morán 2000).

Nuestros resultados demostraron que el desarrollo de tumores de CaCu se favorece en los grupos que fueron inmunodeprimidos con hidrocortisona (Protocolos I y II), aumentando el desarrollo del tumor a medida que se incrementaban las aplicaciones de este corticosteroide. El desarrollo de masas tumorales en aquellos organismos que no fueron inmunodeprimidos (Protocolo III) se puede atribuir a factores, tales como la edad de los ratones y las condiciones de esterilidad que no permitieron que los ratones tuviesen retos inmunológicos que fortalecieran su defensa inmunológica o pudiesen ser parte de una intensa respuesta de histocompatibilidad, capaz de lisar células tumorales ya sea mediada por anticuerpos específicos contra antígenos tumorales o bien por la participación de células asesinas naturales (NK) capaces de lisar a las células de CaCu INBL o debido a la activación de la primer línea de defensa mediada por macrófagos, los cuales son células potencialmente importantes en la inmunidad antitumoral (Abbas *et al.*, 1994; Margni, 1996).

Una vez inducidos los tumores, la siguiente fase fue evaluar *in vivo*, si la TAPW y el anticuerpo TANL seguían conservando las propiedades observadas *in vitro*, comparándolas con el efecto de IL-2 tanto en su aplicación libre como encapsulada.

El hecho de que se observó disminución en la carga tumoral con 1 y 10 UI/ml de TAPW y TANL, semejante a la obtenida con 100UI/ml de IL-2 es muy relevante ya que permitiría usar las proteínas de fusión en concentraciones tan bajas que evitarían los efectos tóxicos de IL-2 o de los propios anticuerpos empleados además de reducir la masa tumoral. Aunado a esto, TAPW posee otras ventajas tales como: un tiempo de vida media diez veces mayor que el de IL-2, una estructura más estable que los del anticuerpo o la IL-2 por separado, así como una doble función en su actividad antitumoral o antiproliferativa (Becker *et al.*, 1996 b; Harvill *et al.*, 1996 a; Hank *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000; Penichet y Morrison, 2001). La razón de que no se tenga una eliminación total de las masas tumorales se puede atribuir a que no siempre las proteínas de fusión se pueden diluir y disminuir su efecto en su actividad antitumoral que el anticuerpo o las citocinas por separado, debido a que su efectividad puede ser menguada por los cambios en su tamaño, conformación química o la concentración que se utilice debido que los anticuerpos en bajas concentraciones no son eficientes en la disminución de las masas tumorales, por que disminuye su afinidad por el receptor (Chen *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 1995)

A pesar de que *in vitro* aumentó la proliferación de células tumorales en bajas concentraciones de TAPW, esto no sucede *in vivo* porque la interacción de ligando-receptor anti-HER2/*neu* de la proteína de fusión con las células tumorales, posiblemente activó diferentes vías de señalización intracelulares como la que involucra al complejo p23/CDK2, el cual permite la fosforilación intracelular que ocasiona la disminución de la expresión membranar del antígeno HER-2/*neu*, arrestando el ciclo celular de las células tumorales en G<sub>1</sub>, activando así una serie de mecanismos proapoptóticos que no conducen a la muerte celular, porque se activan otros factores como: PI 3-cinasa, Akt, GSK3 que permiten su sobrevivencia. Con lo que podemos explicar por que encontramos pequeñas cargas tumorales al usar TAPW o TANL como tratamiento (Harvill *et al.*, 1996 a y b). Por otro lado, se ha comprobado que al unirse el MoAb anti-TANL con su receptor en células tumorales de mama, la región de tirosina cinasa presente en el

receptor, desencadena un estímulo intracelular que evita la proliferación celular en el tumor (**Baselga et al., 1999; Fleming, 1999; Osaba y Burchmore, 1999; Molina et al., 2001**). El efecto producido por la IL-2 en la molécula de TAPW depende de la concentración a la que sea aplicada la proteína de fusión.

Utilizando altas concentraciones de TAPW, además de la unión al RHER2/*neu*, puede llevarse a cabo la activación del RIL-2 en las células tumorales estimulando una serie de vías de señalización intracelular que producen la actividad antiproliferativa y antitumoral. De hecho, esto es congruente con otro estudio que recientemente concluimos en el que se mostró que, al utilizar 100 UI/ml de IL-2 exógena, la señalización intracelular por la vía de las proteínas JAK 1 y JAK 3 es abatida, a lo cual podemos atribuir el efecto inhibitorio de la proliferación de INBL en presencia de altas concentraciones de IL-2 (**Valle, 2001**).

Al utilizar TAPW en bajas concentraciones, proponemos que la proliferación celular observada se debe a que a través de HER2/*neu*, se logra acercar IL-2 al RIL-2 presente en las células INBL I que mantiene la fosforilación de las proteínas JAK-1 y JAK-3 que promueven la proliferación observada (**Chen et al., 1994; Hung et al., 1995; Gillies et al., 1998; Rückert et al., 1998**).

De esta manera, la ventaja de usar un tratamiento empleando TAPW con respecto a un tratamiento con IL-2, es su mecanismo dual de acción, generando la activación del sistema inmunológico y de vías intracelulares (**Baselga et al., 1999; Hudson, 1999; Baselga y Averbuch, 2000; Molina et al., 2001**).

Además de que TAPW y TANL poseen actividad antitumoral, sus efectos colaterales no son tan graves como aquellos observados en los ratones que fueron tratados con IL-2. Estas observaciones confirman lo que algunos investigadores han demostrado para proteínas de fusión con IL-2 que no presentan una agresividad colateral considerable (**Cralu et al., 2001; Penichet y Morrison, 2001**).

Los resultados que obtuvimos con ratones CBA/ca con tumores inducidos con células de CaCu INBL tratados con IL-2, TAPW, TANL encapsulados y liposomas vacíos, demostraron que son los que presentan las cargas tumorales más pequeñas. Sin embargo, aún cuando la IL-2 encapsulada sigue siendo muy eficaz para disminuir o erradicar cargas tumorales, éste tratamiento produjo efectos colaterales en los ratones tales como: hipersensibilidad en pulmones, hígado y estómago, intestinos ulcerados y atrofia y contracción en pulmones (Talmadge *et al.*, 1987; Ardizzoni *et al.*, 1993; Smith, 1993). Los animales tratados con TAPW encapsulada, presentaron menor número de efectos secundarios y diferentes a los producidos por IL-2, como oviductos delgados, pulmones e hígado irritados y escasa sensibilidad en órganos.

Suponemos que, aún cuando la IL-2 está encapsulada (Lasic y Papahdjopoulos, 1995; Dass *et al.*, 1997; Idani *et al.*, 2000), es posible que al ser reconocidos los liposomas por neutrófilos, eosinófilos, granulocitos y macrófagos, éstos liberen la IL-2, la cual a su vez, induce la secreción de TNF, INF- $\gamma$  e IL-4 que pueden ser las responsables de los efectos colaterales que presentan los organismos tratados con IL-2 (Han *et al.*, 1996; Hassuneh *et al.*, 1997).

Aunque este proceso puede ocurrir también con los liposomas que encapsulan a TAPW, al ser los liposomas reconocidos y quedar expuesta la proteína de fusión, nosotros suponemos que la IL-2 que está ligada al anticuerpo anti-HER-2/*neu*, es dirigida al microambiente tumoral por el reconocimiento de HER2/*neu*. Esto es fácil de pensar ya que el receptor HER-2/*neu* esta sobreexpresado en la línea INBL por lo tanto, la posibilidad de unión con TAPW aumenta, lo cual puede conducir a la activación de las vías intracelulares mediadas por este receptor (Challita *et al.*, 1998 a; Peng *et al.*, 1999).

Por otro lado, debemos considerar que los liposomas catiónicos utilizados también tienen sus características propias que los hacen muy versátiles (**Nair et al., 1997; Cáceres et al., 2000**). Sabemos que los liposomas pueden ser endocitados por la célula, fusionados a la membrana celular o pueden liberar su contenido fuera de la célula blanco, por lo que sugerimos para futuros ensayos se evalúen estas posibilidades, valorando la interacción citocina-liposoma y liposomas-células blanco, mediante microscopía electrónica, marcaje, etc.

En cuanto a los efectos de la inmunosupresión en los ratones, observamos el desarrollo de una cantidad mayor de grasa interna, recubriendo principalmente el abdomen y los riñones y en menor proporción entre el peritoneo y la piel. Esta grasa acumulada confirma que el corticosteroide, además de la función inmunodepresora, tiene influencia en el metabolismo de las grasas en la cepa de ratones CBA/ca (**Ganong, 1986; Guyton, 1989; Murray, 1994**). Para evitarlo se sugiere que se utilicen cepas de ratones atímicas donde no sería necesario la inmunodepresión.

El diagnóstico práctico de cáncer todavía se limita a los exámenes histológicos (**Takahashi, 1982**). Para confirmar el origen tumoral de las masas de tejido encontradas en los ratones en nuestro trabajo, empleamos los anticuerpos anti-citoqueratinas 10/13 y 18, que reconocen proteínas filamentosas intermedias del citoesqueleto de células tumorales rico en citoqueratinas (**Moll et al., 1982**). Nuestros resultados de los cortes histológicos demostraron que todas las masas tumorales encontradas provienen de la inoculación de células de CaCu INBL, ya que fueron positivas a la prueba de citoqueratinas.

La diferencia entre todos los cortes histológicos fue la presencia de elementos celulares que suponemos son leucocitos infiltrados que fueron activados ya sea por los tratamientos contra la masa tumoral o bien por la estimulación del sistema inmunológico de los ratones ante la presencia de las células tumorales. La mayor cantidad de células infiltradas se encontró en aquellos



cortes provenientes de ratones hembras CBA/ca que fueron condicionadas al protocolo III (inoculados con células INBL) y tratadas principalmente con IL-2 vía intraperitoneal libre. Este resultado nos sugiere que existe una actividad antitumoral de las diferentes poblaciones de células inmunológicas estimuladas directamente por la IL-2 o por una respuesta de histocompatibilidad.

En aquellos cortes histológicos obtenidos de las masas tumorales de los organismos tratados con TAPW en forma libre con los protocolos I y II de inducción (Inmunodeprimidos e inoculados con células INBL) también se observaron una infiltración de células, aunque en menor proporción en comparación con los cortes provenientes de cargas tumorales inducidas con el protocolo III. Lo que indica que aún cuando el organismo es abatido en su defensa inmunológica los tratamientos de TAPW e IL-2 logran estimular una ligera defensa.

También nuestros resultados demostraron que es mayor la infiltración de células cuando TAPW e IL-2 son encapsuladas, con respecto a su propio control, observándose aún en aquellos cortes histológicos provenientes de masas tumorales de ratones sometidos al protocolo I y II, lo que nos hace pensar que los liposomas catiónicos son atraídos por las cargas eléctricas de las células tumorales INBL, generando la activación de la respuesta antitumoral.

En los tumores de los ratones tratados con liposomas catiónicos vacíos también se desarrolló infiltración celular que nos lleva a suponer que éste tratamiento genera una respuesta antitumoral debido a la combinación y a la proporción de los lípidos utilizados, lo que permiten se observen masas tumorales disminuidas encontradas en aquellos organismos tratados con liposomas catiónicos vacíos.

Nuestros resultados en los cortes histológicos provenientes de tumores tratados con IL-2 en forma libre y encapsulada demuestran que hay una relación entre la cantidad de células infiltradas y la presencia de efectos colaterales como

son: la sensibilidad capilar, ulceración, inflamación e irrigación de otros órganos en los ratones, lo que nos hace pensar que estos efectos colaterales sean generados por la propia IL-2 o por la activación de la respuesta inmunológica mediada por ella.

Al revisar los cortes histológicos provenientes de masas tumorales de ratones tratados con TAPW tanto en forma libre como encapsulada se observó una presencia mayor de células infiltradas que en los cortes de tumores de ratones tratados con TANL. Lo que demuestra la ventaja de la proteína de fusión sobre el anticuerpo, pues es la citocina de TAPW la que estimula una respuesta del sistema inmunológico sin los efectos colaterales de la IL-2 por sí sola.

Algunos autores han demostrado que independientemente de la concentración de IL-2 usada, son los linfocitos CD8<sup>+</sup> quienes son los primeros en responder; sin embargo, la activación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> sí depende de la concentración de la IL-2 (Sabzevari *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1998; Craiu *et al.*, 2001). Por esto, suponemos que aquellos cortes histológicos provenientes de tumores de ratones CBA/ca tratados con todas las concentraciones empleadas de TAPW e IL-2 hayan activado a linfocitos de tipo CD8<sup>+</sup>, y sólo sean los cortes histológicos provenientes de masas tumorales de ratones tratados con concentraciones de 100 UI/ml los que hayan generado la activación de poblaciones linfocitarias CD4<sup>+</sup>. Para comprobarlo, es necesario que para futuras investigaciones en la UIDCC se caractericen las poblaciones leucocitarias en cortes histológicos de masas tumorales inducidas en ratones que hayan sido tratados con las concentraciones empleadas de TAPW e IL-2 para determinar si se logran activar estas poblaciones de linfocitos.

## CONCLUSIONES

- a. Se detectó *in vitro* en la línea de CaCu INBL, un efecto estimulador en la proliferación celular, en dosis bajas de TANL y TAPW, mientras que en dosis altas su efecto fue inhibitorio, reflejando un resultado similar al observado para IL-2.
- b. El efecto encontrado *in vitro* de TAPW y TANL no se ve alterado cuando son encapsuladas en liposomas catiónicos.
- c. Se observó una disminución en las masas tumorales de los ratones CBA/ca tratados con TAPW aún en bajas concentraciones, aumentándose dicho efecto con dosis más elevadas.
- d. La IL-2 es más eficiente para reducir las masas tumorales de los ratones CBA/ca en comparación con la proteína de fusión TAPW y el anticuerpo TANL. Sin embargo, TAPW y TANL si evitaron generar efectos tóxicos tan agresivos como los producidos por la IL-2 en dosis altas.
- e. Los liposomas conteniendo, ya sea IL-2, TAPW o TANL reducen el volumen de tumores inducidos en ratones de la cepa CBA/ca, al administrarse *in vivo*.
- f. Los liposomas catiónicos vacíos constituidos de fosfatidilcolina:espermidin-colesterol son capaces de generar un estímulo antiproliferativo y antitumoral en tumores de CaCu de INBL inducidos en ratones singénicos CBA/ca.
- g. Se detectó que la hidrocortisona provoca alteraciones secundarias tales como la acumulación de grasa entre piel, peritoneo y órganos internos en mayor o menor grado.

## RECOMENDACIONES

- i. Se sugiere realizar la formulación de nuevos ensayos *in vivo*, con la cepa de ratones CBA/ca, utilizando mayor número de ratones para determinar qué concentración es la que genera la disminución o una regresión completa de las masas tumorales, sin descuidar la reducción o eliminación de los efectos tóxicos colaterales que reporta la IL-2.
- ii. Se sugiere, modificar la proporción de los lípidos usados y el tamaño del lípido para conocer cual o cuales lípidos son los que producen un efecto antitumoral.
- iii. Para establecer la posición de la proteína de fusión en el liposoma, se sugiere, realizar un 'rasurado' de éstos, mediante una proteasa (tripsina), de tal manera que elimine toda la posible proteína alrededor del liposoma. Si, estos liposomas tienen el mismo efecto en nuevos ensayos se sugeriría que TAPW se encuentra en el interior del liposoma y si los efectos desaparecen significará que TAPW se encuentra anclada en el exterior.
- iv. Se aconseja realizar ensayos *in vivo* con cepas de ratones atímicos que permitan evaluar los efectos de TAPW e IL-2 encapsulados, sin la necesidad de inmunodeprimirlos y al mismo tiempo conocer el papel que desempeñan los linfocitos T en la regresión del tumor por este método.
- v. Por último, se recomienda realizar el reconocimiento a través de inmunohistoquímica de las poblaciones de leucocitos infiltrantes a fin de identificar las familias de linfocitos que son responsables en mayor medida de la regresión tumoral y de los efectos secundarios.

## BIBLIOGRAFÍAS

- ❖ Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. 1994. Cellular and Molecular Immunology. Edit. W.B. USA pp. 145-157.
- ❖ Albanell, J., Codony, S.J., Rojo, F., Del Campo, M.J., Sauleda, S., Anido, J., Raspall, G., Giralt, J., Roselló, J., Nicholson, I.R., Mendelsohn, J. y Baselga, J. 2001. Activated Extracellular Signal-regulated Kinases: Association with Epidermal Growth Factor Receptor/Transforming Growth Factor  $\alpha$  Expression in Head and Neck Squamous Carcinoma and Inhibition by Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Treatments. *Cancer Research* 61:6500-6510.
- ❖ Allen, M.T., Brandeis, E., Hansen, B.C., Kao, Y.G. y Zalipsky, S. 1995. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99-108.
- ❖ Alvarado, M.J.A. 1997. Presencia de la cadena  $\alpha$ ,  $\beta$  del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM: México, D.F.
- ❖ Anderson, P.M. y Sorenson, M.A. 1994. Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clin. Pharmacokinet.* 27(1):19-31.
- ❖ Ardizzoni, A., Bonavia, M., Viale, M., Baldini, E., Mereu, C., Verna, A., Ferrini, S., Cinquegrana, A., Molinari, S., Mariani, L.G., Roest, J.G., Sharenberg, J., Palmer, A.P., Rosso, R., Ropolo, F. y Raso, C. 1994. Biologic and Clinical Effects of Continuous Infusion Interleukin-2 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer* 73(5):1353-1360.
- ❖ Avice, N.M., Sarfati, M., Triebel, F., Delespesse, G. y Demeure, E.C. 1999. Lymphocyte Activation Gene-3, a MHC Class II Ligand Expressed on Activated T Cells, Stimulates TNF- $\alpha$  and IL-12 Production by Monocytes and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 162:2748-2753.
- ❖ Barouch, H.D., Santra, S., Steenbeke, D.T., Zheng, X.X., Perry, C.H., Davies, M.E., Freed, C.D., Craiu, A., Strom, B.T., Shiver, W.J. y Letvin, L.N. 1998. Augmentation and Suppression of Immune Responses to an HIV-1 DNA Vaccine by Plasmid Cytokine/Ig Administration. *The Journal of Immunology*. 161:1875-1882.

- ❖ Baselga, J. y Averbuch, D.S. 2000. ZD139 ('Iressa')<sup>1,2</sup> as an Anticancer Agent. *Drugs* 60 Suppl 1:33-40.
- ❖ Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, M.Y. y Mendelsohn, J. 1998. Recombinant Humanized Anti-HER2 Antibody (Herceptin<sup>TM</sup>) Enhances the Antitumor Activity of Paclitaxel and Doxorubicin against HER2/*neu* Overexpressing Human Breast Cancer Xenografts. *Cancer Research* 58:2825-2831.
- ❖ Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C.C., Dantis, L., Sklarin, T.N., Seidman, D.A., Hudis, A.C., Moore, J., Rosen, P.P., Twaddell, T., Henderson, C.I. y Norton, L. 1999. Phase II Study of Weekly Intravenous Trastuzumab (Herceptin) in Patients With HER2/*neu* – Overexpressing Metastatic Breast. *Seminars in Oncology* 26(4) Suppl 12: 78-83.
- ❖ Becker, C.J., Pancook, D.J., Gillies, D.S., Furukawa, K. y Reisfeld, A.R. 1996a. T Cell-mediated Eradication of Murine Metastatic melanoma Induced by Targeted Interleukin 2 Therapy. *J. Exp. Med.* 183:2361-2366.
- ❖ Becker, C.J., Pancook, D.J., Gillies, D.S., Menselsohn, J. y Reisfeld, A.R. 1996b. Eradication of human hepatic and pulmonary melanoma metastases in SCID mice by antibody-interleukin 2 fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2702-2707.
- ❖ Bell, J.I., Owen, M.J., Simpson, E. 1995. T Cell Receptors. Oxford University Press. USA pp. 1-12 y 151-163.
- ❖ Betageri, V.G., 1993. Liposomal Encapsulation and Stability of Dideoxynosine Triphosphate. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 19(5):531-539.
- ❖ Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, S., Rammensee, H-G., Kanz, L. y Brugger, W. 1998. Her-2/*neu*-derived Peptides Are Tumor-associated Antigens Expressed by Human Renal Cell and Colon Carcinoma Lines and Are Recognized by *in Vitro* Induced Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Cancer Research* 58:732-736.
- ❖ Buchli, J.P., Wu, Z. y Ciardelli, L.T. 1997. The Functional Display of Interleukin-2 on Filamentous Phage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 339 (1):79-84.
- ❖ Bulfone-Paus, S., von Bernuth, H., Rückert, R., Wachtlin, J., Ungureanu, D., Notter, M., Krause, H., Pohl, T., Paus, R. y kundendorf, U. 1998. Vaccination with Tumor Cells engineered to Secrete Interleukin 2-Immunglobulin G Fusion Protein Induces Tumor Rejection. *Cancer Research* 58:2707-2710.

- ❖ Cáceres-C., R.J., Alvarado-M, J.A., Waga, K., Rangel-C., R., Monroy-G., A., Rocha-Z., L., Urdiales-R., J., Weiss-S., B., Haman, A., Hugo, P., Brousseau, R. y Hoang, T. 2001. Implication of Tyrosine Kinase Receptor and Steel Factor in Cell Density-dependent Growth in Cervical Cancers and Leukemias. *Cancer Research* 61:6281-6289.
- ❖ Challita, E.M.P., Penichet, L.M., Shin, U.S., Poles, T., Mosammaparast, N., Mahmood, K., Slamon, J.D., Morrison, L.S. y Rosenblatt, D.J.1998a.A B7-1-Antibody Fusion Protein Retains Antibody Specificity and Ability to Activate Via the T Cell Costimulatory Pathway.*The Journal of Immunology* 160:3419-3426.
- ❖ Challita, E.P.M., Abboud, N.C., Morrison, L.S., Penichet, L.M., Rosell, E.K., Poles, T., Hickey, P.S., Planelles, V. y Rosenblatt, D.J.1998b.A RANTES-Antibody Fusion Protein Retains Antigen Specificity and Chemokine Function.*The Journal of Immunology* 161:3729-3726.
- ❖ Chen,T.T., Tao, M.H. y Levy, R.1994. Idiotype-Cytokine Fusion Proteins as Cancer Vaccines.*The Journal of Immunology* 153:4775-4787.
- ❖ Chiao, J.W. 1988. Biological Response Modifiers and Cancer Therapy.*Marcel Dekker.Inc. USA* pp. 1-50, 81-101 y 335-362.
- ❖ Ciacci, C., Mahida, R., Dignass, A., Koizumi, M. y Podolsky,K. 1993. Functional Interleukin-2 Receptors on Intestinal Epithelial Cells.*J.Clin.Invest* 92:527-532.
- ❖ Colchovius, B., Perschl, A., Adema, J.G. y Zöller, M.1999.Human Melanoma Therapy in the SCID Mouse: *In Vivo* Targeting and Reactivation of Melanoma-Specific Cytotoxic T Cells by B1-Specific Antibody Fragments.*Int J. Cancer* 81:486-493.
- ❖ Cortinas, C. 1998. *Cancer: Herencia y Ambiente. La Ciencia/96 para todos.* pp. 1-24.
- ❖ Coventry, J.B., Weeks, C.S., Heckford, E.S., Sykes, J.P., Bradley, J. y Skinner, M.J.1996.Lack of IL-2 Cytokine Expression Despite IL-2 Messenger RNA Transcription in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary Human Breast Carcinoma.*The Journal of Immunology* 156:3486-3492.
- ❖ Craiu, A., Barouch, H.D., Zheng, X.X., Kuroda, J.M., Schmitz, E.J., Lifton, A.M., Steenbeke, D.T., Nickerson, E.C., Beaudry, K., Frost, D.J., Reimann, A.K., Strom, B.T. y Letvin, L.N.2001.An IL-2/Ig Fusion Protein Influences CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes in Naïve and Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Monkeys.*AIDS Research and Human Retroviruses* 17(10):873-886.

- ❖ Daniel, W.W.1995.Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. 3ª edición. Editorial LIMUSA, S.A. de C.V. México. pp. 362-365.
- ❖ Dass,R.C., Walker, L.T., Burton, A.M. y Decruz, E.E.1997.Enhanced Anticancer Therapy Mediated by Specilized Liposomes.J.Pharm.Pharmacol. 49:972-975.
- ❖ Dela Cruz, S.J., Trinh, R.K., Morrison, L.S. y Penichet, L.M. 2000. Recombinant Anti-Human HER2neu IgG3-(GM-CSF) Fusion Protein Retains Antigen Specificity and Cytokine Function and Demonstrates Antitumor Activity.The Journal of Immunology 165:5112-5121.
- ❖ DeVita, T.V., Hellman, S., Rosenberg, A.S. 1993. Cancer: Principles & Practice of Oncology, 4<sup>th</sup> edition. Vol 1. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. pp. 1168-1181.
- ❖ Dubinett, S.M., Patrone, L., Tobias, J., Cochran, A.J., Wen, D.R., McBride, W.H. 1993. Intratumoral interleukin-immunotherapy:activation of tumor-infiltrating and splenic lymphocytes in vivo. Cancer Immunol. Immunother. 36:156-162.
- ❖ Ewer, S.M., Gibbs, R.H., Swafford, J. y Benjamin, S.R.1999.Cardiototoxicity in Patients Receiving Trastuzumab (Herceptin): Primary Toxicity, Synergistic or Sequential Stress, or Surveillance Artifact?.Seminars in Oncology 26(4) Suppl 12: 96-101.
- ❖ Fell, P.H., Gayle, A.M., Grosmaire, L. y Ledbetter, A.J.1991. Genetic Construction and Characterization of a Fusion Protein Consisting of a Chimeric F(ab') With Specificity for Carcinomas and Human IL-2. The Journal of Immunology. 146:2446-2452.
- ❖ Fleming, R.T.1999.Tissues in the Design of Clinical Trials: Insights From the Trastuzumab (Herceptin) Experience. Seminars in Oncology 26(4) Suppl 12: 102-107.
- ❖ Gabinson, A., Catane, R. Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martín, F., Huang, A. y Barenholz, Y.1994.Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudated of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes.Cancer Research 54:987-992.
- ❖ Ganon, F.W.1986.Fisiología Médica.10ª edición. El Manual Moderno. México. P.454.
- ❖ Gariglio, P., Benitez, B.L., Berumen, J., Alcocer, M.J., Tamez, R. Y Madrid, V.1998.Therapeutic Uterine-Cervix Cancer Bacines in Humans. Archives of Medical Research 29(4):279-284.



- ❖ Gillies, D.S., Lan, Y., Wesolowski, S.J., Qian, X., Reisfeld, A.R., Holden, S., Super, M. y Lo, M.K.1998.Antibody-IL-12 Fusion Proteins Are Effective in SCID Mouse Models of Prostate and Colon Carcinoma Metastases.The Journal of Immunology 160:6195-6203.
- ❖ González, R.I., Nazabal, M., Claro, L.A., Peralta, A., Méndez del Castillo, D. y Cruz, C.M.E.1995. Presencia de Papiloma Virus Humano en Lesiones Genitales. Bioquímica 2 XX (79):266-270.
- ❖ González,M.M.G.1996.Técnicas en Biología Celular.Teoría y Práctica. AGT Editor, S.A. México. pp. 111-126, 157-199.
- ❖ Gridley, D.S., Sura, S.S., Uhm, J.R., Lin, C.H., Kettering, J.D. 1993. Effects of ianti-transforming growth factor-beta antibody an interleukin-2 in tumor-bearing mice. Cancer Biother. 8(2):159-170.
- ❖ Guyton, C.A., 1989.Tratado de Fisiología Médica.Interamericana McGraw Hill.México. pp. 51-69.
- ❖ Habib,J.M. y Rogers, A.J.Stabilization of local anaesthetics in liposomes. En Robinstein M.H.1989.Pharmaceutical Technology pp. 24-26.
- ❖ Han, D., Pottin, C.C., Imro, A.M., Scudeletti, M., Doucet, C., Puppo, F., Brouty, B.D., Vedrenne, J., Sahraoui, Y., Brailly, H., Poggi, A., Jasmin, C., Azzarone, B. y Indiveri, F. 1996. IL-2 triggers a tumor progression process in a melanoma cell line MELP, derived from a patient whose metastasis increased in size during IL2/INF $\alpha$  biotherapy.Oncogene 12:1015-1023.
- ❖ Hank, A.J., Surfus, E.J., Gan, J., Jaeger, P., Gillies, D.S., Reisfeld, A.R. y Sondel, M.P.1996.Activation of Human Effector Cells by a Tumor Reactive Recombinant Anti-Ganglioside GD<sub>2</sub> Interleukin-2 Fusion Protein (ch.14.18-IL-2).Clinical Cancer Research 2:1951-1959.
- ❖ Harvill, T.E., Fleming, M.J. y Morrison, L.S.1996.In Vivo Properties of an IgG3-IL-2 Fusion Protein.The Journal of Immunology 157:3165-3170.
- ❖ Harvill, T.E. y Morrison, L.S.1996.An IgG3-IL-2 Fusion Protein has higher affinity than hrlL-2 for the IL-2R alpha subunit: real time measurement of ligand binding.Molecular Immunology 33 (11/12):1007-1014.
- ❖ Hassuneh, R.M., Nagarkatti, S.P. y Nagarkatti, M.1997.Evidence for the Participation of Interleukin-2 (IL-2) and IL-4 in the Regulation of Autonomous Growth and Tumorigenesis of Transformed Cells of Lymphoid Origin.Blood 89 (2):610-620.
- ❖ Hicks,J.J.2000.Bioquímica.Mc Graw Hill. México.

- ❖ Ho,G.Y.,Burk, R.D., Klein, S., Kadish, A.S. Chang, C.J., Palan, P., Bacu, J., Tachezy, R., Lewis, R., Romney, S. 1995.Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. J. Natl. Cancer. Inst. 87(18):1365-1371.
- ❖ Hornick, L.J., Khawli, A.L.,Hu, P., Sharifi, J., Khanna, C. y Epstein, L.1999.Pretreatment with a Monoclonal Antibody/Interleukin-2 Fusion Protein Directed against DNA Enhnces the Delivery of Therapeutic Molecules to Solid Tumors.Clinical Cancer Research 5(1):51-60.
- ❖ Hu, P., Hornick, L.J., Glasky, S.M., Yun, A., Miikie, N.M., Khawli, A.L., Anderson, M.P. y Epstein, L.A.1996.A Chimeric Lym-1/Interleukin 2 Fusion Protein for Increasing Tumor Vascular Permeability and Enhancing Antibody Uptake.Cancer Research 56:4998-5004.
- ❖ Huang,K.S., Lee, K-D., Hong, K., Friend, S.D. y Papahadjopoulos, D.1992a.Microscopic Localization of Sterically Stabilized Liposomes in Colon Carcinoma-bearing Mice.Cancer Research 52:5135-5143.
- ❖ Huang, K.S., Mayhew, E., Gilani, S., Lasic, D.D., Martin, J.F. y Papahadjopoulos, D.1992b.Pharmacokinetics and Therapeutics of Sterically Stabilized Liposomes in Mice Bearing C-26 Colon Carcinoma.Cancer Research 52:6774-6781.
- ❖ Hudson, J.P.1999.Recombinant antibody constructs in cancer therapy.Curren Opinion in Immunology 11:548-557.
- ❖ Hung, M.C., Matin, A., Zhang, Y., Xing, X., Sorgi, F., Huang, L. y Yu, D.1995.HER-2/*neu*-targeting gene therapy - a review.Gene 159(1):65-71.
- ❖ Hung, M-C. y Lau, Y-K. 1999. Basic Science of HER2/*neu*: A Review.Seminars in Oncology 26(4) Suppl 12: 51-59.
- ❖ Idani,H., Matsuoka, J., Yasuda, T., Kobayashi, K. y Tanaka, N.2000.Intra-Tumoral Injection of Doxorubicin (Adriamycin) Encapsulated in Liposome Inhibits Tumor Growth, Prolongs Survival Time and is not Associated with local or Systemic side Effects.Int. J. Cancer 88:645-651.
- ❖ Janoff, S.A.1999.Liposomes Rational Design. Marcel Dekker, Inc. USA. pp.1-12, 63-87 y 159-179.
- ❖ Kaplan, L.D., Khan, J.O., Crowe, S., Northfelt, D., Neville, P., Grossberg, H., Abrams, O.I., Tracey, J., Mills, J., Volberding, P.A. 1991. Clinical and Virologic Effects of Recombinant Human Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor in Patients Receiving Chemotherapy for Human

Immunodeficiency virus-associated Non-Hodgkin's Lymphoma: Results of a Randomized Trial. *Jour. Clinical Oncology*. 9:929-940.

- ❖ Kersemaekers, F.A.M., Fleuren, J.G., Kenter, G.G., Van den Broek, M.C.J.L., Uljee, M.S., Hermans, J. y Van de Vijver, J.M. 1999. Oncogene Alterations in Carcinomas of the Uterine Cervix: Overexpression of the Epidermal Growth Factor Receptor Is Associated with Poor Prognosis. *Clinical Cancer Research* 5:577-586.
- ❖ Klein, J., Horejsi, V. 1997. *Immunology Blackwell Science USA*. Second Ed. pp.313.
- ❖ Khanna, C., Anderson, M.P., Hasz, E.D., Katsanis, E., Neville, M., Klausner, S.J. 1997a. Interleukin-2 Liposome Inhalation Therapy Is Safe and Effective for Dogs with Spontaneous Pulmonary Metastases. *Cancer* 79:1409-21.
- ❖ Khanna, C., Waldrep, C.J., Ancerson, M.P., Weischlbaum, W.R., Hasz, E.D., Katsanis, E. y Klausner, S.J. 1997b. Nebulized Interleukin 2 Liposomes: Aerosol Characteristics and Biodistribution. *J.Pharm.Pharmacol* 49:960-971.
- ❖ Langman, R.E. 1989. *The Immune System. Academic Press, Inc. USA*. pp.1-10 y 127-142.
- ❖ Lasic, D.D. y Papahadjopoulos, D. 1995. *Liposomes Revisited. Science* 267(3):1275-6.
- ❖ LeMaistre, F.C., Saleh, N.M., Kuzel, M.T., Foss, F., Platanias, C.L., Schwartz, G., Ratain, M., Rook, A., Freytes, O.C., Craig, f., Reuben, J. y Nichols, C.J. 1998. Phase I Trial of a Ligand Fusion-Protein (DAB<sub>389</sub>IL-2) in Lymphomas Expressing the Receptor for Interleukin-2. *Blood* 91(2):399-405.
- ❖ Lode, N.H., Moehler, T., Xiang, R., Jonczyk, A., Gillies, D.S., Cheresch, A.D. y Reisfeld, A.R. 1999a. Synergy between an antiangiogenic integrin  $\alpha_v$  antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1591-1596.
- ❖ Lode, N.H., Xiang, R., Duncan, R.S., Theofilopoulos, N.A., Gillies, D.S. y Reisfeld, A.R. 1999b. Tumor-targeted IL-2 amplifies T cell-mediated immune response induced by gene therapy with single-chain IL-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:8591-8596.
- ❖ Loeffler, M.C., Platt, L.J., Anderson, M.P., Katsanis, E., Ochoa, B.J., Urba, J.W., Longo, L.D., Leonard, S.A. y Ochoa, C.A. 1991. Antitumor Effects of Interleukin 2 Liposomes and Anti-CD3-Stimulated T-Cells against Murine MCA-38 Hepatic Metastasis. *Cancer Research* 51:2127-2132.

- ❖ Lopes de Menezes, E.D., Pilarski, M.L. y Allen, M.T.1998.*In Vitro* and *In Vivo* Targeting of Immunoliposomal Doxorubicin to Human B-Cell Lymphoma.Cancer Research 58:3320-3330.
- ❖ LoRusso, M.P., aukerman, L.S., Polin, L., Redman, G.B., Valdivieso, M., Biernat, L. y Corbett, H.T.1990. Antitumor Efficacy of Interleukin-2 Alone and in Combination with Adriamycin and Dacarbazine in Murine Solid Tumor Systems.Cancer Research 50:5876-5882.
- ❖ Lustgarten, J., Marks, J. y Sherman, A.L.1999.Redirecting Effector T Cells Through Their IL-2 Receptors. The Journal of Immunology 162:359-365.
- ❖ Lydyard, P.M., Whelan, A., Fanger, M.W. 2000. Immunology.Instan Notes.BIOS.Springer,UK. pp.1-16 y 85-94.
- ❖ Maas, A.R., Dullens, J.F.H., DeJong, H.W. y Otter, D.W.1989.Immunotherapy of Mice with a Large Burden of Disseminated Lymphoma with Low-Dose Interleukin 2.Cancer Research 49:7037-7040.
- ❖ Maas, A.R., Dullens, J.F.H. y Otter, D.W.1993.Interleukin-2 in cancer treatment: disappointing or (still) promising? A review. Cancer Immunol Immunother 36:141-148.
- ❖ MacFarlane, P.M., Yang, C.J., Guleria, S.A., White, L.R., Seipp, A.C., Einhorn, H.J., White, E.D. y Rosenberg, A.S.1994.The Hematologic Toxicity of Interleukin-2 in Patients with Metastatic Melanoma and Renal Cell Carcinoma.Cancer 75(4):1030-1037.
- ❖ Margni, R.A.1996.Immunología e Inmunoterapia Fundamentos.5ª edición.Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 664-680.
- ❖ Mayer, D.L., Tai, L.C.L., Ko, S.C.D., Masin, D., Ginsberg, S.R., Cullis, R.P. y Baily, B.M.1989.Influenced of Vesicle Size, Lipid Composition, and Drug-to-Lipid Ratio on the Biological Activity of Liposomal Doxorubicin in Mice.Cancer Research 49:5922-5930.
- ❖ McMillan, N.D., Kernohan, M.N., Flett, E.M., Heys, D.S., Deehan, J.D., Sewell, F.H., Walker, F. y Eremin, O.1995.Interleukin 2 Receptor Expression and Interleukin 2 Localisation in Human Solid Tumour Cells *In situ* and *In vitro*: Evidence for a Direct Role in the Regulation of Tumor Cell Proliferation.Int. J. Cancer 60:766-772.
- ❖ Meager, A.1991.Cytokines. Prentice Hall Advanced Reference Series.New Jersey, USA. pp.
- ❖ Meager, T.1998.The Molecular Biology of Cytokines.John Wiley & Sons.England. pp. 1-109, 141-224, 237-245 y 259-267.

- ❖ Medina, P.O., Söderlund, T., Laakkonen, J.L., Tuominen, J.K.E., Koivunen, E. y Kinnunen, J.K.P. 2001. Binding of Novel Peptide Inhibitors of Type IV Collagenases to Phospholipid Membranes and Use in Liposome Targeting to Tumor Cells *in Vitro*. *Cancer Research* 61:3978-3985.
- ❖ Melani, c., Figini, M., Nicosia, D., Luison, e., Ramakrishna, V., Casorati, G., Parmiani, G., Eshhar, Z., Ganevari, S. Colombo, P.M. 1998. Targeting of Interleukin 2 to Human Ovarian Carcinoma by Fusion with a Single-Chain Fv of Antifolate Receptor Antibody. *Cancer Research* 58:4146-4154.
- ❖ Mendelsohn, J. y Baselga, J. 2000. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19:6550-6565.
- ❖ Mire-Sluis, A. y Thorpe, R. 1998. *Cytokines*. Academic Press. Great Britain. pp. 19-33.
- ❖ Mitchell, S.M. y Press, F.M. 1999. The Role of Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization for HER-2/*neu* in Assessing the Prognosis of Breast Cancer. *Seminars in Oncology* 26(4) Suppl 12:108-116.
- ❖ Molina, A.M., Servat, C.J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J. y Baselga, J. 2001. Trastuzumab (Herceptin), a Humanized Anti-HER2 Receptor Monoclonal Antibody, Inhibits Basal and Activated HER2 Ectodomain Cleavage in Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 61:4744-4749.
- ❖ Monroe, J.G. y Rothenberg, V.E. 1998. *Molecular Biology of B-cell and T-cell Development*. Humana Press. USA. pp. 149-251.
- ❖ Morán, B.S.H. 2000. Reducción de Tumores de Carcinoma de Cervix Inducidos en Ratones de la cepa CBA por la Administración de IL-2 encapsuada en Liposomas Positivos. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- ❖ Moll, R., Wernewr, W.F., Schiller, D.L. 1982. The catalog of human cytokeratins. Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24.
- ❖ Murray, R.K., Gramer, K.D., Mayes, P.A. y Rodwell, V.W. 1994. *Bioquímica de Harper. El Manual Moderno*. México. Pp. 180-181, 884.
- ❖ Nair, S.A., Nair, M.B., Jayaprakash, P.G., Rjalekshmy, T.N., Nair, N.K., Pillai, M.R. 1997. Cytokeratins and the evaluation of tumor differentiation in squamous lesions of the uterine cervix. *Gen Diagn. Pathol.* 143(1):15-22.
- ❖ Nabel, J.G., Nabel, G.E., Yan, Z-Y., Fox, A.B., Plautz, E.G., Gao, X., Huang, L., Shu, S., Gordon, D. y Chang, E.A. 1993. Direct gene transfer with DNA-

liposome complexes in melanoma: Expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11307-11311.

- ❖ Nakamura, Y., Russell, S.M., Mess, S.A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S. y Leonard, W.J. 1994. Heterodimerization of the IL-2 receptor  $\beta$ - and  $\gamma$ -chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature* 369:330-332.
- ❖ Nakano, T., Oka, K., Ishikawa, A. y Morita, S. 1997. Correlation of Cervical Carcinoma *c-erb B-2* Oncogene with Cell Proliferation Parameters in Patients Treated with Radiation Therapy for Cervical Carcinoma. *Cancer* 79:513-20.
- ❖ Oettgen, H.F. 1991. Cytokines in clinical cancer therapy. *Cancer Current opinion in Immunology*. 3:699-705.
- ❖ Osoba D. y Burchmore, M. 1999. Health-Related Quality of Life in Women With Metastatic Breast Cancer Treated With Trastuzumab (Herceptin). *Seminars in Oncology* 26(4) Suppl 12:84-88.
- ❖ Ostro, J.M. 1987. Liposomes from Biphysics to Therapeutics. Marcel Dekker, Inc. USA pp. 1-72, 109-156 y 195-218.
- ❖ Park, W.J., Hong, K., carter, P., Asgari, H., Guo, Y.L. Keller, A.G., Wirth, c., Shalaby, R., Kotts, C., Wood, I.W. Papahadjopoulos, D. y Benz, C.C. 1995. Development of anti-p185<sup>HER2</sup> immunoliposomes for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:1327-1331.
- ❖ Peng, S.L., Penichet, L.M. y Morrison, L.S. 1999. A Single-Chain IL-12 IgG3 Antibody Fusion Protein Retains Antibody Specificity and IL-12 Bioactivity and Demonstrates Antitumor Activity. *The Journal of Immunology* 163:250-258.
- ❖ Penichet, L.M. y Morrison, L.S. 2001. Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer. *Journal of Immunological Methods* 248:91-101.
- ❖ Penichet, L.M., Challita, P.M., Shin, S.U., Sampogna, L.S., Rosenblatt, D.J. y Morrison, L.S. 1999a. In Vivo Properties of Three Human HER2/*neu*-Expressing Murine Cell Lines in Immunocompetent Mice. *Laboratorie Animal Science* 49(2):179-188.
- ❖ Penichet, L.M., Kang, Y-S., Pardridge, M.W., Morrison, L.S. y Shin, S-U. 1999b. An Antibody-Avidin Fusion Protein Specific for the Transferrin Receptor Serves as a Delivery Vehicle for Effective Brain Targeting: Initial Applications in Anti-HIV Antisense Drug Delivery to the Brain. *The Journal of Immunology* 163:4421-4426.

- ❖ Perez-S.R., Berestin,L.G., Lautersztain, J., Al-Baker, S., Francis, K., Kiger,M.D., Raber,N.M. y khokhar, R.A.1990.Phase I Clinical and Pharmacological Study of Liposome-entrapped *cis*-Bis-neodecanoatrans-*R,R*-1.2-diaminocyclohexane Platinum (II).Cancer Research 50:4254-4259.
- ❖ Pergram, D.M., Lipton, A., Hayes, F.D., Weber, L.B., Baselga, M.J., Tripathy, D., Baly, D., Baughman, A.S., Twaddell, T., Glaspy, A.J. y Slamon, J.D.1998.Phase II Study of Receptor-Enhanced Chemosensitivity Using Recombinant Humanized Anti-p185<sup>HER2/neu</sup> Monoclonal Antibody Plus Cisplatin in Patients With HER2/*neu*-Overexpressing Metastatic Breast Cancer Refractory to Chemotherapy Treatment.Journal of Clinical Oncology 16(8):2659-2671.
- ❖ Pergram, D.M. y Slamon, J.D.1999.Combination Therapy With Trastuzumab (Herceptin) and Cisplatin for Chemoresistant Metastatic Breast Cancer: Evidence for Receptor-Enhanced Chemosensitivity.Seminars in Oncology 26(4) Suppl 12: 89-95.
- ❖ Polednak, P.A.1993.Estimating Cervical Cancer Incidence in the Hispanic Population of Connecticut by Use of Surnames. Cancer 71:3560-4
- ❖ Pontén,J., Adami,O.H., Bergstrom, R., Dilliner, J., Friberg, G.L., Gustafsson, L., Miller, B.A., Parkin, m.D., Sparén, P. y Trichopoulos, D.1995.Strategies for Global Control of Cervical Cancer.Int. J. Cancer 60:1-26.
- ❖ Rangel, C.R., Monroy, G.A., Ibarra, S.J., Herrera, V.L., Rocha, Z.L., Ramírez, G.J.L., Herrera, G.A., Medina, C.A., Rodríguez, M.H., Reyes, M. y Weiss-Steider, B. 1994. Evidence of the malignant origin of two cervical cell lines InBI and Calo. En: Proceedings of the International Cancer Congress. De. R.S. Rao, M.G., Deo y L.D. Sanghui y Mitra (Coordinador) New Delhi, India. pp. 2287-2291.
- ❖ Ravdin, M.P.1999.Should HER2 Status Be Routinely Measured for All Breast Cancer Patients?. Seminars in Oncology 26(4) Suppl 12:117-123.
- ❖ Regueiro, J.R. y López, L.C. 1996. Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune.Editorial Médica Panamericana.España. pp. 178.
- ❖ Rückert, R., Herz, U., Paus, R., Ungureanu, D., Pohl, T., Renz, H. y Bulfone-Paus, S.1998.IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a Th2 but not a Th1 immune response *in vivo*, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both.Eur. J. Immunol 28:3312-3320.
- ❖ Sabzevari,H., Gillies, D.S., Mueller, M.B., Pancook, D.J. y Reisfeld, A.R.1994.A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses

growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9626-9630.

- ❖ Schaafsma, R.M., Falkenburg, F.H.J., Landegent, E.J., Duinkerken, N., Osanto, S., Ralph, P., Kaushanky, K., Wagemaker, G., Damme, V.J., Willemze, R. y Fibbe, E.W. 1991. In Vivo Production of Interleukin-5, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Macrophage colony-stimulating Factor, and Interleukin-6 During Intravenous Administration of High-Dose Interleukin-2 in Cancer Patients. *Blood* 78 (8):1981-1987.
- ❖ Schneider, J., Rubio, M.P., Barbazan, J.M., Escudero, R.J.F., Seizinger, R.B. y Castresana, S.J. 1994. P-glycoprotein, HER-2/*neu*, and Mutant p53 Expression in Human Gynecologic Tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 86(11):850-855.
- ❖ Shack, S. 1999. Overview of the Trastuzumab (Herceptin) Anti-HER2 Monoclonal Antibody Clinical Program in HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *Seminars in Oncology* 26(4) Suppl. 12:71-77.
- ❖ Shargel, Y. y Yu, A.B.C. 1993. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 3ª edición. Ed. Appleton and Lange. USA. pp. 260.
- ❖ Skrepnik, N., Araya, C.J., Qian, Z., Xu, H., Hamide, J., Mera, R. Y Hunt, D.J. 1996. Effects of Anti-erbB-2 (HER-2/*neu*) Recombinant Oncotoxin AR209 on Human Non-Small Cell Lung Carcinoma Grown Orthotopically in Athymic Nude Mice. *Clinical Cancer Research* 2:1851-1857.
- ❖ Slamon, J.D., Godolphin, W., Jones, A.L., Holt, A.J., Wong, G.S., Keith, E.D., Levin, J.W., Stuart, G.S., Udove, J., Ullrich, A. y Press, F.M. 1989. Studies of the HER-2/*neu* Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science* 244:707-712.
- ❖ Sliwkowski, X.M., Lofgren, A.J., Lewis, D.G., Hotaling, E.T., Fendly, M.B. y Fox, A.J. 1999. Nonclinical Studies Addressing the Mechanism of Action of Trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26(4) Suppl. 12:60-70.
- ❖ Smith, A.K. 1988. Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. *Science* 240:1169-1176.
- ❖ Smith, A.K. 1993. Lowest Dose Interleukin-2 Immunotherapy. *Blood* 81(6):1414-1423.
- ❖ Susuki, M., Shinkai, M., Honda, H., Kamihira, M., Iijima, S. y Kobayashi, T. 2001. Construction of tumor-specific cells expressing a membrane-anchored single-chain Fv of anti-ErbB-2 antibody. *Biochimica et Biophysica Acta* 1525:191-198.



- ❖ Szoka, J.A., Fisher, S.G., Kefer, C., Fisher, R.I., Ellis, T.M. 1994. A phase I trial of continuous infusion interleukin-4 (IL-4) alone and following interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *Annals Oncol.* 5(5):447-452.
- ❖ Szoka, F. y Papahadjopoulos, D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large continuous infusion interleukin-4 (IL-4) alone and following interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *Annals Oncol.* 5(5):447-512.
- ❖ Takahashi, M. 1982. *Atlas Color Citología del Cáncer*. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 3-5, 32-39, 66-73 y 180-222.
- ❖ Talmadge, E.J., Phillips, H., Schindler, J. Tribble, H. y Pennington, R. 1987. Systematic Preclinical Study on the Therapeutic Properties of Recombinant Human Interleukin 2 for the Treatment of Metastatic Disease. *Cancer Research* 47:5725-5732.
- ❖ Taniguchi, T. y Minami, Y. 1993. The IL-2/IL-2 Receptor System: A Current Overview. *Cell* 73:5-8.
- ❖ Uno, S.S., Fukida, Y., Aoki, Y., Masuki, T. Y Hashimoto, T. 1995. Cytotoxicity of anti-c-erbB2 immunoliposomes containing doxorubicin on human cancer cells. *British Journal of Cancer* 72:663-668.
- ❖ Vagge, J., Barberá-Gillem, E., Abra, R., Huang, A., Working, P. 1994. Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer* 73 (5):1478-1488.
- ❖ Valle, M.A. 2001. Estudio de las proteínas activadas por la unión de IL-2 a su receptor en las líneas de carcinoma de cerviz CALO e INBL en comparación con linfocitos normales. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México. D.F.
- ❖ vanderSpek, C.J., Sutherland, A.J., Ratnarathorn, M., Howland, K., Ciardelli, L.T. y Murphy, R. 1996. DAB<sub>389</sub> Interleukin-2 Receptor Binding Domain Mutations. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (2):12145-1249.
- ❖ Vella, T.A., Dow, S., Potter, A.T., Kappler, J. y Marrack, P. 1998. Cytokine-induced survival of activated T cell *in vitro* and *in vivo*. *Immunology* 95(7):3810-3815.
- ❖ Villa, M. 1998. Liposomas como acarreadores de las citocinas IL-1 e IFN $\gamma$  dirigidos contra poblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratón. Tesis de Licenciatura FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- ❖ Vogel, H.G. y Vogel, W.H. 1997. *Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assays*. De Springer. Alemania. pp. 740.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- ❖ Vuist, W.M.J., Visseren, M.J.W., Otsen, M., Bos, K., Vyth-Dreese, F.A., Figdor, C.G., Melief, C.J.M., Hekman, A. 1993. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of human peripheral blood lymphocytes with interleukin-2 and interferon  $\alpha$ . *Cancer Immunol. Immunother.* 36:163-170.
- ❖ Warrens, A.N. y Lechler, R.I.1992. Key molecular events in the induction and expresión of the immune response. En: *The molecular biology of Immunosuppression*. Editor Angus W.Thomson. Editorial John Wiley and Sons. England. pp. 1-36.
- ❖ Weiner, M.L.1999.An Overview of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. *Seminars in Oncology* 26(4) Suppl 12:41-50.
- ❖ Weissman, D., Parker, D.J., Rothstein, T.L., Marshak-Rothstein, A. 1985. Methods for the production of xenogeneic monoclonal antibodies in murine ascities. *J.Immunol.* 135(2):1001-1003.
- ❖ Winter,G.1998.Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering.*FEBS Letters* 430:92-94.
- ❖ Xiang, R., Lode, N.H., Dolman, S.C., Dreier, T., Varki, M.N., Qian, X., Lo, M.K., Lan, Y., Super, M., Gillies, D.S. y Reisfeld, A.R.1997.Elimination of Established Murine Colon Carcinoma Metastases by Antibody-Interleukin 2 Fusion Protein Therapy.*Cancer Research* 57:4948-4955.
- ❖ Xiang, R., Lode, N.H., Dreier, T., Gillies, D.S. y Reisfeld, A.R. 1998. Induction of Persistent Tumor-protective Immunity in Mice Cured of Established Colon Carcinoma Metastases.*Cancer Research* 58:3918-3925.
- ❖ Xu, X., Clarke, P., Szalai, G., Shively, E.J., Williams, E.L., Shyr, Y. Shi, E. y Primus, J.F.2000.Targeting and Therapy of Carcinoembryonic Antigen-expressing Tumors in Transgenic Mice with an Antibody-Interleukin 2 Fusion Protein.*Cancer Research* 60:4472-4484.
- ❖ Yang, C.S., Grimm, A.E., Parkinson, R.D., Carinhas, J., Fry, D.K., Mendiguren-R., A., Licciardello, J., Owwn-Schaub, L., Hong, K.W. y Roth, A.J. 1991. Clinical and Immunomodulatory Effects of Combination Immunotherapy with Low-Dose Interleukin 2 and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase I Trial. *Cancer Research* 51:3669-3676
- ❖ Zeng, Z., Si, C.W., Yu, M. 1994. The effect of interleukin-2, interleukin-4 and tumor necrosis factor on LAK cells activity. *Chung Hua y Hsueh Tsa Chih.* 74(4):325-7, 256.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- ❖ Zhang, J.L., Waters, A.C., Poisson, R.L., Estis, F.L. y Crumpacker, S.C.1997. The Interleukin-2 Fusion Protein, DAB<sub>389</sub>L-2, Inhibits the Development of Infectious Virus in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.The Journal of Infectious Diseases 175:790-4.
- ❖ Zheng, X.X., Steele,W.A., Hancock,W.W., Stevens, C.A., Nickerson, W.P., Roy-Chaudhury, P., Tian, Y. y Strom, B.T.1997. A Noncytolytic IL-10/Fc Protein Prevents Diabetes, Blocks Autoimmunity, and Promotes Suppressor Phenomena in NOD Mice. The Journal of Immunology 158:4507-4513.
- ❖ Zuidam, N.J., Gouw, M., Barenholz, Y., Crommelin, D.1995.Physical (in)stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids.Biochimica et Biophysica Acta.1240:101-110.

TESIS CON  
FALLA DE URGEN

## APÉNDICES

### I. MEDIO ISCOVE (ISCOVE'S MODIFIED DULBECCO'S MEDIUM) 1X

COMPONENTES	Peso molecular	Conc. (mg/L)	Molaridad (mM)
<b>SALES INORGÁNICAS</b>			
Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	111	219.00	19.91
Cloruro de Potasio (KCl)	75	330.00	4.44
Nitrato de Potasio ( $\text{KNO}_3$ )	101	0.076	0.000752
Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	120	200.00	1.66
Cloruro de Sodio (NaCl)	58	4500.00	77.59
Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	84	3024.00	36.00
Fosfato de Sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	138	141.00	1.02
Selenita de Sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	263	0.017	0.0000646
<b>OTROS COMPONENTES</b>			
D-Glucosa	180	4500.00	25.00
Rojo Fenol	398	15.00	0.0346
HEPES	238	5958.00	25.00
Piruvato de Sodio	110	110.00	1.00
<b>AMINOÁCIDOS</b>			
L-Alanina	89	25.00	0.281
L-Aspargina (base libre)	150	28.40	0.215
L-Arginina-HCl	211	84.00	0.398
L-Ácido Aspártico	133	30.00	0.230
L-Cisteína	313	70.00	0.223
L-Ácido Glutámico	147	75.00	0.51
L-Alanil-L-Glutamina	203	812.00	4.00
Glicina	75	30.00	0.399
L-Histidina-HCl-H <sub>2</sub> O	210	42.00	0.20
L-Isoleucina	131	105.00	0.802
L-Leucina	131	105.00	0.802
L-Lisina-HCl	183	146.00	0.798
L-Metionina	149	30.00	0.201
L-Fenilalanina	165	66.00	0.400
L-Prolina	115	40.00	0.348
L-Serina	105	42.00	0.400
L-Treonina	119	95.00	0.078
L-Triptofano	204	16.00	0.078
L-Tirosina (sal disódica)	225	104.00	0.462
L-Valina	117	94.00	0.803
<b>VITAMINAS</b>			
Biotina	244	0.013	0.0000532
D-Ca pantotenato	477	4.00	0.0083
Cloruro de Colina	140	4.00	0.0285

TESIS COM  
 FALLA DE ORIGEN

Ácido Fólico	441	4.00	0.00906
i-Inositol	180	7.20	0.04
Niacinamida	122	4.00	0.0328
Piridoxal HCl	204	4.00	0.0196
Riboflavina	376	0.40	0.00106
Tiamina-HCl	337	4.00	0.0118
Vitamina B12	1355	0.013	0.00000959

## II. INACTIVACIÓN DE SUERO FETAL DE BOVINO (SFB)

La botella de Suero Fetal de Bovino (SFB) (Gibco, BRL, USA) congelado se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para que sea descongelado, posteriormente se pasa a un baño de agua a 56°C durante 30 minutos, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular como son las proteínas del complemento, así como inactivar otras para mayor eficiencia en la nutrición celular. Posteriormente se separa en alícuotas de 50 ml para su mejor manipulación, conservándose en refrigeración a 4°C.

## III. PREPARACIÓN DEL COLORANTE AZUL DE TRIPANO

Para pruebas de viabilidad y conteo celular se empleó una dilución del colorante azul de tripano (Sigma, Chem.USA) al 0.3% en PBS IX. Antes de su uso la dilución del colorante fue filtrada haciéndose pasar a través de un filtro Whatman núm. 2.

## IV. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Esta solución se ocupó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos, así como para: preparación de tratamientos, dilución de hidrocortisona y administración como vehículo a los ratones con tumor inducido. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN

Cloruro de magnesio (Sigma, Chem, USA)	0.10g
Cloruro de calcio (Sigma, Chem, USA)	0.10g
Cloruro de sodio (Sigma, Chem, USA)	8.00g
Cloruro de potasio (Sigma, Chem, USA)	0.20g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma, Chem, USA)	2.16g
Fosfato diácido de potasio (Sigma, Chem, USA)	0.20g

El cloruro de magnesio y cloruro 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 mezclan ambas soluciones. Se ajusta a un pH de 7.2 a 7.5 utilizando HCl 8N (Sigma, Chem, USA) y se afora a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con un diámetro de poro de 22  $\mu\text{m}$ , la solución se almacena a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

#### V. GLUTARALDEHÍDO AL 1.1%

Esta solución se ocupó en las placas de los ensayos *in vitro*. Para preparar 100 ml de glutaraldehído al 1.1%, se tomaron 2.2 ml de glutaraldehído (50% v/v Sigma, USA) y se le adicionaron 97.8 ml de agua destilada. Una vez preparado se guardo a 4°C hasta su utilización.

#### VI. SOLUCIÓN DE CRISTAL VIOLETA AL 0.1%

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración de 0.1%; se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye muy bien y por último se filtra utilizando papel Whatman núm. 2. Este reactivo se guarda a temperatura ambiente.

Hidróxido de sodio (Sigma, Chem, USA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma, Chem, USA)	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma, Chem, USA)	1.00 g

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VII. ÁCIDO ACÉTICO AL 10%

La solución de ácido acético que se utilizó fue en una concentración de 10%. Esta solución una vez preparada se guarda a temperatura ambiente.

Ácido acético (Sigma, Chem, USA)	10 ml
Agua MilliQ (MilliQ Academic, USA)	90 ml

## VIII. 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 los siguientes reactivos:

Tris (Sigma, Chem, USA)	3.04g
Cloruro de sodio (Sigma, Chem, USA)	8.00g
Cloruro de potasio (Sigma, Chem, USA)	0.40g
Ácido-Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA) (Sigma, Chem, USA)	0.40g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 10 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a 120 lb de presión durante 20 minutos.

## IX. SOLUCIÓN SALINA DE TRIPSINA

Al igual que el verseno, la solución de tripsina se emplea para despegar células adherentes y su fundamento es el mismo que el verseno. Su preparación consiste en pesar:

Tripsina (Sigma, Chem, USA)	1.25g
Acido-etilen-diamin-tetra-acético(EDTA) (Sigma, Chem, USA)	0.073g

Se disuelven los reactivos en 500 ml de PBS IX, se filtra con membrana de 0.22  $\mu$ m en un recipiente previamente estéril. Se hacen alícuotas de 50 ml y se guardan a 4°C hasta su utilización.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## X. SOLUCION BOUIN

Para preparar la solución Bouin, se necesitan:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	30 ml
Formol (Sigma, Chem.USA)	10 ml
Agua destilada o Milli Q	2 ml

Se mezclan y guardan en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

## XI. TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA CORTES HISTOLÓGICOS CON IDENTIFICACIÓN DE CITOQUERATINAS

Una vez obtenidos los cortes histológicos, se elimina la parafina de los mismos, colocando los portaobjetos en la estufa a 60°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los portaobjetos se enjuagan con Xilol (Sigma, Chem.USA), Etanol absoluto (Sigma, Chem.USA), Etanol al 95%, Etanol al 75% y agua destilada o agua MilliQ durante 5 minutos en cada uno, para eliminar el exceso de parafina e hidratar el tejido. Seguidamente los portaobjetos se mojan en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, Chem.USA) al 3% v/v durante 3 minutos, enseguida se enjuagan con PBS 1X por 2 minutos y finalmente se dejan secar, evitando tocar los cortes. Una vez "secos" los cortes, se les agrega 1 gota de Suero Normal Diluido del Sistema de Detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA) (**Apéndice XII**), por 5 minutos, después se les quita el exceso (sacudiendo) y se dejan secar los portaobjetos, para agregar finalmente 30µl de anticuerpo anticitoqueratinas Kg 8.13 (Dakoparts USA) en una dilución 1:5 en PBS.

Los portaobjetos se mantienen en una atmósfera de humedad a 4°C durante 3 horas. Al término de este tiempo, se enjuagan con PBS IX y se les adiciona el anticuerpo secundario biotinilado del sistema de detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA) (**Apéndice XIII**) durante 20 minutos, se enjuagan con PBS IX y se agrega el complejo Avidina-Biotina del sistema de detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA) (**Apéndice XIV**) por 20 minutos, se enjuagan nuevamente en PBS IX y se adiciona la solución Cromógena (**Apéndice XV**).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Finalmente, a los portaobjetos se les aplican 500  $\mu$ l de hematoxilina filtrada por 10 segundos y se enjuagan primeramente con agua corriente y después con agua a 40°C. Se pasan por un tren de Etanol al 75%, 96% y absoluto, concluyendo con Xilol 5 minutos en cada uno. Se dejan secar los portaobjetos a temperatura ambiente y se aplica resina en cantidad necesaria para cubrir el corte y colocar el cubreobjetos para su posterior análisis al microscopio y almacenamiento definitivo.

## **XII. DILUCIÓN DE SUERO NORMAL BLOQUEADOR**

Se diluyen 50 $\mu$ l de suero normal humano del Sistema de Detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA), en 10 ml de PBS.

## **XIII. DILUCIÓN DEL ANTICUERPO BIOTINILADO**

A 50  $\mu$ l del "stock" del anticuerpo secundario biotilado del sistema de detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA) se agregan 10 ml de PBS.

## **XIV. COMPLEJO ENZIMÁTICO (ABC)**

Se adicionan 100  $\mu$ l del reactivo de avidina a 10 ml de PBS a pH 7.6 y se agregan 100 $\mu$ l de la enzima biotilada del complejo Avidina-Biotina del sistema de detección ABC-Vectastain (Vector Laboratories, USA), se mezclan perfectamente.

## **XV. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CROMÓGENA**

En 5 ml de agua destilada o MilliQ a partir de un sistema de detección de sustrato peroxidasa (Peroxidase Substrate Kit DAB Vector Laboratories, USA) se agregan 100 $\mu$ l de solución "stock" de solución reguladora (Buffer pH 7.5), 200 $\mu$ l de solución "stock" Diaminobencidina (DAB) y 100 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, preparada al momento de su uso.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Esta solución se deja actuar en los cortes por 7 minutos como máximo y seguidamente se enjuagan con PBS.

## **XVI. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR EN EL DISEÑO COMPLETAMENTE ALEATORIO**

El Análisis de Varianza es una prueba estadística, la cual se define como una *técnica en la que la varianza total de un conjunto de datos se divide en varios componentes y cada uno de ellos se asocia a una fuente específica de variación, de manera que durante el análisis es posible encontrar la magnitud con la que contribuye cada una de esas fuentes en la variación total.* (Daniel, 1995)

Con la descripción anterior, se supone que existen  $k$  poblaciones distintas distribuidas normalmente, con medias poblacionales  $\mu_k$ , que poseen cada una la misma varianza  $\sigma^2$ . También supone que estas  $k$  poblaciones constituyen una gran población con media  $\mu$ , llamada Gran Media (lo que es la media poblacional).

La suposición o hipótesis nula ( $H_0$ ) a probar es que todas las varianzas de la población (las medias de tratamientos) son iguales. El modelo estadístico considera que la desviación de una observación con relación a la Gran Media se puede descomponer en la desviación entre los tratamientos (efectos del tratamiento) y dentro del tratamiento (error residual), correspondiendo para cada una de estas desviaciones un estimador insesgado o ponderado obtenido a partir de las sumas de sus cuadrados.

Las ecuaciones para estos estadígrafos se expresan estadísticamente en la Tabla de ANDEVA, la cual marca que si el estadígrafo  $F_{calculada}$  es mayor a  $F_{teórica}$  ( $F_{calculada} > F_{teórica}$ ), se tiene que efectuar un análisis de Diferencia Significativa Mínima de Fisher para determinar cuales son los pares de tratamientos entre los cuales hay diferencia significativa; pero si el estadígrafo marca que  $F_{calculada}$  es

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

menor a  $F_{teórica}$  ( $F_{calculada} < F_{teórica}$ ), el resultado que muestra, indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos que se evaluaron. (Moran, 2000)

**TABLA DE ANDEVA**

Fuente de Variación	Grados de libertad (g. l.)	Suma de cuadrados (S. C.)	Varianza o Cuadrados Medios (C. M.)	$F_{calculada}$	$F_{teórica}$
"entre" tratamientos	K-1	$\sum_{j=1}^K \frac{X_j^2}{n_j} - \frac{X^2}{N} = SC_{trat}$	$CM_{trat} = \frac{SC_{trat}}{K-1}$	$F_{calc} = \frac{CM_{tr}}{at}$	$F_{teórica} = F_{1-\alpha, K-1, N-K}$
"dentro" de tratamientos o error residual	N-K	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2 - \sum_{j=1}^K \frac{X_j^2}{n_j} = SC_{error}$	$CM_{error} = \frac{SC_{err}}{N-K}$	$CM_{error}$	
Total	N-1	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2 - \frac{X^2}{N} = SC_{total}$			

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN