



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

“DETERMINACIÓN DE LAS CITOCINAS  
IL-4, IL-10, IFN GAMMA Y TNF ALFA EN  
CÉLULAS DE BAZO DE RATÓN,  
ACTIVADAS CON IL-2 ENCAPSULADA”

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

PRESENTA:  
**ITZEL DEL RIO ORTIZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER



MÉXICO D.F.

OCTUBRE 2007



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.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

*FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES*

*ZARAGOZA*

El presente trabajo fue realizado en la UIDCC en el laboratorio de oncología celular L-4 PB, de la Unidad multidisciplinaria de investigación experimental UMIEZ en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza "UNAM". Dirigida por el Dr. Benny Weiss Steider y asesorada por la M. en C. Rosalva Rangel Corona. Con apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, convenios. IN216500 e IN210306.

MÉXICO D.F. OCTUBRE DEL 2007

## AGRADECIMIENTOS

A mi Institución por brindarme la educación y la preparación necesaria para terminar exitosamente mis estudios de licenciatura.

A mi director de tesis el Dr. Benny Weiss Steider y a mi asesora, la M. en C. Rosalva Rangel Corona por su gran apoyo y consejos, sin los cuales no hubiera sido posible este trabajo.

A mis sinodales: Jorge Flavio Mendoza Rincón, Cristina Alvarado Domínguez y Carlos Martínez Montoya por su asesoría en la elaboración de este escrito.

A todos los maestros y compañeros de la UMIEZ, por su apoyo y consejos dados, en especial a la Dra. Teresa Corona, Dr. Arturo Valle, Dra. Isabel Soto, Dra. Lourdes Mora y finalmente a Don José Chavarria.

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

A todos mis amigos que han estado conmigo desde el inicio de mi carrera: **Evelin, Reyna**, Christian, Julio, Antonio, David, Alberto, Jesús, Luis Alberto, Juan Carlos y a los amigos del laboratorio: Karla, Nancy, Griselda, Octavio y Alejandro, que gracias a su apoyo, amistad y consejos contribuyeron de alguna manera a culminar este proyecto.

A mi esposo José Luis Vera Romero, por que sin su apoyo, amor y consejos, no hubiera llegado a finalizar esta etapa de mi vida.

A mi familia y seres queridos por brindarme su apoyo, comprensión y cariño; en especial a mi Madre por darme el ejemplo de la superación y ser el gran soporte en mi vida.

Gracias por creer en mí.

## INDICE

I.	Lista de Figuras y Tablas.....	3
II.	Lista de reactivos y soluciones .....	4
III.	Abreviaturas .....	5
IV.	Resumen.....	6
1.	Introducción.....	7
2.	Marco Teórico	
2.1	<i>El Cáncer</i> .....	8
2.2	Cáncer Cérvico Uterino (CaCU).....	9
2.2 .1	Clasificaciones Generales.....	11
2.2.2	Clasificación de la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).....	11
2.3	<i>Sistema Inmunológico</i> .....	12
2.3.1	Linfocitos.....	14
2.3.2	Órganos Linfoides.....	16
2.4	<i>Citocinas</i> .....	16
2.4.1	Clasificación de Citocinas.....	18
2.4.2	Interleucina 2 (IL-2).....	22
2.4.3	La IL-2 en la Inmunoterapia.....	23
2.5	<i>Liposomas</i> .....	25
3.	Extracción de RNAm.....	27
4.	Retrotranscripción en cadena de la Polímerasa RT-PCR	
4.1	Retrotranscripción RT.....	27
4.2	Reacción en cadena de la Polímerasa PCR.....	28

4.3	Electroforesis en agarosa.....	29
<b>5.</b>	<b>Planteamiento del Problema.....</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>31</b>
<b>7.</b>	<b>Objetivos</b>	
7.1	Objetivo General.....	32
7.2	Objetivos Particulares.....	32
<b>8.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	
8.1	Material Biológico.....	33
8.2	Reactivos y Soluciones.....	34
	<b>Método Experimental</b>	
8.3	Proliferación de la línea celular INBL.....	36
8.4	Condiciones de los diferentes grupos de trabajo.....	36
8.5	Inmunodepresión, inoculación e inducción de tumores de CaCU en ratones CBA...36	
8.6	Sacrificio de ratones.....	37
8.7	Extracción de RNAm.....	37
8.8	Retrotranscripción de RNAm (RT).....	38
8.9	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	38
8.10	Electroforesis de los productos de PCR.....	39
<b>9.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>10.</b>	<b>Discusión de Resultados.....</b>	<b>48</b>
<b>11.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>51</b>
<b>12.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>52</b>
<b>12.</b>	<b>Anexo (preparación de soluciones).....</b>	<b>53</b>
<b>13.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

### **FIGURAS**

*Pg*

Figura 1. Cambios morfológicos en las células de la membrana basal	12
Figura 2. Acción del sistema inmune al detectar un antígeno tumoral	13
Figura 3. Tipos de linfocitos	14
Figura 4. Mecanismos de activación de los receptores de las citocinas (Vía de señalización JAK-STAT e IL2)	18
Figura 5. Interleucina 4 (IL-4)	19
Figura 6. Interleucina 10 (IL-10)	20
Figura 7. TNF alfa (TNF- $\alpha$ )	21
Figura 8. IFN gamma (IFN- $\gamma$ )	22
Figura 9. Interleucina 2 (IL-2)	23
Figura 10. Composición de la bicapa lipídica y formación de la vesícula	26
Figura 11. Retrotranscripción del RNAm	27
Figura 12. Etapas de la PCR	29
Figura 13. Electroforesis del amplificado de IL-10.	42
Figura 14. Electroforesis del amplificado de TNF- $\alpha$	43
Figura 15. Electroforesis del amplificado de IL-4	44
Figura 16. Electroforesis del amplificado de IFN- $\gamma$	45
Figura 17. Electroforesis del oligo $\beta$ - actina	46

### **TABLAS**

Tabla 1. Correlación de las nomenclaturas para las lesiones premalignas y cáncer <i>in situ</i> del cérvix	11
Tabla 2. Secuencias y tamaños de los productos de los oligonucléotidos de las diferentes citocinas	34
Tabla 3. Condiciones de los grupos de trabajo	36
Tabla 4. Condiciones de una reacción de Retrotranscripción	38
Tabla 5. Condiciones de una reacción de Reacción en cadena de la polimerasa	38
Tabla 6. Cuantificación y transformación a $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de las muestras de RNA	41
Tabla 7. Niveles de expresión de las citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ y $\beta$ -actina	47

## LISTA DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

- ❖ RPMI-1640/10% SFB
- ❖ Solución Fisiológica de Verseno
- ❖ Hidrocortisona
- ❖ H<sub>2</sub>O DEPC
- ❖ H<sub>2</sub>O bidestilada
- ❖ H<sub>2</sub>O inyectable
- ❖ H<sub>2</sub>O libre de RNAsas
- ❖ Alcohol isoamílico
- ❖ Alcohol Isopropílico
- ❖ Trizol
- ❖ Cloroformo
- ❖ Etanol 70%
- ❖ PBS
- ❖ Gel de Agarosa 1.5%
- ❖ Buffer de carga 6X
- ❖ Marcador de peso molecular 34-501 Pares de bases (PB)
- ❖ Marcador de peso molecular de 100-1500 Pares de bases (PB)
- ❖ Enzima MMLZ RT
- ❖ Enzima Taq Polímerasa
- ❖ DNTP'S (5 y 10 mM)
- ❖ Amortiguador 5X y 10X
- ❖ DTT
- ❖ Oligo DT
- ❖ Primers (IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -actina)
- ❖ Bromuro de etidio
- ❖ TBE 10X, 1X y 0.5X



## ABREVIATURAS

APC	Arterial peniciladas
CaCU	Cáncer cervicouterino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
DNTP'S	Desoxirribonucleótidos de trifosfato
dTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen Diamin Tetracetato
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
LTc/ Tc	Linfocitos citotóxicos ó citolíticos
LTh/ Th	Linfocitos auxiliares
MCH-I	Complejo de histocompatibilidad
MMLV RT	Retrotranscriptasa del virus de leucemia murina.
NIC	Neoplasia intraepitelial
NK	Células acecinas naturales (del ingles <i>Natural Killer</i> )
PBS	Solución Amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polímerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RPMI-1640	Medio de cultivo celular
RT	Retrotranscripción
Rx	Reacción
SFB	Suero Fetal Bovino
TBE	Amortiguador Tris ácido Borico-EDTA
TH0	Subpoblaciones de linfocitos auxiliares Th <sub>0</sub>
TH1	Subpoblaciones de linfocitos auxiliares Th <sub>2</sub>
TH2	Subpoblaciones de linfocitos auxiliares Th <sub>1</sub>
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
VPH	Virus del papiloma humano
$\alpha$ CD4	Anticuerpo-CD4
$\alpha$ CD8	Anticuerpo-CD8

## RESUMEN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es el segundo cáncer más frecuente en el mundo. En México es el primer lugar entre los tumores malignos en la población femenina. Actualmente diferentes grupos de investigación trabajan en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas; entre ellas se encuentra el uso de linfocitos T activados que reconocen péptidos específicos de células tumorales. La activación de los linfocitos T es mediada por diversas citocinas como IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Previamente nuestro grupo de trabajo determinó *in vivo* una disminución de masas tumorales inducidas en ratones singénicos de la cepa CBA, cuando éstas son tratadas con IL-2 encapsulada, la cual se sabe regula la expresión de citocinas relacionadas con la activación de los linfocitos citotóxicos. Por esta razón en el presente trabajo se evaluaron los cambios en la expresión de RNAm para IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en células de bazo de ratón que recibieron tratamiento de IL-2 encapsulada. Para ello, utilizamos el RNA mensajero total de células de bazo de los ratones, posteriormente se aplicó la técnica RT-PCR para lo cual, se usó la enzima transcriptasa reversa para obtener a partir del RNAm el DNA complementario para cada una de las citocinas arriba mencionadas y así amplificarlas. Confirmando que el uso de IL-2 encapsulada disminuye las masas tumorales, asimismo se aportó información relevante acerca de los niveles de expresión del RNAm de estas citocinas. Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que la IL-10 es la que muestra los mayores niveles de expresión a diferencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Cabe destacar que no se detectó presencia de IL-4. Estos datos sugieren que IL-2 encapsulada puede estar participando en la regulación de la respuesta antitumoral de los ratones induciendo la expresión del RNAm de citocinas secretadas por los linfocitos T auxiliares (Th) del subgrupo Th<sub>1</sub>.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer se caracteriza por el crecimiento no controlado de la progenie de una célula transformada. La manera ideal para combatirlo consiste en inducir una respuesta inmune específica contra las células tumorales. Aunque la función del sistema inmunológico es la defensa del organismo frente a una infección, también puede eliminar algunos tipos de tumores. Las principales terapias inmunológicas contra el cáncer se basan en los mecanismos efectores básicos de la respuesta inmunológica adaptativa, ya sea con anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos específicos de los tumores ó por medio de linfocitos T citotóxicos, los cuales al ser activados por citocinas, reconocen péptidos específicos de células tumorales.

A lo largo de las dos últimas décadas se han administrado tratamientos con diversas proteínas y citocinas que tienen como objetivo aumentar la respuesta inmunológica del paciente, entre ellas podemos mencionar a los interferones e Interleucinas. Al respecto nuestro grupo de trabajo previamente, determinó *in vivo* una disminución de masas tumorales inducidas en ratones singénicos cuando éstos son tratados con IL-2 encapsulada (Bañuelos, 2000), la cual se sabe regula la expresión de citocinas como IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  relacionadas con la activación de los linfocitos, algunas de éstas inducen la proliferación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos. Estas poblaciones de linfocitos eliminan células tumorales por la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y también regulan negativamente la respuesta inmunológica por medio de IL-10 e IL-4. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de estas citocinas en células de bazo de ratones tratados con IL-2 encapsulada como tratamiento. Para ello se utilizó la técnica de RT-PCR en la cual se aisló RNAm de células de bazo que fue retrotranscrito usando la enzima transcriptasa reversa obteniendo como productos el DNA complementario (cDNA) que se utilizó para llevar a cabo la amplificación por la técnica Reacción en Cadena de la Polímerasa (PCR), que posteriormente fueron sujetas a electroforesis de agarosa y así obtuvimos los productos de cada una de las citocinas arriba mencionadas.

## MARCO TEÓRICO

### *El cáncer*

Casi todo el mundo ha sufrido la amarga experiencia de haber tenido un familiar ó un amigo que ha enfermado ó fallecido de cáncer, en los países en vías de desarrollo las principales causas de muerte son las enfermedades infecciosas, en los países desarrollados, las enfermedades degenerativas y el cáncer son las causas mas frecuentes de mortalidad (Regueiro y López, 1996).

El cáncer es el proceso por el cual las células normales se transforman en células malignas por la adquisición de mutaciones, las cuales acarrear como consecuencia el daño del genoma. Este daño puede ser el resultado de un proceso endógeno ó por ataques exógenos (Weiss y Valle, 2003).

Esta enfermedad se caracteriza por la proliferación descontrolada de las células en las que han ocurrido alteraciones en los genes relacionados con el ciclo celular, donde se puede dar lugar a tres tipos de cambios celulares: inmortalización, transformación y metástasis; el cáncer se ha convertido en una de las tres primeras causas de muerte en la población mundial. En nuestro país la muerte por enfermedades neoplásicas se encuentra después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Es conocido que cuando el cáncer se detecta en sus etapas iniciales los esquemas terapéuticos existentes son altamente eficientes, pero por desgracia, esto no es así para las etapas invasivas, por lo que es claro que la adquisición de un fenotipo invasivo que permite la diseminación de células cancerosas representa hoy en día una de las principales causas de mortandad en los pacientes oncológicos (Tapia 1999., Frías y Zentella 2005).

Un tumor maligno es capaz de invadir los tejidos adyacentes y diseminarse por todo el organismo a través del sistema linfático ó vascular mediante un proceso denominado metástasis; esta capacidad del tumor es el principal problema para su erradicación además de que actualmente se asocia al 90% de las muertes por cáncer. Según el Registro Histológico de Neoplasias en 1997 las cinco neoplasias más frecuentes estuvieron asociados a cáncer de cervix (22.9%), de glándula mamaria (10.3%), de próstata (6%), de ganglios linfáticos (4.7%) y de estómago (4.2%) (Frías y Zentella 2005).

Para llevar a cabo el proceso metastásico, las células de un tumor sólido modifican tanto las interacciones célula-célula, como célula-sustrato, todas estas modificaciones pueden exhibir cambios de todo tipo incluyendo los de variable ó de magnitud. En conjunto las alteraciones que pueden presentar las células cancerosas incluyen modificaciones en su forma y tamaño, cambios en su apariencia (aparición de más bastiones menos diferenciados, frecuentemente con nucleolos), alteraciones en la distribución de la cromatina nuclear, en la forma y número de cromosomas (Alberts et al., 2002).

Efectivamente, todos estos cambios tienen una causa genética, es decir aparecen cuando ocurren alteraciones en los genes que no son corregidas por los mecanismos de reparación del material genético. Para que la célula mantenga sus características normales los genes deben funcionar de manera ordenada y regulada, si alguno de estos genes se altera en su estructura ó función ocurre su pronta detección y reparación, usualmente a través de proteínas codificadas por otros genes; así la célula se mantiene en orden. Algunas veces estas alteraciones en los genes activos no son detectadas y los genes afectados dejan de funcionar ó funcionan de una manera anormal, produciendo cantidades anormales de proteínas, ó produciendo proteínas anormales sin actividad fisiológica definida. Este funcionamiento anormal de los genes caracteriza a las células cancerosas. Una vez que la célula cancerosa ha perdido sus mecanismos de regulación la célula prolifera generando una clona de células anormales; estas células continúan reproduciéndose llegando a formar un tumor (Rojas, 2001).

### ***Carcinoma Cérvico-Uterino (CaCU)***

El CaCU es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que se suceden en etapas de displasia leve, moderada y severa, que evolucionan a cáncer *in situ*, en grado variable cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial y luego a Cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal (Zaino et al., 1992).

Es el segundo cáncer más frecuente en el mundo representando cerca del 10% de todos los cánceres en la mujer. Según la Organización Mundial de la Salud en el 2002 se han estimado alrededor de 493,000 nuevos casos de cáncer invasor de cuello uterino al año, siendo cerca de los 83% diagnosticados en los países en vías de desarrollo. En México es un grave problema de salud pública, pues en la última

década ha sido el cáncer más frecuente en la población femenina (Shiffman et al., 1995., Guzman et al., 1998., Nazzal et al., 2006).

En 2001 el CaCU ocupó en México el primer lugar entre los tumores malignos en la población femenina, con un total de 4,512 defunciones y una tasa de mortalidad de 18.3% por cada 100,000 mujeres de 25 y más años. Por otra parte 24.4% del total de casos nuevos de neoplasias malignas registradas durante ese año, correspondieron a CaCU. De esa cifra 47% de los casos se presentaron en mujeres de 35 a 54 años de edad (Tirado et al., 2005).

Los estudios sobre la epidemiología del CaCU han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual y diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo. Los de mayor asociación son inicio temprano de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, infecciones virales y bacterianas, hábitos reproductivos, uso de anticonceptivos orales, hábitos dietéticos y tabaquismo, entre otros (Carrillo et al., 2004).

También se ha mostrado una fuerte asociación entre los virus del papiloma humano (VPH) y neoplasias cervicales, independientemente de los factores de riesgo en diversos países. Hoy en día es claro que los subtipos de alto riesgo del virus papiloma son los responsables de las lesiones precancerosas y del CaCU. En años recientes se ha notificado la existencia de más de 100 tipos de VPH, siendo las variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 las consideradas como de alto riesgo por encontrarse asociadas al CaCU en más de 95% de los casos. Por otra parte se informa que otros tipos de VPH, como el 6, 11, 42, 43 y 44 muestran una débil asociación a éste cáncer, denominándolos de bajo riesgo (Tirado et al., 2005).

En México se ha encontrado que alrededor de 99.7% de cáncer de cuello uterino puede atribuirse a ciertos tipos de VPH, el 16 presenta la mayor porción (50%), seguido por el VPH 18 (12%), el VPH 45 (8%) y el VPH 31 (5%). No obstante, el VPH no constituye una causa suficiente de esta enfermedad; son necesarios ciertos cofactores para que un porcentaje de infecciones persistentes por VPH logre en algún momento progresar y dar lugar al cáncer (Alonso et al., 2000., Nazzal et al., 2006).

## Clasificaciones Generales de CaCU

Las alteraciones del epitelio metaplásico anormal han sido motivo de numerosas clasificaciones y terminologías (Tabla 1). Una primera nomenclatura se realizó en 1930 es la que se incluyen a las displasias leve, moderada ó severa, refiriéndose a lesiones precancerosas que culminan con el carcinoma *in situ*. En 1968 se acuñó el concepto de Neoplasia Cervical Intraepitelial (NIC) con diferentes grados: NIC I, NIC II y NIC III ó carcinoma *in situ*. Una tercera clasificación es la desarrollada en 1988 y se conoce como el Sistema Bethesda: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado en donde se combinan las alteraciones celulares por el virus del papiloma humano (coilocitosis) y NIC I, llamándolo “LGSIL” (*Low grade squamous intraepithelial lesion*) y la combinación de NIC II y NIC III, lo enuncia como “HGSIL” (*High grade squamous intraepithelial lesion*). En México, la clasificación que más se utiliza es el término displasias y NIC (Parking y Robert., 1993., Dzul et al., 2004).

NOMENCLATURAS DEL CANCER CERVICOUTERINO					
Sistema Bethesda	Normal	Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado lgsil		Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado hgsil	
Richart	Normal	Coilocitosis	NIC I	NIC II	NIC III
Reagan	Normal	Displasia leve		Displasia moderada	Displasia severa Carcinoma <i>in situ</i>

Tabla 1: Correlación de las nomenclaturas para las lesiones premalignas y cáncer *in situ* del cérvix

### Clasificación de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de Richart

1. NIC I. Sólo las células de la capa profunda son inmaduras, las anomalías nucleares son moderadas, los núcleos son densos a menudo retraídos, las células binucleadas son numerosas.
2. NIC II. Las tres cuartas partes profundas del epitelio tiene células inmaduras, las anomalías nucleares son mas acentuadas, los núcleos son más voluminosos e hipercromáticos. Sólo las capas superficiales experimentan un esbozo de maduración y en ellas se aprecian células aplanadas.

3. NIC III. Todo el grosor del epitelio conserva células inmaduras, las anomalías nucleares son muy importantes, la mitosis es muy numerosa, anormal y se localizan en todos los niveles (Figura 1) (Ramírez, 1997).

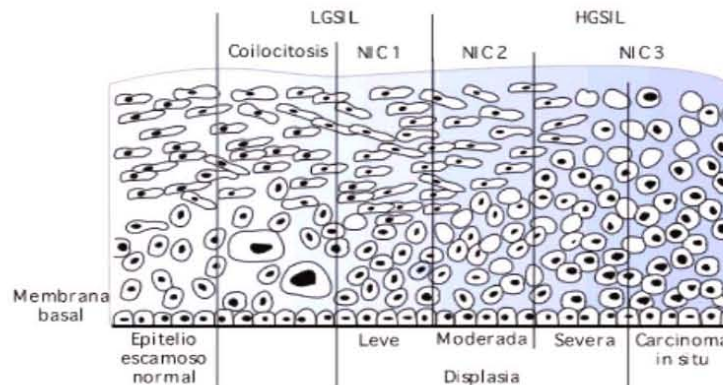


Figura 1. Cambios morfológicos en las células de la membrana basal (NIC).

### *Sistema inmunológico*

El sistema inmunológico surgió durante la evolución para combatir las infecciones causadas por virus, bacterias, hongos, etc. Estos patógenos pueden ser responsables de infecciones intracelulares ó extracelulares, para los cuales la respuesta inmunológica debe ser diferente. De hecho, el sistema inmunológico ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo. Para lograr la eliminación del cualquier patógeno que haya establecido una infección, lo primero que debe hacer el sistema inmunológico es reconocerlo como agente extraño y así desarrollar una respuesta adecuada para eliminarlo. Dicho sistema actúa mediante dos tipos de mecanismos que se diferencian en las estructuras de reconocimiento de los patógenos, pues la fase efectora que produce su destrucción es esencialmente similar (Regueiro y López 2002).

Estos mecanismos tienen como una de sus funciones principales la inmunovigilancia tumoral y son: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata se considera como la primera barrera contra las células tumorales, las cuales son reconocidas por un proceso independiente de antígeno. Este mecanismo es mediado por un patrón de receptores y de moléculas de superficie celular expresados en la célula tumoral.



Entre las principales células que reconocen a la célula tumoral se encuentran las células NK (*Natural Killer*), las cuales reconocen la baja ó nula expresión de moléculas MHC I sobre la célula tumoral, así como proteínas relacionadas con estrés, también participan cooperativamente células llamadas linfocitos T y moléculas de membrana para provocar lisis sobre células blanco (Bermúdez et al., 2005).

En relación con la respuesta inmune adaptativa, ésta requiere del reconocimiento de antígenos tumorales para reconocer y eliminar la célula tumoral por medio de las células efectoras de la respuesta inmunológica (Figura 2). Se ha demostrado que la respuesta inmune mediada por células es la más importante para eliminar las células neoplásicas. Esta respuesta es dependiente de la activación de los linfocitos T y de las células presentadoras de antígenos profesionales (APC). La activación de los linfocitos T, requiere que las células dendríticas capturen y procesen el detritus celular tumoral, migren a los nódulos linfáticos regionales para presentar los antígenos tumorales a los linfocitos T CD8+ mediante las moléculas del MHC-I. En este proceso se activan tanto los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra péptidos tumorales, los cuales son reconocidos a través de las moléculas del MHC. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos son los responsable de lisar y eliminar a las células tumorales, por el reconocimiento de péptidos tumorales asociados a las moléculas del MHC-I expresado en la superficie de la célula tumoral. Por otro lado los linfocitos T CD4+ son los encargados de regular la respuesta inmune antitumoral, ya que están involucrados en la inducción y activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos a través de la producción de citocinas. Además, los linfocitos T CD4+ son capaces de interactuar con las células APCs en el proceso de presentación de antígenos tumorales (priming) y activar a los precursores de linfocitos T CD8+ (Bermúdez et al., 2005).

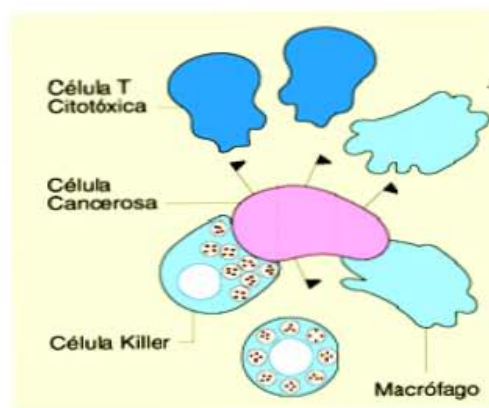


Figura 2. Acción del sistema inmune al detectar un antígeno tumoral (inmunidad adaptativa).

## ***Linfocitos***

Las células linfoides son de gran importancia para el sistema inmunológico, ya que son las encargadas de la protección del organismo. Los linfocitos son las únicas células capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes antígenos y por tanto son responsables de las dos características que definen la respuesta inmunitaria adaptativa, especificidad y memoria. Los linfocitos están formados por distintos subtipos que difieren en sus funciones y productos protéicos, aunque morfológicamente son indistinguibles (Abbas y Lichtman, 2004).

Los linfocitos B reconocen antígenos de los patógenos extracelulares, ó sus productos solubles en su conformación nativa por medio de su receptor BCR. Cada tipo de célula B hace un anticuerpo específico, el cual reconoce un antígeno específico (Regueiro y Lopez 2002).

Los linfocitos T son mediadores de la inmunidad celular, reciben este nombre debido a que sus precursores proceden de la médula ósea pero migran y maduran en el timo. Existen dos subtipos de linfocitos T (Figura 3): Cooperadores ó auxiliares (Th, CD4+), son los que interaccionan con otros tipos celulares (linfocitos T, B, Macrófagos) ayudando a su división y a desarrollar sus funciones inmunológicas, como sintetizar anticuerpos, expandirse, destruir patógenos etc, y los citotóxicos ó citolíticos (Tc, CD8+) que interaccionan con las células diana (infectadas por virus ó células tumorales) y liberan unas proteínas denominadas perforinas que las lisan en pocos minutos y en otras ocasiones es por una lisis programada (apoptosis) por la interacción de cierta molécula de la membrana de linfocitos T, la CD95L (Regueiro y Lopez 2002).

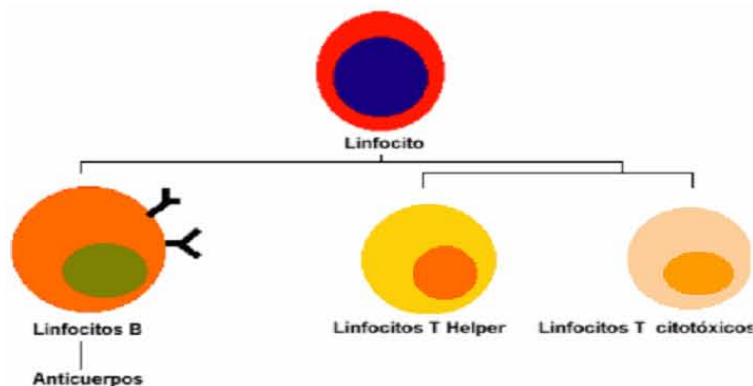


Figura 3. Tipos de linfocitos

La presentación de antígenos endógenos sintetizados dentro de la célula y unidos a MHC-I activan los linfocitos Tc generando una respuesta citotóxica que conduce a la muerte de la célula blanco; en tanto la presentación de antígenos endógenos activa los linfocitos Th para la síntesis de citocinas. De acuerdo al perfil de citocinas que producen las células activadas se han determinado tres subpoblaciones de linfocitos Th, denominados Th<sub>0</sub>, Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>. Los Th<sub>0</sub> tienen la capacidad de producir todas las citocinas específicas de las células T, mientras que los linfocitos Th<sub>1</sub> producen IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF - $\alpha$ , citocinas que tienen como principal función la activación de otros tipos celulares como los linfocitos Tc, macrófagos, células NK, etc; esto da como resultado la activación preferencial de la respuesta inmune celular. Los linfocitos Th<sub>2</sub> en cambio, producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 que actúan particularmente sobre los linfocitos B, generando una respuesta de tipo humoral con síntesis de anticuerpos. El TGF- $\beta$  ha sido recientemente incluido dentro del grupo de las citocinas pertenecientes a los linfocitos Th<sub>2</sub> (Rodríguez et al., 2006).

Los linfocitos NK (*Natural Killer*) son una tercera población de linfocitos cuya función principal es la inmunidad innata (Abbas y Lichtman 2004). Estas células presentan el 5% de los linfocitos, son capaces de mediar su acción, sin activación previa ni restricción aparente del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) de forma diferente a como lo hacen los linfocitos T y B, es por esa razón del nombre de asesinas naturales (Arango, et al., 1999). Cuando las células NK se activan son capaces de producir una variedad de citocinas y por lo tanto pueden ejercer funciones de activación de otros linajes celulares importantes en la erradicación de tumores ó agentes infecciosos. Las citocinas producidas son: IFN gamma, TNF alfa e IL3. Además las NK también pueden responder a citocinas ya que expresan en su membrana algunos receptores especialmente para IL-2, IL-12 y TNF- alfa. (Regueiro y Lopez 2002). No sólo las células NK son capaces de producir citocinas; se ha encontrado que en diversos tumores los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos se encuentran alterados en grado diferente y expresan también algunas citocinas, quimiocinas, ó factores de crecimiento, que inducen finalmente la respuesta inmune en contra del tumor inhibiendo la respuesta de los linfocitos Tc; debido a ello las células tumorales difícilmente provocan respuesta antitumoral eficiente (Valdespino y Rocha, 2003).

## *Órganos Linfoides*

Para aumentar la posibilidad de que los linfocitos encuentren a su antígeno específico, pasan su vida recirculando por los diferentes órganos linfoides secundarios (Bazo, Ganglio linfático y el tejido linfoide asociado a mucosas o MALT). Cuando se produce una infección que no puede ser eliminada por los mecanismos innatos y es necesaria una respuesta adaptativa, el antígeno es transportado al bazo por vía sanguínea, o a los ganglios por vía linfática y es allí donde se produce el reconocimiento del antígeno por los linfocitos que están recirculando. La organización de dichos órganos permite las interacciones necesarias entre las distintas células del sistema inmunológico para que se pueda generar una respuesta adaptativa. En los órganos linfoides secundarios, en especial el bazo, se produce la activación y proliferación de los linfocitos. Una vez diferenciados los tipos de linfocitos su función efectora es mediada por interacciones celulares así como por mediadores solubles; citocinas secretadas por dichas células (Regueiro y Lopez 2002).

*El bazo:* Es el encargado de drenar los antígenos de la sangre y en él se distinguen dos regiones: la pulpa roja y la blanca, la primera participa en la destrucción de eritrocitos deteriorados y en la mielopoyesis de eritrocitos, granulocitos y plaquetas y la segunda es el lugar principal donde tienen lugar las respuestas inmunitarias a los antígenos que transportan la sangre (Abbas y Lichtman 2004). Las principales funciones del bazo en el sistema inmunológico son: 1) Presentación de antígenos por las APC (antígenos presentadoras) e iniciación de la respuesta inmune, 2) Activación y proliferación de los linfocitos T y B, 3) Producción de anticuerpos contra antígenos presentes en la sangre circundante, 4) Eliminación de antígenos macromoleculares de la sangre y 5) Proliferación de los linfocitos y diferenciación de los linfocitos T y plasmocitos, así como secreción de anticuerpos (Michael, 2005).

## *Citocinas*

Muchos de los eventos de la respuesta inmune están regulados por moléculas solubles llamadas citocinas. Este término se ocupó por primera vez en 1974 para describir cualquier sustancia soluble producida por células, que ejercía efectos específicos en sus células blanco, las cuales son secretadas por una gran variedad de tipos celulares, pero principalmente las producen los linfocitos T. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, 15–30 KDa, constituidas por 120–180 aminoácidos, que pueden secretarse ó permanecer unidas a la membrana celular. Para realizar su función biológica se requieren en concentraciones de nanogramos a picogramos. Las citocinas actúan de manera autócrina al modular la actividad celular, ó de manera parácrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares. Además, las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimiotaxis celular y en la activación de células de la respuesta inmune. Las citocinas se secretan en respuesta a una amplia variedad de estímulos como el estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos e infecciones ó inflamación. En este contexto, las citocinas estimulan la respuesta del huésped al controlar el estrés y la homeostasis celular (Meager et al., 1991., Bermúdez et al., 2005).

Hoy día se conoce que la misma citocina puede estar producida por distintas células e incluso que un mismo tipo de citocina pueda realizar funciones diversas. De ahí que su clasificación en virtud de la célula origen ó de su función ha dejado de utilizarse para denominarlas con el término genérico de citocinas, que engloba a los productos secretados por las diferentes células y a todas sus funciones. Las citocinas también son mensajeros químicos u hormonas extremadamente potentes a pesar de que actúan a concentraciones muy bajas son muy específicas, actuando sobre la célula blanco gracias a su afinidad por los receptores de membrana (Aguzzi, 2005).

Los receptores de la citocinas son glicoproteínas de membrana formados por varias subunidades y se clasifican en receptores de clase I y II que emplean a la vía JAK–STAT, cuya misión es la de transmitir la señal al interior de la célula, generándose un conjunto de reacciones en cascada en las que intervienen un gran número de proteínas. Las cinasas de la familia JAK, las cuales reclutan y activan factores de transcripción de la familia STAT, como consecuencia de estas reacciones en cadena, se inducen varios genes que son los que median las actividades biológicas de las citocinas. Además de los receptores de membrana en

el suero se han detectado receptores solubles para las distintas citocinas semejantes a los de membrana. Estos receptores se encuentran en grandes cantidades y probablemente tienen como misión regular la producción de las citocinas actuando como antagonistas de los receptores de membrana (Figura 4) (Lodige, 2005., Valle, 2005).

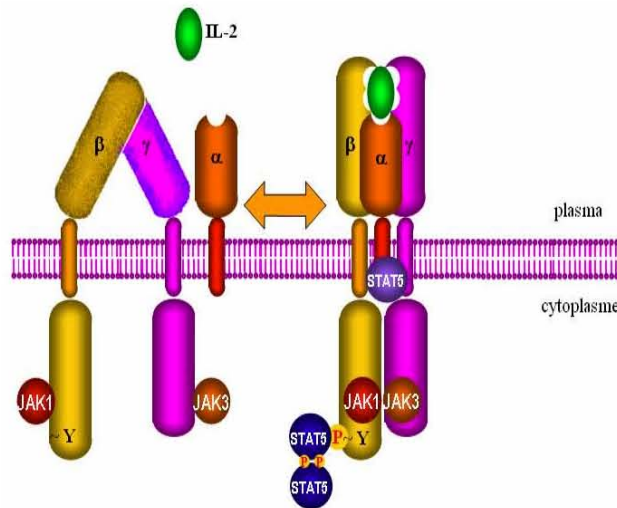


Figura 4. Mecanismos de activación de los receptores de las citocinas (Vía de señalización JAK-STAT e IL2)

### *Clasificación de Citocinas*

Es difícil establecer una clasificación funcional de las citocinas debido a su alto grado de pleiotropismo. No obstante, para facilitar su estudio las describimos englobadas según su función principal: Citocinas proinflamatorias e inmunosupresoras.

En relación con la respuesta inflamatoria algunas citocinas favorecen el desarrollo de la misma (citocinas proinflamatorias), mientras que otras ejercen un efecto supresor de la inflamación (citocinas inmunosupresoras).

Las citocinas con actividad antiinflamatoria e inmunosupresora inhiben el crecimiento celular ó suprimen la secreción de otras citocinas. Entre ellas se encuentran la IL-4 e IL-10, que activan las acciones de los linfocitos B a la vez que inhiben las respuestas inflamatorias (Aguzzi, 2005).

**IL4:** Es un inmunomodulador de citocinas producida por linfocitos Th<sub>2</sub>, mastocitos, basófilos, células del estroma de la médula ósea y posiblemente por determinadas subpoblaciones de células NK. Es una citocina muy pleiotrópica, ya que ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th<sub>2</sub>, inhibiendo la generación de células Th<sub>1</sub>. Actúa como antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF-alfa, IL-6 y la proteína inflamatoria del macrófago y es un potente inhibidor de la apoptosis (Hou, 1994).



Figura 5. Interleucina 4

**IL-10:** Es producida por linfocitos del tipo Th<sub>2</sub>, monocitos, macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros tipos celulares. Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, entre las que podemos citar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12 y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares. La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras.

En el marco de la progresión del cáncer la IL-10 inhibe la respuesta antitumoral, debido a que impide la presentación de antígenos de las células que promueven la activación y proliferación de los Tc, no obstante la IL-10 puede ejercer un efecto antitumoral mediante otros mecanismos tales como la activación de las células asesinas naturales (NK), dado que en ratones la IL-10 estimula la producción de anticuerpos de la subclase IgG-1, los cuales se unen a antígenos tumorales, haciéndose posible el acoplamiento de los

receptores de las NK a la porción FC de la inmunoglobulina, con lo que se determina la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Romero et al., 2001., Siachoque, 2005).

Otros efectos antiinflamatorios importantes de IL-10 es la inhibición de la producción de intermediarios del óxido nítrico y del oxígeno por los macrófagos y la inhibición de la adherencia de los macrófagos por afectación directa de éstos (Sheldon y Riches, 1999).

Diversos estudios efectuados en ratones indican que los niveles bajos de expresión de IL-10 aumentan el riesgo de cáncer y que por el contrario, el incremento en la expresión de IL-10 ejerce un papel protector y preventivo al menos para algunos tipos de tumores, tales como el melanoma maligno cutáneo, el cáncer de mama y el cáncer de próstata (Siachoque, 2005).



**Figura 6. Interleucina 10**

En el grupo de las citocinas con actividad proinflamatoria se incluyen las producidas por los monocitos y macrófagos activados durante la respuesta inmune innata, aunque también pueden ser producidas por linfocitos activados (Th<sup>1</sup> ó citotóxicos) y otras células no pertenecientes al sistema inmunológico. Las principales citocinas que participan en los acontecimientos celulares y moleculares asociados con los fenómenos inflamatorios de nuestro interés son: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Aguzzi, 2005).



**TNF- $\alpha$ :** Los factores de necrosis tumoral fueron descritos inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores. El TNF- $\alpha$  es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el LPS, siendo esta citocina el principal responsable del shock séptico asociado a bacteriemias. También puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos; *in vitro* el TNF- $\alpha$  ha demostrado acción citolítica contra carcinomas, sarcomas, melanomas y leucemias; *in vivo* se ha demostrado que inoculado intratumoralmente puede inducir regresión del tumor (Ossa, 1988., Aguzzi, 2005).

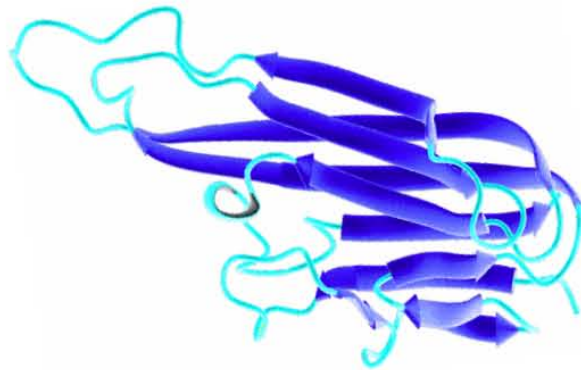


Figura 7. TNF alfa.

**IFN- $\gamma$ :** Los interferones fueron inicialmente descritos como agentes producidos por células infectadas por virus. Posteriormente se descubrió que además de su capacidad antiviral ejercían efectos reguladores sobre la proliferación y la diferenciación de varios tipos celulares y tenían capacidad de modular el sistema inmunológico.

Los interferones se clasificaron en dos grupos: el IFN- $\gamma$  que es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos y el IFN- $\alpha$  secretado por fibroblastos y algunas células epiteliales.

En algunos casos se ha observado que poseen actividad antitumoral, posiblemente debido a su efecto antiproliferativo sobre las células tumorales y modulador sobre el sistema inmunológico. El IFN- $\gamma$  es un potente activador de macrófagos y estimulador de los neutrófilos y células B, e induce la síntesis de la IL-1, IL-2 y TNF que puede inhibir la

transcripción de la expresión de oncogenes (Woll et al., 1991., Aguzzi, 2005).



Figura 8. IFN gamma.

### ***Interleucina 2 (IL-2)***

La IL-2 es una proteína descubierta en 1976 en los laboratorios del National Cancer Institute. Se descubrió como un “Factor de crecimiento de células T” y en el Segundo Taller Internacional de Linfocinas en Suiza (1979) se le renombra como IL-2. Su gen fue clonado en 1984, lo que permitió obtener grandes cantidades de IL-2 recombinante. A partir de entonces se han desarrollado múltiples ensayos clínicos que han demostrado el efecto antitumoral de la IL-2 (Morgan, 1976).

La IL-2 humana es una proteína monomérica de 15.5 kDa, con 133 aa y con punto isoeléctrico entre 6.6 y 8.2. Es una molécula hidrofóbica la cual es estable en pH bajo; compuesta principalmente por una unión de cuatro hélices alfa. El gen que codifica para la IL-2 humana se encuentra localizado en el cromosoma 4q26-28, contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 58, 105 y 125, en donde los dos primeros forman un puente disulfuro que es esencial para la actividad de la molécula (Figura 9).

Es producida principalmente por los linfocitos T de subtipo Th<sub>1</sub>. Algunos clones de células T, líneas e hibridomas también la producen (Mire et al., 1998; VanderSpek et al., 1996; Coventry., 1996).



Figura 9. Interleucina 2

La IL-2 estimula a células que pueden secretar otras citocinas y sustancias con actividad biológica que pueden medir efectos secundarios, también estimula la proliferación de todas las poblaciones de células T y promueve su progresión desde la fase G1 del ciclo celular, lo que permite un incremento en el número celular; asimismo, estimula la actividad citolítica de subtipos de linfocitos T, aumenta su motilidad e induce la secreción de citocinas como: IFN- $\gamma$  (Smith, 1993), IL-1, IL-3 (Mass et al., 1993), IL-4 (Hassuneh et al., 1997), IL-5, IL-6 (Schaafsma et al., 1991), IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  (Anderson y Sorenson, 1994).

Se ha demostrado en timocitos que la IL-2 tiene un efecto proliferador, por lo que juega un papel importante en el desarrollo del timo (Mire et al., 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 (Ciacci et al., 1993; Vella et al., 1998). Cambia la proliferación de linfocitos granulares y también facilita la destrucción de tumores por activación de macrófagos, NK y células asesinas activadas por linfocinas e incrementa la producción de anticuerpos de las células B (Boni et al., 2001., VanderSpek et al., 1996). Aumenta la actividad antitumoral de los macrófagos, dependiente del anticuerpo y oligodendrocitos (Mire et al., 1998).

### ***La IL-2 en la inmunoterapia***

La Interleucina 2 es una proteína muy importante en la respuesta inmunológica mediada por células al promover la activación y proliferación de los Linfocitos T.

Su acción se inicia con la unión de la proteína a su receptor, el cual está presente en células de origen hematopoyético. En la actualidad diversos autores han descrito que este receptor para IL-2 (RIL-2) no es exclusivo de este tipo celular, ya que también se expresa en células normales de riñón y en células de carcinomas humanos (McMillan, et al., 1995). Nuestro grupo de trabajo demostró la presencia de las cadenas beta y gamma de IL-2 R, y que éste es activado por la IL-2 exógena y por C-Kit (Rocha, 2004). También, se detectó su presencia en las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL el cual además de tener una expresión diferencial de acuerdo al estadio del tumor, muestra un patrón de fosforilación de proteínas cinasas diferente al del RIL-2 en linfocitos T de donadores sanos (Rangel, et al., 1998).

Asimismo se determinó que la proliferación de estas líneas celulares se ve inhibida ante la presencia de altas concentraciones de esta citocina, por lo cual la IL-2 podría ser utilizada como una alternativa terapéutica para las pacientes con carcinoma de cérvix. Cabe mencionar que en este proyecto sólo se trabajó con la línea celular INBL, ya que se ha comprobado que tiene una mayor eficiencia en la generación de masas tumorales (Rangel, et al., 1998., Alvarado, 1997).

Desafortunadamente se sabe que la IL-2 administrada *in vivo* vía sistémica es sumamente tóxica (Andizoni, et al., 1994; Becker, et al., 1996). Ya que puede provocar serios efectos secundarios como son: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, edema, hipotensión, entre otros (Hernández, 2005). Ante esta situación se ha buscado una alternativa para la administración de altas concentraciones de IL-2 y ofrecerla como una alternativa terapéutica a las pacientes con carcinoma de cérvix.

De esta manera en un proyecto previo se evaluó el efecto de altas concentraciones de IL-2 en un modelo experimental *in vivo*. Para lograrlo se encapsuló IL-2 en liposomas catiónicos esperando disminuir los efectos tóxicos de la citocina al administrarse vía sistémica, manteniendo su efecto antitumoral. Los resultados indicaron que existe una reducción de las masas tumorales, así como de los efectos tóxicos, en los animales tratados con liposomas catiónicos; sin embargo, poco se sabe acerca de la cantidad de citocina encapsulada y presentada por el acarreador, así como de la interacción citocina-liposoma y de la interacción liposomas-células blanco (Ayala, 2005., Rangel, 1999).

Para obtener mayor información de la respuesta inmunológica inducida por la administración de IL-2 encapsulada se evaluó la expresión de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en células de bazo de los ratones tratados con esta citocina. Y así esclarecer el mecanismo de interacción de las células tumorales con la citocina encapsulada y poder determinar si existen variaciones en los niveles de moduladores biológicos inducidos durante la respuesta antitumoral que nos permita encontrar las mejores condiciones y vías de administración de IL-2 en relación con estos acarreadores y de esta manera contar con una alternativa dual para las pacientes con carcinoma de cérvix, donde IL-2 en altas concentraciones puede en primer lugar inhibir el crecimiento de las células tumorales y en segundo lugar puede inducir la generación de células citotóxicas específicas contra CaCU. Esperando que esta estrategia reduzca los efectos tóxicos de IL-2 disminuyendo la carga tumoral en los ratones, así poder considerarla como una vía eficaz y segura de administrar altas dosis de IL-2 en pacientes con carcinoma de cérvix para reducir y/ó eliminar el crecimiento tumoral y de esta manera proponer el modelo de IL-2 encapsulada como una alternativa terapéutica para las pacientes con este tipo de tumor (Corona y Rangel, 2005).

### *Liposomas*

Los liposomas son vesículas no tóxicos y biodegradables, que se forman cuando películas de fosfolípidos son dispersadas en un medio acuoso; al igual que las membranas naturales, los liposomas son selectivamente permeables a iones. Los liposomas se forman cuando una solución acuosa de sustancia activa es mezclada con la película del lípido.

Los liposomas pueden ser obtenidos con cargas positivas por la adición de aminos o con cargas negativas por la adición de fosfatidilserina ó diacetilfosfato. Materiales hidrofílicos e hidrofóbicos pueden ser atrapados en liposomas. Los compuestos hidrofílicos son disueltos en agua y mezclados con una película lipídica para formar liposomas (Figura 10), mientras que los materiales hidrofóbicos son embebidos en una delgada película de lípido, la liberación del principio activo se realiza por difusión a través de la bicapa, por destrucción de la vesícula, por medio de una concentración crítica de iones calcio, ó por un cambio de pH.

El colesterol y los tocoferoles pueden ser incorporados para reducir la permeabilidad de la membrana e incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa (Kanaoka et al., 2002., Yáñez et al., 2002)

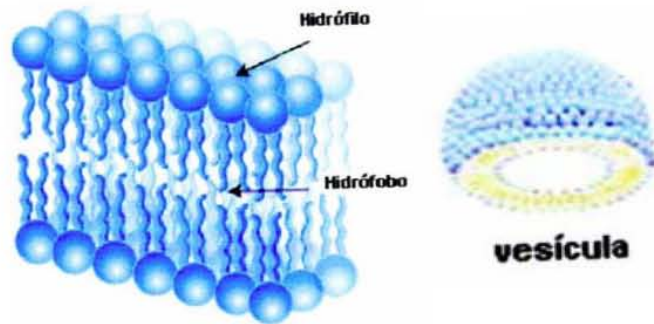


Figura 10. Composición de la bicapa lipídica y formación de la vesícula

Finalmente, la capacidad de los liposomas para atrapar moléculas biológicamente activas en su interior, ha permitido que estas vesículas puedan utilizarse como vehículos para transportar diferentes sustancias y controlar su entrega a la célula blanco, alargando la duración de éstos, dentro del sistema circulatorio, como sucede con la IL-2, que se ha utilizado como alternativa terapéutica contra muchas clases de cáncer (Kanaoka et al., 2003., Janoff, 1992., Ibáñez et al., 1996., Allen et al., 2002).

En trabajos anteriores del Laboratorio de Oncología de la FES Zaragoza, se utilizó la IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos para el tratamiento de ratones con tumores inducidos de CaCU; obteniéndose una disminución de la masa tumoral, así como disminución de los efectos tóxicos. Por esta razón se ocuparon en el presente trabajo liposomas catiónicos unilamelares de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, ya que son muy estables e interaccionan mejor con las células, formados con lípidos anfipáticos que normalmente conforman las membranas celulares: disolviendo 10  $\mu\text{mol}$  de los siguientes lípidos: fosfatidilcolina (PC) y espermidin-colesterol (ESP-CHol), 1:1 respectivamente (Ayala y Corona 2005., Hernández, 2005, Roldan, 2006).

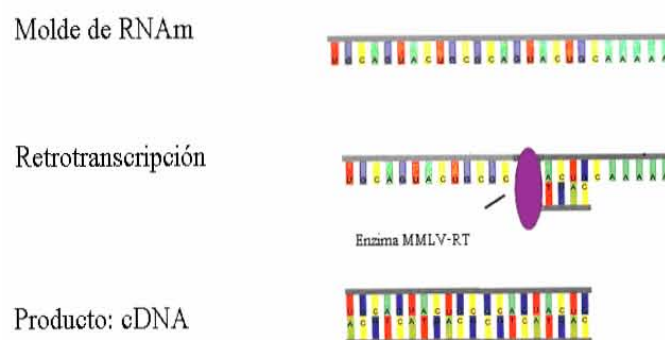
### ***Extracción de RNAm***

La técnica de extracción se realiza para obtener una gran cantidad de RNAm puro para convertirlo en ADN complementario. La extracción se lleva a cabo por medio de Trizol (Total RNA Isolation Reagent de Invitrogen), una solución monofásica que incorpora una mezcla estable de fenol, tiocianato de guanidina, colorante y estabilizante que facilitan el aislamiento del RNA. Durante la homogenización el trizol mantiene la integridad del RNA de la muestra mientras que solubiliza componentes de la célula. La adición de cloroformo es para separar la mezcla en dos fases, acuosa y orgánica. El RNA se encuentra en la fase acuosa y es recuperado por la precipitación con Isopropanol (Malirat y Bergmann, 2003., Luo et al., 2004).

### ***Técnica de Retrotranscripción (RT)***

La RT es una técnica en la cual se utiliza la enzima transcriptasa reversa, presente en retro virus, para sintetizar una hebra de DNA complementario (cDNA) de cada molécula de RNAm. Esta enzima es capaz de polimerizar trifosfato de desoxinucleotido para formar una hebra de cDNA usando una molécula de RNA como molde (Figura 11).

La labor de esta enzima es agregar nucleótidos al extremo 3' de un iniciador (primer) apareado por sus bases a la plantilla. Esta función la cumple un oligo-dt libre agregado al hibridar la cola poli(A) 3' de cada plantilla de mRNA (Panduro, 2000).



**Figura 11. Retrotranscripción del RNAm a cDNA**

## ***Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)***

La reacción en cadena de la Polimerasa PCR (Polymerase Chain Reaction) inicialmente descrita por Kary B. Mullis en 1985, es una técnica que imita la forma en que la naturaleza lleva a cabo la replicación del ADN. Se sabe que la Polimerasa de ADN de especies bacterianas que viven en fuentes termales es estable a temperaturas de 90°C, muy por encima de la temperatura que destruye la actividad de otras polimerasas de ADN, Mullis y colaboradores aprovecharon esta enzima para desarrollar la técnica de PCR. A Mullis se le otorgó el Premio Nobel en 1993 (Ondarza, 2002).

El ADN normalmente se encuentra como una molécula de dos cadenas en forma de hélice donde cada cadena es complementaria de la otra. La PCR inicia con la muestra de ADN, la cual es puesta en un tubo junto con los primers (segmentos cortos sintetizados de ADN de cadena sencilla que corresponden y se unen exactamente a la porción de ADN a sintetizar), desoxinucleótidos trifosfatos (Dntp's los bloques que constituyen el ADN), buffers y una enzima termoestable (Polimerasa) resistente al calor. Partiendo de este principio el PCR se basa en la repetición de un ciclo formado de tres etapas.

La primera etapa es la desnaturalización, que consiste en separar las dos hebras de ADN de la doble hélice que se utilizarán como moldes para el copiado del ADN. Esto se consigue incubando las muestras a una temperatura de 93 a 97°C por 45 segundos.

La segunda etapa es hibridación en donde los primers preparados de oligonucleótidos complementarios a los extremos 3' y 5' del segmento de ADN a amplificar hibridan con el sitio correcto de ADN geonómico que hasta ese momento se encuentra a baja concentración. Como los primers no pueden unirse a la cadena ADN a temperatura elevada, se necesita el enfriamiento que va desde 50–65°C, entonces los primers pueden alinearse a las partes finales del ADN.

La tercera etapa se conoce como elongación en donde el "primer" hibridado servirá de cebador para la síntesis de la cadena de ADN, que comienza con los desoxinucleótidos y la polimerasa de ADN obtenida de *Thermus aquaticus* (una bacteria que habita en fuentes termales). Esta enzima (llamada Taq polimerasa) es capaz de extender cebadores a altas temperaturas, creando de esta forma



una nueva cadena complementaria para cada original. Cuando se completa la síntesis la mezcla es calentada de nuevo a 94°C para desnaturalizar los dúplex de ADN recién formados y empezar un nuevo ciclo (Figura 12).

Las tres etapas de la reacción de PCR: La desnaturalización, la hibridación, elongación de la nueva cadena de ADN definida por el primer se conocen como ciclos. Este ciclo de desnaturalización y síntesis puede repetirse doblando así el número de copias de la secuencia comprendida entre los primers, por lo tanto la secuencia deseada crece exponencialmente, de tal forma que si se empieza con una molécula, después de 30 ciclos habrá cerca de mil millones de copias de ADN (Bustin, 2002., O' Connell, 2002., Millar, 1998).

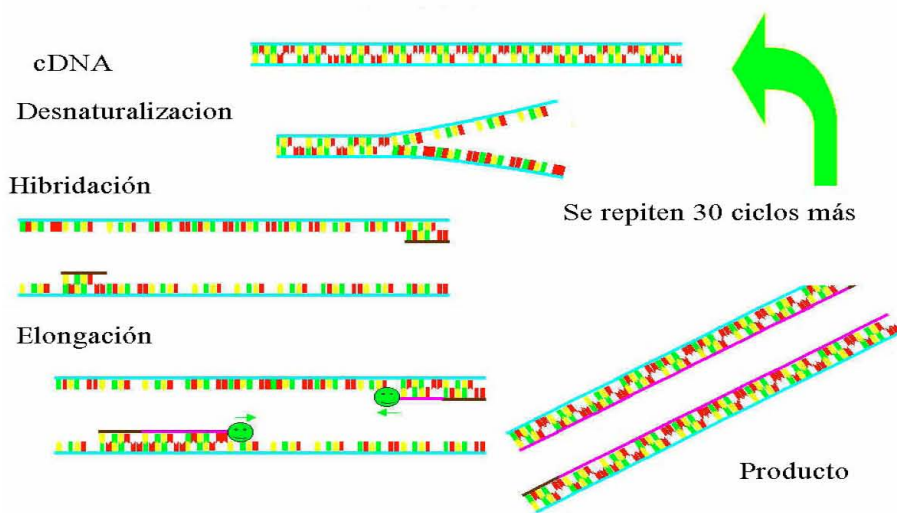


Figura 12. Etapas de la PCR.

### ***Electroforesis (en gel de agarosa)***

Los fragmentos de DNA obtenidos del PCR pueden ser analizados realizando una electroforesis en agarosa. Es un método utilizado en la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN. Esta técnica es capaz de separar fragmentos de ADN con base a su tamaño PB (Pares de Bases). Primero se moldea un bloque de gel con agarosa, que consiste en una matriz de moléculas alargadas y delgadas que forman poros submicroscópicos, el gel posteriormente se coloca en una cámara de electroforesis que contenga buffer (TBE 0.5X) cargado negativamente para aplicar un campo eléctrico. Los gels de agarosa pueden ser revelados mediante la adición de una sustancia como el bromuro de etidio que se intercala con los fragmentos de ADN y los hace visibles a la luz ultravioleta (Ondarza, 2002).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCU, se ha convertido en un grave problema de salud pública en nuestro país debido a su elevada incidencia, la cual ha causado 4,512 muertes anuales, convirtiéndose así en la principal causa de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres mexicanas, principalmente en aquellas de bajos recursos. Por este motivo se han buscado nuevas alternativas para el diagnóstico y tratamiento oportuno de este tipo de cáncer. Se sabe que pacientes con diferentes tipos de cáncer como melanomas malignos, cáncer de riñón y colon han mejorado con la administración de IL-2. Por otro lado, se ha observado que las líneas celulares de carcinoma de cérvix INBL y CALO inhiben su proliferación en presencia de elevadas concentraciones de IL-2, pero esta citocina administrada vía sistémica es altamente tóxica. Por esta razón, en trabajos previos se ha encapsulado IL-2 en liposomas catiónicos que al ser administrada como tratamiento, mostró mantener su efecto antitumoral, con una notable disminución de sus efectos tóxicos (Bañuelos, 2000., Roldán, 2006). Sin embargo, poco se sabe acerca de la regulación de las citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  las cuales son reguladas como consecuencia de la respuesta antitumoral producida por la IL-2 encapsulada. Por lo cual, en el presente trabajo se analizaron los niveles de expresión de RNAm de las citocinas en células de bazo de ratones singénicos de la cepa CBA con tumores de CaCU inducidos y tratados con IL-2 encapsulada; con el propósito de conocer la participación de estas citocinas en la regulación de la respuesta inmunológica mediada por el tratamiento, que nos permita contar con datos que sustenten la pertinencia de su empleo, en un futuro cercano, como una alternativa terapéutica para pacientes con este tipo de tumor.

## HIPÓTESIS

Se conoce que la respuesta antitumoral inducida por células cancerosas está regulada por las citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que ayudan a la proliferación y diferenciación de células citotóxicas específicas (Tc), que son quienes participan en la eliminación de masas tumorales. También se sabe que la interleucina 2 induce la síntesis de estas citocinas; por tanto al administrar IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos, como tratamiento del Cáncer Cérvico Uterino inducido en ratones de la cepa CBA puede inducir la síntesis de RNAm para estas citocinas en los ratones tratados.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de RNAm de las citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por la técnica de RT-PCR en células de bazo de ratón con tumores de carcinoma de cérvix tratados con IL-2 encapsulada.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cultivo de la línea celular INBL.
2. Inmunodepresión e inducción de tumores en ratones hembras de la cepa CBA, con la línea celular INBL.
3. Administración de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos a ratones de la cepa CBA, como tratamiento para la reducción de la masa tumoral.
4. Obtención de los bazos de los ratones con tumores inducidos y tratados con IL-2.
5. Extracción de RNAm del bazo de los ratones tratados con IL-2 encapsulada para determinar la presencia de las citocinas.
6. Medición de los niveles de expresión de RNAm de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por medio de la técnica de RT-PCR, probando oligonucleótidos de ratón para cada una de las citocinas.
7. Realizar electroforesis con gel de agarosa de los productos amplificados.
8. Establecer la relevancia del uso de IL-2 encapsulada como una alternativa terapéutica para las pacientes con carcinoma de cérvix.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

#### *INBL: Estadio IV B*

El material biológico consistió en la línea celular de CaCU, INBL de la reserva criopreservada en el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Las líneas celulares se cultivaron en medio líquido RPMI-1640 suplementado con 10% v/v de SFB desactivado.

El cultivo se mantuvo en incubadora a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad.

#### *Ratones singénicos de la cepa CBA.*

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones singénicos de la cepa CBA, obtenidos a partir de la cruce de las cepas homocigóticas machos BALB-C y hembras Black/C-57; mantenidos en el Bioterio de Ratones de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, bajo condiciones ambientales de esterilidad, con libre demanda de alimento, agua en periodos controlados.

#### *Interleucina 2 (IL-2)*

Se utilizó IL-2 recombinante (R&D Systems) que fue encapsulada en liposomas a una concentración de 100 UI/mL.

#### *Lípidos*

Los lípidos que se utilizaron en este trabajo para la encapsulación de la IL-2 son: fosfatidilcolina (PC) y espermidin-colesterol (ESP-CHOL) concentración [1:1], sintetizado en el Laboratorio de Biomembranas de la ENCB del IPN (Roldan, 2006).

#### *Oligonucleótidos Invitrogen (Life technologies)*

Secuencias de los oligonucleótidos ó primers utilizados para la amplificación de cada una de las citocinas (Tabla 2).

<i>oligonucleótidos o primers</i>	<i>Secuencias Sentido/Antisentido</i>	<i>PB Producto</i>
IL-4	TGTTCTTCGTTGCTGTGAGG TCAACCCCCAGCTAGTTGTC	PB=177
IL-10	TTTTCACAGGGGAGAAATCG CCAAGCCTTATCGGAAATGA	PB=162
TNF $\alpha$	GCACCTCAGGGAAGAGTCTG CTGGGACAGTGACCTGGACT	PB= 204
IFN $\gamma$	TGAGCTCATTGAATGCTTGG ACTGGCAAAGGATGGTGAC	PB=237
$\beta$ -actina	GGGTCAGAAGGATTCCTATG GGT CTCAAACATGATCTGGG	PB= 234

Tabla 2. Secuencias y tamaños de los productos de los oligonucleótidos de las diferentes citocinas.

## Reactivos y soluciones

### *Reactivos RT*

Amortiguador 5X (Invitrogen)

DTT 0.1 M (Invitrogen)

Enzima MMLV-RT (Invitrogen)

DNTP'S 5 mM Mix (Fermentas)

Oligo (DT) 15 Primer 500  $\mu$ g/ml (Promega)

### ***Reactivos PCR***

Amortiguador 5X Green Go Taq (Promega)

DNTP'S 10 mM Mix (Fermentas)

Enzima Go Taq DNA Polímerasa 5u/ $\mu$ L (Promega)

### ***Electroforesis***

Agarosa (Invitrogen)

Marcador de peso molecular Puc19 DNA/ MSPL 34–501 Pb (Fementas)

Marcador de peso molecular de 100 –1500 Pb (Promega)

Buffer de Carga Blue/Orange 6X (Promega)

### ***Soluciones***

Solución Fisiológica de Verseno

RPMI 1640/10% SFB

Hidrocortisona

H<sub>2</sub>O DEPC

H<sub>2</sub>O Bidestilada

H<sub>2</sub>O Inyectable

H<sub>2</sub>O libre de RNAsas

PBS

Trizol

Cloroformo

Alcohol isoamílico

Alcohol Isopropílico

Etanol 70%

Bromuro de etidio

TBE 10X, 1X y 0.5X

## MÉTODO EXPERIMENTAL

### *Proliferación de la línea celular INBL.*

Para realizar la inducción de tumores se cultivó la línea celular INBL en medio de cultivo RPMI-1640/10% SFB. Los cultivos se mantuvieron en incubadora (HyClone) a una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C, por un periodo de 72 horas. La densidad de las células fue determinada en la cámara de Neubauer (American Optical, USA) y su viabilidad fue evaluada por exclusión con azul de tripano (Sigma, USA), posteriormente las células fueron desprendidas de la caja de cultivo con Verseno. Por último se resuspendieron 1X10<sup>7</sup> células en 0.33 mL de PBS para ser inyectadas intraperitoneal (i.p) en el área abdominal cerca de las patas traseras de cada ratón.

### *Condiciones de los diferentes grupos de trabajo*

Se formaron cinco grupos de ratones cada uno con diferentes condiciones (Tabla 3).

GRUPOS DE TRABAJO	CONDICIONES
GRUPO 1	Ratones hembras inyectadas cada tercer día con PBS (Control).
GRUPO 2	Ratones hembras inyectadas únicamente con células INBL.
GRUPO 3	Ratones hembra inmunodeprimidas con hidrocortisona e inoculadas con células INBL.
GRUPO 4	Ratones hembras inmunodeprimidas con hidrocortisona e inoculadas con células INBL y tratadas con IL-2 encapsulada por un lapso de cinco días.
GRUPO 5 (días)	Ratones hembras inmunodeprimidas con hidrocortisona e inoculadas con células INBL y tratadas con IL-2 encapsulada por un lapso de cinco días. Se sacrificaron 3 ratones por cada día de tratamiento.

Tabla 3. Condiciones de los grupos de trabajo

### *Inmunodepresión, Inoculación e Inducción de tumores de CaCU en ratones CBA.*

Los ratones inicialmente fueron inmunodeprimidos administrando cada 48 horas hasta 5 ó 6 ocasiones, dosis de 3mg de hidrocortisona por ratón (Cosió et al., 2005), posteriormente se realizó la inoculación del tumor inyectando las células de carcinoma; se siguió administrando la misma dosis de



hidrocortisona cada 48 horas durante 15–20 días después de la inoculación (Bañuelos, 2000).

### ***Sacrificio.***

Los ratones fueron sacrificados por asfixia con cloroformo ó por dislocación craneal. Se realizó la disección del área abdominal para posteriormente extraer el bazo de cada ratón (libre de grasa), observando minuciosamente dentro y fuera de la cavidad peritoneal en busca de masas tumorales, las cuales serán procesados posteriormente.

### ***Extracción de RNAm.***

Para la extracción de RNAm se maceraron los bazos obtenidos de los ratones agregando 1ml de PBS, se centrifugó para obtener el botón celular y se realizaron dos lavados más con PBS para posteriormente decantarlo. Se le agregó al botón celular 1ml de Trizol® dejándolo actuar por 10 minutos para que se lleve a cabo la reacción (lisado), transcurrido el tiempo se agregaron 200µL de la mezcla alcohol isoamílico–cloroformo [1:24] y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó a 3000 g, durante 15 minutos a una temperatura de 4–8 °C. Se obtiene la fase acuosa y se adicionan 500µL de Isopropanol frío centrifugando nuevamente para que se lleve a cabo la precipitación del RNA, para finalmente decantarlo y agregar 1mL etanol al 70% y dejarlo actuar por un lapso de 15 minutos para posteriormente desechar cuidadosamente el etanol con ayuda de una micropipeta para evitar perdida del RNA. El último paso es el secado de la muestra de RNA a temperatura ambiente durante dos horas aproximadamente. Ya libre de alcohol se resuspende en 20µL de agua dietilpirocarbonatada (DEPC) para hidratarlo y así obtener nuestro primer stock. Se determinaron las concentraciones de cada una de las muestras realizado una segunda dilución [4:200] con agua DEPC (segundo stock), procediendo a su cuantificación en el espectrofotómetro (eppendorf, USA) a una absorbancia de 260nm, 280nm y la relación entre las absorbancias y así realizar los cálculos correspondientes para lograr una concentración en µg/µL, para ello se ocupo la siguiente formula:

$$RNA = (Abs\ 260nm) (40\mu g) (Volumen\ de\ la\ dilución) / 1000 = \mu g/\mu L$$

### ***Retrotranscripción del RNAm***

De acuerdo a la concentración de RNAm obtenido se determinó el volúmen de la solución necesaria para tomar 2µg/µL de RNAm requerido en la técnica. Se procedió a la retrotranscripción de cada una de las muestras bajo condiciones determinadas (Tabla 4), se incubó en el termociclador durante 1 hora a 42°C. Obteniendo así el DNA complementario.

<b>Reactivo</b>	<b>µL/ RX</b>
Amortiguador 5X	6
Dtt 0.1M	2
dNTP's 5 mM (Mix)	4
Enzima MMLV-RT	1.0
Oligo DT	2
Muestra de RNAm	2
H <sub>2</sub> O libre de RNAsas	13

**Tabla 4. Condiciones de una reacción de RT para un volumen de 30 µL por RX (reacción)**

### ***Reacción en Cadena de la Polímerasa (PCR)***

Los productos de la reacción, fueron utilizados para la amplificación del cDNA de las citocinas IL-4, IL-10, IFN-γ y TNF-α en presencia de los oligonucleótidos correspondientes. La amplificación se llevó a cabo bajo condiciones determinadas (Tabla 5).

<b>Reactivo</b>	<b>µL/ RX</b>
Amortiguador 5X Green	6
dNTP's 10 mM (Mix)	0.8
Primers	
3'- 5' sentido	1.0
5'- 3' antisentido	1.0
Go Taq polimerasa 5 unidades/µL	0.15
Muestra de DNAC	4
H <sub>2</sub> O libre de RNAsas	7.05

**Tabla 5. Condiciones de una reacción de PCR para un volumen de 20 µL por RX (reacción)**

### ***Programa del termociclador para PCR.***

1er. ciclo:

94 °C 6 minutos

2do. ciclo:

94 °C 45 segundos (desnaturalización)

55 °C 2 minutos (hibridación)

72 °C 2 minutos (elongación)

\* Se repitió 29 veces el segundo ciclo.

3er ciclo:

55 °C por 2 minutos

72 °C por 7 minutos

20 °C por 15 minutos

4 °C por 1 hora.

Se guardaron los productos del PCR en congelación (-20° C) hasta su uso.

### ***Electroforesis de los productos de PCR***

Se prepararon los geles de agarosa al 1.5 % en TBE 1X añadiendo 30µL de bromuro de etidio. Ya polimerizado se colocó en el primer pozo del gel el control de pesos moleculares (escalera PB) para ubicar por su tamaño nuestras citocinas, posteriormente se colocaron 4µL de cada una de las diferentes muestras (productos PCR) en los pozos del gel. Se corrió el gel en una cámara de electroforesis (Owl, USA), cubierto de TBE 0.5 % a 80-90 volts durante 60 min. Finalmente se colocó el gel en un transiluminador (UVP, USA) que con ayuda de la luz ultra violeta se pudieron observar los productos y así lograr localizar nuestra citocinas en diferentes bandas.

## RESULTADOS

Con el propósito de obtener células de bazo de ratones con tumores de carcinoma de cérvix inducidos y tratados con IL-2 se formaron grupos de ratones con diferentes características. Después de un mes de haber inoculado células de CaCU a los grupos de ratones problema, se les administró vía peritoneal interleucina 2 encapsulada en un intervalo de tiempo de 1 a 5 días (Bañuelos, 2000), A los ratones se les realizó la disección para extraer el bazo y monitorear la presencia de tumores.

Después de realizar la disección confirmamos tal como lo indica Bañuelos (2000), que los tumores de carcinoma de cérvix disminuyen su volumen hasta en un 80% como resultado de la administración de IL-2 encapsulada.

Una vez confirmada la reducción de las masas tumorales se procesaron los bazos de estos ratones para obtener el RNAm total el cual fue cuantificado en espectrofotómetro, y por medio de diluciones se obtuvo la cantidad necesaria de RNAm para cada una de las muestras ( $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Cabe mencionar que se evaluaron todas las muestras de RNAm obtenidas para cada grupo, sin embargo para la determinación de citocinas por PCR, sólo se eligieron aquellas que no estaban degradadas ni contaminadas, ya que es sabido que cuando la relación de absorbencias 260/280 da un valor mayor a 2 unidades significa que las muestras están contaminadas con otras moléculas además de RNAm. Una vez analizados estos datos seleccionamos sólo 20 muestras de RNAm en las cuales se incluyeron representantes de cada grupo (Tabla 6).

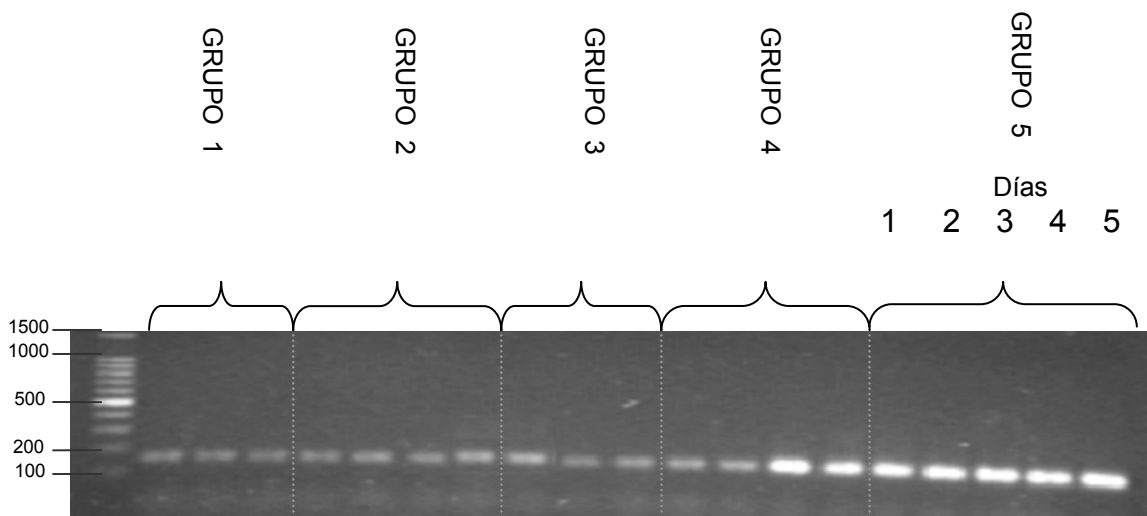
La integridad de las muestras de los mensajeros se determinó por medio de un gel de agarosa.

Muestra (4:200)	Grupo de ratones	Absorbancia 260	Absorbancia 280	Relación 260-280	Formula $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	1	0.776	0.363	2	6.2
2	1	0.587	0.256	1.97	4.69
3	1	0.535	0.250	2	4.28
4	2	0.793	0.349	2	6.34
5	2	0.635	0.284	2	5.08
6	2	0.802	0.378	2	6.41
7	2	0.575	0.267	2	4.6
8	3	0.884	0.427	2	7.07
9	3	0.491	0.226	2	3.92
10	3	0.259	0.123	1.97	2.07
11	4	0.634	0.305	2	5.07
12	4	0.458	0.272	1.91	3.66
13	4	0.365	0.173	2	2.92
14	4	1.275	0.628	2	10.2
15	5	0.679	0.358	2	5.43
16	5	0.444	0.263	1.8	3.55
17	5	0.313	0.127	2	2.5
18	5	0.316	0.265	1.77	2.52
19	5	0.543	0.233	2	4.34
20	5	0.390	0.166	2	3.12

**Tabla 6. Valores de absorbancias 260, 280 y relación 260/280, para cada una de las muestras seleccionadas para obtener la cantidad necesaria en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNAm de los diferentes grupos.**

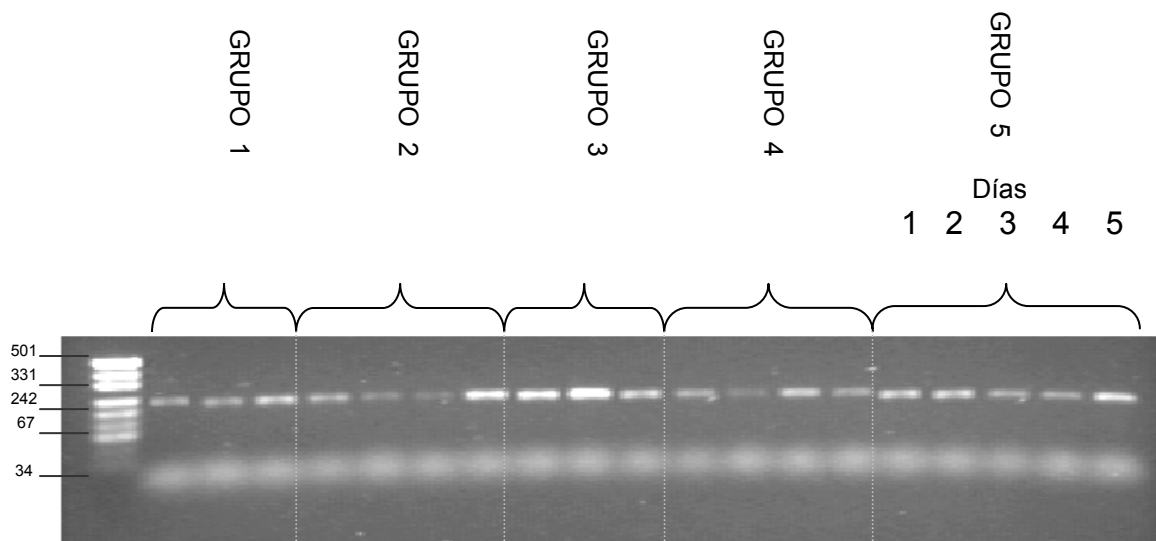
Una vez seleccionadas las muestras de RNAm que se encontraban en condiciones óptimas, se llevó a cabo la RT-PCR obteniendo así el DNA complementario para cada una de ellas. Para llevar a cabo la PCR se utilizaron oligonucleótidos previamente diseñados con tamaños específicos (PB= pares de bases) para las citocinas y así poder compararlos con los productos amplificados. Cabe mencionar que se usó como control interno de la técnica la amplificación de  $\beta$ -actina.

**IL-10:** Los productos de amplificación usando los oligonucleótidos para IL-10, muestran una banda de 167 pb que corresponde al tamaño del amplificado esperado. Los datos indican que las muestras de ratones de los grupos 3 y 4 presentan un aumento en la expresión del RNAm para esta citocina, la cual llega a ser máxima en algunas muestras del grupo 4 que fueron tratados con IL-2 encapsulada. Para el caso del grupo 5, donde la extracción de las células de bazo se realizó después de cada día de tratamiento, observamos una intensa expresión para la citocina en cada una de las muestras utilizadas (Figura 13).



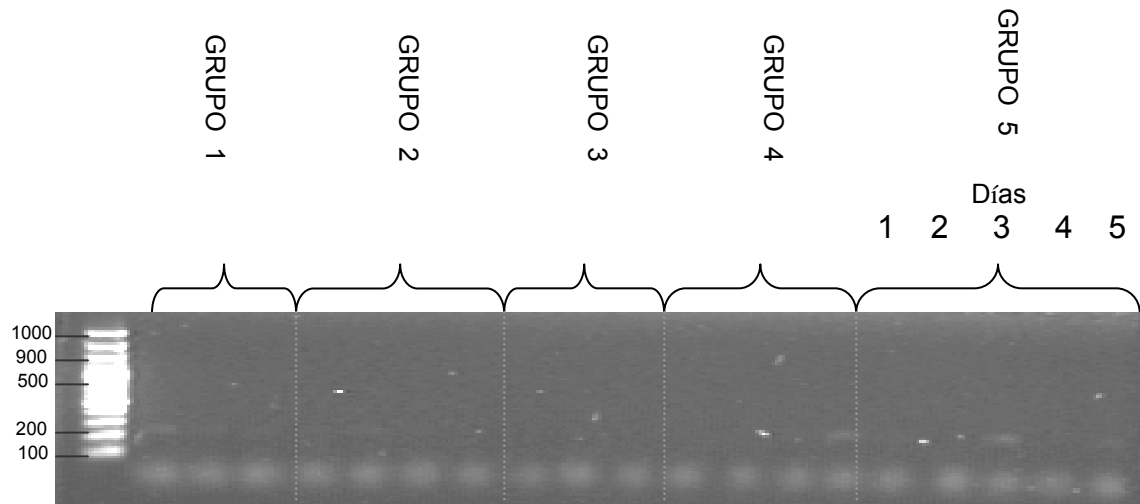
**Figura 13. Productos del amplificado para IL-10:** En todos los grupos detectamos una banda de 167 pb, donde se muestra una mayor expresión de esta citocina en el grupo 4, (ratones inmunodeprimidos con hidrocortisona, inoculados con INBL y tratados con IL-2 encapsulada) y el grupo 5, con las mismas condiciones del grupo 4, pero sacrificados por día de tratamiento.

**TNF- $\alpha$ :** Para esta citocina se observó una banda de 204 pb, que también corresponde a los productos de amplificación esperados para TNF- $\alpha$ . En este caso se detectó una mayor expresión del RNAm en el grupo 3, de animales inmunodeprimidos e inoculados con células INBL. Para los productos del grupo 5 (ratones sacrificados por día de tratamiento) la máxima expresión de RNAm para TNF- $\alpha$  se detectó en las muestras obtenidas al 5to día de tratamiento (Figura 14).



**Figura 14. Productos del amplificado para TNF- $\alpha$ . En las muestras del Grupo 3 y la del quinto día del grupo 5 (ratones inmunodeprimidos e inoculados con células de la línea INBL), se detecta una banda intensa de 204 pb, con mayor expresión que la del control.**

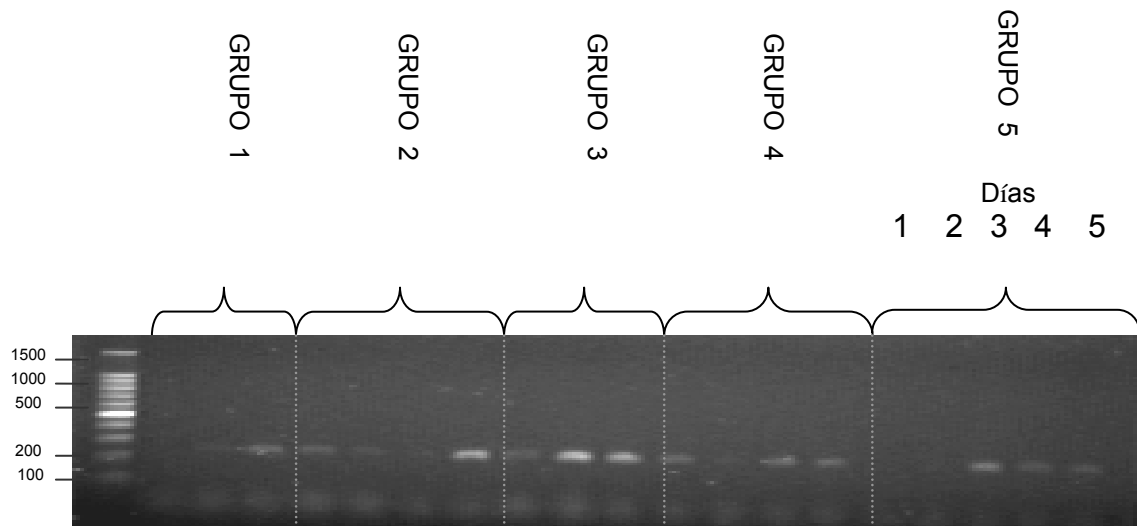
**IL-4:** La expresión del RNAm de esta citocina es extremadamente baja y sólo se distinguió una tenue banda de 177pb en las muestras de los grupos de ratones 4 y 5 que recibieron tratamiento (Figura 15).



**Figura 15.** Productos del amplificado para IL-4. Se detecta una banda de 177 pb de muy baja expresión en los grupos 4 y 5.



**IFN  $\gamma$ :** En caso de Interferón gamma no todas las muestras se amplificaron. En el grupo 3 que corresponden a muestras de ratones inmunodeprimidos e inoculados observamos un patrón de expresión de la citocina semejante al de TNF- $\alpha$ . Detectando una intensa banda de 237 pb. Por otro lado, en las muestras del grupo 5 observamos que en la del día 3 también hay un aumento considerable en la expresión de IFN- $\gamma$  (Figura 16).



**Figura 16. Productos del amplificado para IFN- $\gamma$ :** En el Grupo 3 (ratones que fueron inmunodeprimidos e inoculados con células de la línea INBL), se detecta una banda intensa de 237pb así como en la muestra del 3er día del grupo 5.

**$\beta$ -actina:** Es una proteína constitutiva por lo cual se usa como control interno de la técnica de PCR (Figura 17).

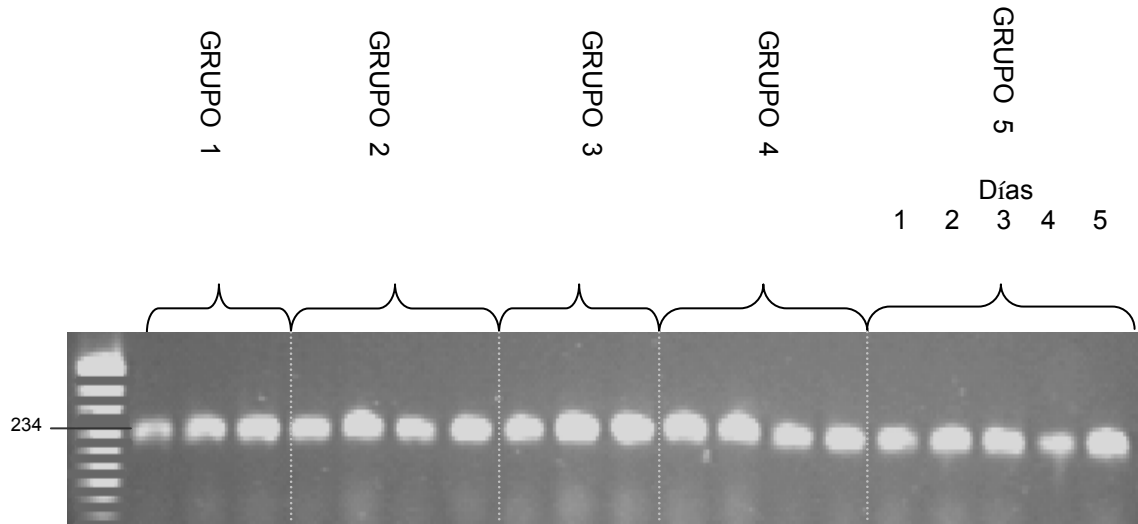


Figura 17. Productos de amplificación para  $\beta$ -actina. Se detectó una banda de 234pb en las muestras de los diferentes grupos.

Posteriormente se realizó una tabla comparativa de los amplificadores de cada citocina y se compararon con su grupo control (Tabla 7).

Grupo de ratones		IL-4	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	B-actina
1 Control: Inyectados cada tercer día con PBS		-	+	+	+	++++
2 inoculados con células INBL		-	+	+	++	++++
3 Ratones inmunodeprimidos con hidrocortisona e inoculadas con INBL		-	+++	+++	++	++++
4 Ratones inmunodeprimidos, inoculados con INBL y tratadas con IL-2 encapsulada por un lapso de cinco días.		-	+	+	++++	++++
5 Ratones inmunodeprimidos, inoculados con INBL y tratadas con IL-2 encapsulada, sacrificados diariamente hasta llegar al quinto día de tratamiento	1 <sup>re</sup> día	-	+	+	++++	++++
	2 <sup>do</sup> día	-	+	+	++++	++++
	3 <sup>er</sup> día	-	++	+	++++	++++
	4 <sup>to</sup> día	-	+	+	++++	++++
	5 <sup>to</sup> día	-	+	++	++++	++++

**Tabla 7. Resultados de las diferentes citocinas en cada uno de los grupos de trabajo, según el nivel de expresión**

(-) Baja ó Nula y (+) Aumento de expresión según el control.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Interleucina 2 es una proteína muy importante en la respuesta inmune celular ya que promueve la activación y proliferación de los linfocitos T. El proceso de activación inicia con la unión de la citocina a su receptor, este último está presente en células de origen hematopoyético, aunque también se ha detectado su presencia en células tumorales de diversos tipos. En nuestro laboratorio se determinó que células de las líneas de cáncer cérvico uterino CALO e INBL también lo expresan de forma diferencial dependiendo del estadio del tumor que les dio origen, asimismo, se determinó que la proliferación de estas líneas celulares se ve inhibida ante la presencia de altas concentraciones de esta citocina. Por lo antes mencionado, se piensa que la IL-2 podría ser utilizada como una alternativa terapéutica para las pacientes que padecen este tipo de cáncer.

Desafortunadamente se sabe que la IL-2 administrada *in vivo* vía sistémica es muy tóxica y genera diversos efectos secundarios (Andizoni, et al., 1994., Becker, et al, 1996); ante esta situación nuestro grupo de trabajo ha pensado en buscar una alternativa para la administración de altas concentraciones de IL-2. De esta manera surgió un proyecto previo en el cual se evaluó el efecto de altas concentraciones de IL-2 en un modelo experimental *in vivo*, encapsulando en liposomas catiónicos la IL-2, obteniendo como resultado una disminución de sus efectos tóxicos, manteniendo su efecto antitumoral (Bañuelos 2000). Estos resultados son muy alentadores, sin embargo, poco se sabe de la regulación de los procesos moleculares que participan en este proceso antitumoral.

Por esta razón el presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar la expresión de RNAm para citocinas sintetizadas por la población de linfocitos T auxiliares (Th), ya que éstos juegan un papel muy importante en la generación de linfocitos T citotóxicos, los cuales son inducidos a su proliferación y diferenciación por IL-2. Una forma de conocer el camino de activación de células efectoras, es por medio de la determinación del patrón de citocinas que se regula ante un estímulo específico. Por lo cual el presente trabajo se determinó la expresión de RNAm para citocinas relacionadas en la respuesta de rechazo tumoral.

Los resultados con respecto a la IL-2 encapsulada como tratamiento antitumoral en ratones singénicos de la cepa CBA, nos indican que efectivamente hay una reducción de un 80% en las masas tumorales en los

ratones tratados con esta interleucina en comparación de los ratones control, los cuales desarrollaron tumores de CaCU mas grandes. La disminución de las masas tumorales se observó de forma más evidente en los últimos días del tratamiento.

Esto implica que la IL-2 encapsulada administrada en los ratones promueve la activación de linfocitos T, ya que en el experimento por días podemos detectar la expresión de IFN- $\gamma$ , que se reporta induce la diferenciación de linfocitos T, macrófagos y células NK. También se detectó mensajero para TNF- $\alpha$ , que es conocido como un agente inductor de necrosis en células tumorales (Aguzzi, 2005).

Con respecto a los resultados obtenidos de los niveles de expresión de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , indican que en los ratones tratados con IL-2 encapsulada, existe un evidente aumento en la expresión de la citocina IL-10, directamente relacionado con los días de tratamiento administrado. Se sabe que IL-10 es una citocina inmunorreguladora producida principalmente por monocitos, macrófagos, linfocitos Th<sub>2</sub>; la IL-10 puede inhibir la síntesis de citocinas como IFN- $\gamma$  la cual es importante para la generación de linfocitos T citotóxicos. También estimula otras funciones de igual importancia como es, promover la actividad de las células asesinas naturales (NK), activando la defensa contra tumores e infecciones virales (Siachoque 2005).

Asimismo, en nuestros resultados observamos una clara reducción en la expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , en los casos en que observamos la mayor expresión de IL-10 (León y Faxas, 2004). La inhibición de IFN- $\gamma$  ocasiona una disminución TNF- $\alpha$  estas dos moléculas son mediadores que potencian la actividad citotóxica de monocitos, macrófagos y NK, lo cual implicaría la disminución de esta actividad, y por ende, no se detectaría actividad antitumoral, lo cual no observamos (Arango, et al., 1999). Por el contrario en los grupos problema donde IL-10 tiene un aumento en su expresión, se detectó regresión de masas tumorales, lo cual podemos atribuir a la acción directa de células NK, dado que existen datos que indican que la IL-10 aumenta la susceptibilidad de las células blanco a ataque de las células asesinas (Siachoque, 2005). Por otro lado también se puede tener una disminución de crecimiento tumoral por la acción directa de la IL-2 encapsulada.

Los datos obtenidos, de la alta expresión de IL-10 nos hace pensar que actúa como supresor de la síntesis de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Siachoque, 2005), ya que se ha reportado que cuando IL-10 esta elevada interviene negativamente en la generación de linfocitos Th1, responsables de la síntesis de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que participan en la proliferar y diferenciar de linfocitos citotóxicos (León y Faxas, 2004).

En el caso de IL-4, se sabe que ésta e IFN- $\gamma$  en altas concentraciones inhiben la producción de IL-10 (Sheldon y Riches, 1999), sin embargo, en nuestro ensayo tenemos altos niveles de IL-10, que es la citocinas inmunosupresora por excelencia la cual podría estar inhibiendo la síntesis de IL-4 tal como se muestra en nuestros resultados, por lo cual no detectamos la expresión del mensajero para esta citocina.

Los resultados presentados en este trabajo proporcionan información sobre los mecanismos de regulación de la síntesis de citocinas producida por IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos, destacando el papel de IL-10 en dicha regulación.

## CONCLUSIONES

- ❖ Se confirma que IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos disminuyen las masas tumorales de CaCU en ratones singénicos de la cepa CBA.
- ❖ La disminución de las masas tumorales es más evidente al 5to día de tratamiento.
- ❖ La IL-2 induce un aumento importante en la expresión de IL-10.
- ❖ IL-2 no produce cambio significativo en la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .
- ❖ El tratamiento con IL-2, no afecta la expresión del RNAm de IL-4

## PERSPECTIVAS

Se conoce que IL-10 actúa negativamente en la producción de linfocitos auxiliares que son los encargados de la síntesis de citocinas, así como de la proliferación y diferenciación de los linfocitos. Aunque también actúa directamente sobre la actividad de las células NK promoviendo la defensa contra tumores. Por lo cual se sugiere cuantificar en suero a la citocina por medio de la técnica de ELISA y/o determinar poblaciones de células NK, para detectar su activación y así, corroborar la participación directa de esta citocina en el efecto antitumoral observado.

## *ANEXO*

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### *DESACTIVACIÓN DEL SUERO FETAL BOVINO*

El suero fetal bovino (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

#### *PBS*

Fosfato de sodio monobásico 2.88 g.

Cloruro de potasio 0.20 g.

Cloruro de sodio 8.00 g.

Fosfato de potasio 0.4g.

#### *TBE 10X*

108gramos de Tris base

55gramos de Acido bórico

40 mililitros de EDTA 0.5 M

Nota: llevar a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Guardar a temperatura ambiente.

#### *EDTA 0.5 M*

186.1gramos de EDTA

1000 mililitros de agua destilada

Nota: disolver el EDTA en los 1000 mL de agua destilada y llevar a PH 8.

#### *TBE 1X, pH 8.0*

100 mL TBE 10X

900 mL H<sub>2</sub>O dd

Mida el pH 8.0 (use NaOH ó HCl para regularlo).

Nota: Guardar a temperatura ambiente ó a -4 °C.



### ***TBE 0.5X, pH 8.0***

500 mL TBE 1X

500 mL H<sub>2</sub>O dd

Mida el pH 8.0 (use NaOH ó HCl para regularlo).

Nota: Guardar a temperatura ambiente ó a -4 °C.

### ***BROMURO DE ETIDIO 10 mg/mL.***

Use protección completa: mascarilla, anteojos, guantes, bata de laboratorio.

50 mg de bromuro de etidio

5 mL H<sub>2</sub>O dd

Agite 2 horas.

Concentración final en buffer 0.5 mg/mL 5mL (BrEt)/100mL (buffer).

Nota: Guardar a 4°C en botella oscura

### ***INACTIVACIÓN DE BROMURO DE ETIDIO***

Ponga los geles usados teñidos con bromuro de etidio y buffer en:

60 mL/L de nitrito de sodio 0,5M.

50 mL/L de ácido hipofosforoso 5%

Dejar pasar 16 horas, luego deseche normalmente.

### ***GEL DE AGAROSA 1.5%***

1.5 gramos de agarosa en 100 mL de TBE 1X

### ***AGUA DEPEC***

0.2% de Dietil-pirocarbonato en 100ml de agua

### ***PRIMERS (Diluciones para tenerlos a 50 mM)***

β- actina (1:10)

IL-4 (1:5)

IL-10 (1:5)

TNFα (1:5)

IFNγ (1:5)

### ***DNTPS (MIX)***

Todos los DNTP'S se encuentran en una concentración de 100mM, se tuvieron que diluir 100µL de cada uno en 600µL de agua libre de RNAsas para que quedara un mix de los cuatro DNTP'S a una concentración de 10Mm.

DCTP 10 mM

DATP 10 mM

DTTP 10 mM

DGTP 10 mM

### ***SOLUCION FISIOLÓGICA DE VERSENO***

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

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

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

### ***SOLUCION DE FOSFATOS (PBS)***

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

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

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

## ***ESCALERA***

Marcadores de pesos moleculares ó escalera, utilizados en la electroforesis.

1) Marcador de peso molecular 34-501 Pb (Fermentas): 1  $\mu$ L marcador, 1  $\mu$ L buffer de 6X blue green, 4  $\mu$ L de agua depc

2) Marcador de peso molecular de 100 -1500 Pb (Promega): 2  $\mu$ L de buffer blue green 3X, 2  $\mu$ L marcador.

## **REFERENCIAS**

Abbas A, Lichtman A y Pober J (1994). Cellular and molecular immunology. Editorial W.B USA, 145–157.

Abbas A y Lichtman A (2004). Inmunología Celular y Molecular 5ª Edt. Editorial Elsevier Madrid España, 17–39.

Aggarwal B y Gutterman J (1992). Human cytokines: Handbook for basic and clinical research. Blakwell Scientific Publication Boston, 441.

Aguzzi A y Heikenwalder M. Cytokines and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity* 2005, **22**: 145–54.

Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2002). Molecular biology of the cell 4ª ed. Ediciones Garland Nueva York.

Allen, Dos Santos, Gallagher, Chiu, Shu, Li, Johnstone, Janoff, Mayer, Webb y Bally. Controlling the Physical Behavior and Biological Performance of Liposome Formulations through Use of Surface Grafted Poly (ethylene Glycol). *Bioscience Reports* 2002, **22**(2):225 250.

Alleva D, Kaser S, Monroy M, Fenton M y Beller D. IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *Immunol* 1997, **159**:2941–2951.

Alonso P, Lozano E y Hernández M (2000). Cáncer Cervico–Uterino diagnostico, prevención y control. Editorial Panamericana México, 254–267.

Alvarado M. J (1997). Presencia de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  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.

Anderson P y Sorenson M. Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clin Pharmacokinet* 1994, **27**(1):19–31.

Arango P, Ll anes F, Moreno D y F axas G. Influencia de citocinas en respuesta citot oxica natural de pacientes con cáncer de mama. *Rev Cubana Oncol* 1999, **15**(3): 18-192.

Ardizoni A, Bonavia M, Viale M, Baldini E, Mereum C, Verna A, Ferrini S, Cinquegrana A, Molinari S, Mariani L, Roest J, Shrenberg J, Palmer A, Rosso R, Ropolo F y Razo C. Biologic and Clinical Effects of continuous infusi n interleukin-2 in patients with none-small cell lung cancer. *Cancer* 1994, **73**(5): 1353-1360.

Avice N, Sarfati M, Triebel F, Delespesse G y Demeure E. 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. *Immunology* 1999, **162**: 2748-2753.

Ayala A, Corona O, Ib a nez H, Baeza R, Weiss S, y Rangel C (2005). Efecto de la IL-2 encapsulada en dos formulaciones de liposomas sobre la proliferación de células CaCU. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.*

Bañuelos M.S (2000). Reducción de tumores de carcinoma de cérvix inducidos en ratones de la cepa CBA por la administración de la IL-2 encapsulada en liposomas positivos. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza UNAM, México.

Becker C, Pancook D, Gillies D, Furukawa K y Reisfeld A. T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin-2 therapy. *Exp Med* 1996, **183**: 2361-2366.

Bermúdez M, Peralta Z y Madrid M. Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud pública México* 2005, **47**(6):1-18.

Boni L, Batenjany M, Neville E, Guo Y, Xu L, Wu F, Mason J, Robb R y Popescu M. Interleukin-2-induced small unilamellar vesicle coalescence. *Elsevier Science B.V* 2001, **1514**:127-138.

Bustin S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (PCR-RT): trends and problems. *Invited Review* 2002, **29**: 23-39.

Carrillo A, Mohar A, Meneses A, MC, Frías M, Solorza G y Lizano M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud pública de México* 2004, **46**(1):7-15

Ciacci C, Mahida R, Dignass A, Koizumi M y Podolsky K. Functional Interleukin-2 Receptors on Intestinal Epithelial Cells. *Clin Invest* 1993, **92**:527-532.

Corona O, Rangel C, Ibáñez H, Baeza R, Aguilar S, García del Valle y Weiss S (2005). Activación de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones por la presencia de diferentes concentraciones de liposomas. *Memorias del XIV Congreso de Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica.*

Cosío B, Borrego A y Adcock I. Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol* 2005, **41**: 34 - 41

Coventry J, Weeks C, Heckford E, Sykes J, Bradley J. y Skinner M. Of IL-2 Cytokine Expression Despite IL-2 Messenger RNA Transcription in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary Human Breast Carcinoma. *Immunology* 1996, **156**:3486-3492.

Dzul R, Puerto S y González L. Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Rev Biomed* 2004,**15**(4):233-241.

Frías G y Zentella D (2005). Caracterización de la adhesión de células metastásicas humanas a cultivos endoteliales humanos activados por factores derivados de células tumorales. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. Oaxaca México.*

Guzmán R, Alcocer G y Madrid M. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cervicouterino. *Salud pública de México* 1997, **40** (1): 1-6.

Hassuneh M, Nagarkatti P, y Nagarkatti M. Evidence for the participation of Interleukin-2 (IL-2) and IL-4 in the regulation of autonomous growth and tumorigenesis of transformed cell of lymphoid origin. *Blood* 1997, **89**: 610-620.

Hernández J, Corona O, Ibáñez H, Baeza R, Leyva S, Weiss S y Rancel C (2005). Caracterización de liposomas catiónicos como acarreadores de interleucina 2 (IL2). Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.

Hou J, Schindler, Henzel, Ho, Brasseur, y McKnight. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. Science 1994, **265**: 1701-1706

Ibáñez M, Gariglio P, Chávez P, Santiago R, Wong C, y Baeza I. Spermidine-condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and expression of exogenous DNA transfer by liposomes. Biochem Cell Biol 1996, **74**: 633-643.

Janoff A. Lipids, liposomes and rational drugs design. Lab Inves 1992, **66**: 655-658.

Kanaoka, Takahashi, Yoshikawa, Jizomoto, Nishihara, and Hirano. Continuous Release of Interleukin-2 from Liposomal IL-2 (Mixture of Interleukin-2 and Liposomes) After Subcutaneous Administration to Mice. Marcel Dekker 2003, **29**(10): 1149-1153.

Kanaoka, Takahashi, Yoshikawa, Jizomoto, Nishihara, Uchida, Maekawa y Hirano. A significant enhancement of therapeutic effect against hepatic metastases of M5076 in mice by a liposomal interleukin-2 (mixture). Journal of Controlled Release 2002, **82**:183-187.

León C y Faxas M. Cáncer de cuello uterino: aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia. Rev cubana med 2004, **43**(1).

Lodige L, Marg A, Wiesners B, Malecova B, Oelgeschlage T y Vinkemeier U. Nuclear Export Determines the Cytokine Sensitivity of STAT Transcription Factors. Biological Chemistry 2005, **280**(52): 43087-43099.

Luo, Heard y Lodish. Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED). Lodish 2004, **23**: 5494-5499.

Maas A y Dullens J. Interleukin-2 in cancer treatment: disappointing or (still) promising. Cancer Immunol Immunother 1993, **36**:141-148.

Malirat y Bergmann (2003). Manual RT-PCR y secuenciamento cíclico para estudios de epidemiología molecular. Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la salud 7-39.

McMillan D, Kernohan M, Flett M, Heys S , Deehan D, Sewell H, Walker F, Eremin O. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localization in human solid tumor cells in situ and in vitro evidence for a direct role in the regulation of tumor cell proliferation. *Cancer* 1995, **60**: 776-785.

Meager A (1991). Cytokines. Prentice Hall Advanced Reference Series. New Jersey. USA, 14-109.

Michael H, Ross P, Gordon I y Wojciech (2005). Histología Texto y Atlas, Biología celular y molecular. Editorial Panamericana 384-389.

Miller, Dikes y Polesky. Simple and rapid method for ADN preparation with white blood cells *Nucl* 1998, **16**:1215.

Mire S y Thorpe, R (1998). Cytokines. Academic Press Great Britain, 19-33.

Morgan D, Ruscetti F y Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal bone marrows. *Science* 1976, **193**: 1007-1008.

Nazzari N, Suárez P, Larraguibel P, Rojas F y Bronda M. Lesiones preinvasoras de cuello uterino: Una visión actual. *Chil Obstet Ginecol* 2006, **71**(5):341-348.

O'Connell (2002). Methods in molecular Biology RT-PCR Protocols. Edt Human press Totowa New Jersey.

Oppenheim J, Rosenstreich D y Potter M (1981) Lymphokines, Cellular functions in immunity and inflammation. London Edward Arnold, 259-282.

Ordanza N (2002). Biotecnología básica. Edt Trillas México, 65-78.

Ossa J. El factor de necrosis de los tumores ó caectina. *Colombia* 1988, **1**(2) 114-120.



Panduro A (2000). Biología Molecular en la clínica. Tercera Edt. Mc Graw- Hill México, 31-41.

Parkins y Robert A (1993). Las bases del diagnóstico clínico. Editorial Continental México.

Ramírez A (1997). Inmunología básica y clínica. Editorial Manual Moderno México.

Rangel Corona Capítulo Interleucina 2 / Soto C, Cáceres C, Mendoza R y Weiss S (1999). Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares. Edt Plaza y Valdez editores México.

Rangel C, Rodríguez C, Flores F, Gómez R, Soto C, Mendoza R y Weiss S. Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors* 1998, **3**:1239-1243.

Regueiro J y López (1996). Inmunología, Biología y patología del sistema inmune. Editorial Médica Panamericana España, 178-187.

Regueiro J y López (2002). Inmunología, Biología y patología del sistema inmune. 3ª edición. Editorial Panamericana España, 168-189.

Rocha Z, Huitron C, Cáceres C, Alvarado M, Valle M, Soto C, Weiss S y Rangel C. Interleukin-2 (IL-2) receptor- $\beta\gamma$  signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Elsevier Cellular signaling* 2004, **16**: 1239-1247.

Rodríguez A, Dueñas R, Ocampo A, Suárez L y Roa N (2006). Caracterización de linfocitos T gingivales y perfil de citocinas en pacientes con periodontitis agresivas. *Memorias del IV congreso de investigaciones odontológicas Colombia*.

Rojas O y Espinoza. Inmunología de memoria. Editorial Médica Panamericana S.A 2001, **34**(56): 134-189.

Roldan P.R (2006). Caracterización de liposomas aniónicos y neutros por resonancia magnética nuclear 31 P. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza UNAM, México.

Romero T, Corzo M, Vitoria M, Vílchez M, Castellano A, Estévez J y González L. Interleucina-10 y quimioprevención retinoide del cáncer de mama experimental. *Gac Méd Caracas* 2001, **9**(1):67-72.

Schaafsma R, Falkenburg F, Landegent E, Duinkerken N, Osanto S, Ralph P, Kaushanky K, Wagemaker G, Damme J, Willemze R y Fibbe W. 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* 1991, **78** (8):1981-1987.

Sheldon J y Riches P. Citocinas inflamatorias. *Cardiovascular risk factors* 1999, **8**(3)165-174.

Shiffman H y Brinton A. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cáncer* 1995, **10**:1888-1901.

Siachoque H, Ibañez M, Chuaire L, García O, Guzman A y Florez L. Determinación de la interleucina 10 (IL10) en pasientes con cancer en estadios III y IV tratados con dexametasona. *Rev Cienc Salud Colombia* 2005, **3**(2): 148-155.

Smith A. Lowest Dose Interleukin-2 Immunotherapy. *Blood* 1993, **81**(6):1414-1423.

Tapia C, Kuri M, Macías M y Martínez M (1999). Mortalidad por cáncer en México. Capítulo 1 en: Meneses García A, Mohar Betancourt A.

Tirado G, Mohar B, López C, García C, Franco M y Borges P. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud pública de México* 2005, **47**(5):342-350.

Valdespino G y Rocha Z. Inmunoterapia mediada por linfocitos T en pacientes con cáncer. *Cirugía y cirujanos* 2003, **71**(3):235-244.

Valle M y Soto C. Vía JAK-STAT: Una visión general. *Vertientes* 2005, **8**(1,2): 14-25.

VanderSpek C, Sutherland J, Ratnarathorn M, Howland K, Ciardelli L, y Murphy R. Interleukin-2 Receptor Binding Domain Mutations. *Biological Chemistry* 1996, **271** (2):12145-1249.

Vella T, Dow S, Potter A, Kappler J y Murrack P. Cytokine-induced survival of activated T cell in vitro and in vivo. *Immunology* 1998, **95**(7):3810-3815.

Vuist W, Visseren M, Otsen, Bos, Vyth-Dreese, Melief y Hekman. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of human peripheral blood lymphocytes with interleukin-2 and interferon  $\alpha$ . *Cancer Immunol Immunother* 1993, **36**:163-170.

Weiss S y Valle M. Molecular Origin of cancer. *Vertientes* 2003, **6**: 3-7.

Woll C. The interferons: their properties and clinical role - an overview. En: Crowther D (ed.): *Interferons: mechanisms of action and role in cancer therapy*. Berlin Springer-Verlag 1991, **3**: 3-12.

Yáñez F, Salazar M, Chaires M, Jiménez H, Márquez R y Ramos R. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y perspectiva* 2002, **21**: 313-319.

Zaino R, Ward S y Delgado G. Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Cáncer* 1992, **69** (7): 1750-1758.