



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

ESTUDIO DE LA PROLIFERACION Y CITOTOXICIDAD DE
LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES
CON CANCER CERVICO UTERINO CONTRA CELULAS DE
TUMOR AUTOLOGO, EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA-2,
INTERFERON- δ Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α .

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

TESIS

que para obtener el título de
Maestra en Biología Experimental

presenta

LETICIA ROCHA ZAVALETA

México, D.F. septiembre 1992.

131905

A Doña Graciela:

Cuya luz infinita sigue alumbrándome.

A mi familia:

Por comprender y apoyar mi afán de superación.

A mis amigos:

Por compartir ese afán.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana cuenta con el apoyo del CONACyT según el convenio PFPN\66\91 por considerársele con nivel de excelencia

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y la asesoría del Dr. Benny Weiss Steider y el Dr. Rubén Darío Martínez Pérez; y forma parte del proyecto: Inmunoterapia Adoptiva para Cáncer Cérvico Uterino, que cuenta con el apoyo del CONACyT (registro D113-903681).

Deseo agradecer a la M. en C. Rosalva Rangel Corona, al Dr. Benny Weiss Steider y al Dr. Rubén Darío Martínez Pérez, ya que gracias a su excelente asesoría, sus brillantes consejos e invaluable enseñanzas me fue posible realizar este trabajo.

Asimismo expreso mi gratitud al cuerpo de profesores de la Maestría en Biología Experimental de la UAM-Iztapalapa por su apoyo constante.

De la misma manera agradezco al equipo de trabajo, del que formo parte, en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer en la ENEP Zaragoza, por su ayuda incondicional. Particularmente deseo agradecer a los Sres. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su asistencia técnica.

Agradezco también al personal médico y del departamento de investigación del Instituto Nacional de Cancerología por las facilidades en la obtención del material biológico empleado en este trabajo.

Manifiesto mi gratitud al CONACyT por el apoyo económico que me brindaron durante la realización de mis estudios.

Especialmente deseo expresar mi infinito agradecimiento al Biól. Diácono R. Vera Hernández por su paciente ayuda en la elaboración, diseño e impresión de esta tesis.

CONTENIDO

pág.

RESUMEN

INTRODUCCION

1

I. CANCER

1

II. CANCER CERVICO UTERINO

1

IIa. Factores de Riesgo y Etiología

2

IIb. Tratamiento del Cáncer Cérvico Uterino

4

III. INMUNOLOGIA TUMORAL

5

IV. DEFENSA NATURAL CONTRA EL CANCER

6

IVa. Moduladores Biológicos

12

-INTERLEUCINA-2

12

-INTERFERON- γ

14

-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α

15

V. INMUNOTERAPIA ADOPTIVA

16

Va. Resultados de la aplicación de la
Inmunoterapia Adoptiva (IA)

18

Vb. Alternativas para la IA

19

-COMBINACION DE MODULADORES BIOLOGICOS

19

-CULTIVO DE CELULAS EFECTORAS A LARGO PLAZO

21

-POBLACIONES DE LINFOCITOS CD4 Y CD8

22

HIPOTESIS DE TRABAJO

25

OBJETIVOS

26

METODO

27

RESULTADOS

32

DISCUSION

54

CONCLUSIONES

59

BIBLIOGRAFIA

60

APENDICES

75

RESUMEN

En México el Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) es el de mayor incidencia entre la población femenina. Los tratamientos aplicados son la cirugía, que es exitosa sólo en casos poco avanzados, la radioterapia y la quimioterapia, que son la única alternativa para las neoplasias más desarrolladas y son inespecíficas y sumamente agresivas, produciendo trastornos colaterales y en la mayoría de los casos no curan la neoplasia. Ante esto resulta clara la necesidad de desarrollar terapias más eficaces.

La Inmunoterapia Adoptiva se levanta como una alternativa lógica que se basa en la potencialidad natural del sistema inmune para eliminar células transformadas. En esta técnica se pretende la multiplicación y activación de poblaciones de linfocitos de sangre periférica (LSP) en co-cultivos *in vitro* con células de tumor autólogo, en presencia de factores mitogénicos y activadores naturales como la Interleucina-2 (IL-2), para la generación de clones de células citotóxico-específicas, que posteriormente puedan ser inoculadas en presencia de IL-2 en el paciente para desencadenar un ataque inmune dirigido contra las masas tumorales.

La aplicación de la Inmunoterapia en modelos animales ha tenido éxito, no así en humanos donde solo se han observado algunas regresiones parciales y muy pocas curaciones totales. Además las dosis de IL-2 aplicadas han sido elevadas y resultan tóxicas para los pacientes. Sin embargo, esta concentración puede ser disminuida sin alterar la respuesta proliferativa y citotóxica de LSP por medio de la adición de Interferón- γ (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), que presentan un efecto sinérgico con la IL-2.

Por lo tanto, en el presente trabajo se realizaron co-cultivos de LSP con células tumorales autólogas de pacientes con CaCu, en presencia de IL-2, IFN- γ y TNF- α en concentraciones diez veces menores a las reportadas para cada factor en forma individual, con la finalidad de inducir la proliferación de los LSP. Los co-cultivos se prolongaron por un período de veinte días con miras a obtener poblaciones de linfocitos T citotóxicos de

Resumen

memoria capaces de reconocer solamente a los antígenos de las células tumorales con las que fueron co-cultivados.

Los resultados obtenidos mostraron la posibilidad de una mayor inducción a la proliferación de LSP de pacientes con CaCu mediante el empleo de la combinación de IL-2, IFN- γ y TNF- α en bajas concentraciones que con solo IL-2, asimismo se demostró que los LSP obtenidos bajo estas condiciones de cultivo son reactivos contra las células del tumor autólogo, observándose una citotoxicidad del 100% en una relación mínima de 10 LSP por cada célula tumoral. Un dato muy importante es la especificidad que los LSP obtenidos poseen, ya que no lisan células de cérvix normal ni células sanas de la propia paciente (en este último caso células sanguíneas).

Estos resultados nos permiten concluir la gran importancia que reviste este estudio dada la posibilidad de aplicación de las innovaciones hechas a la Inmunoterapia tradicional, mediante la generación de células citotóxicas específicas contra células neoplásicas, para eliminar algunos de los obstáculos que han impedido su éxito total en la terapia del cáncer.

INTRODUCCION

I. CANCER.

Nuestra sociedad es el marco perfecto para que una enfermedad como el cáncer, matizada por el misterio y el dolor, se desarrolle, ya que el avance tecnológico y el estilo de vida que la caracterizan proveen de todos los factores involucrados con los padecimientos neoplásicos. En los siglos XVIII y XIX se reportaba que existía relación entre la aparición de tumores de algunos tipos específicos de cáncer y las condiciones de trabajo (1,2). Estas observaciones han sido comprobadas por estudios epidemiológicos (3-6) y el uso de modelos animales para detectar carcinógenos químicos (7-10). De esta manera se han determinado un gran número de sustancias arrojadas al ambiente por la industria química (11), y otras empleadas en la elaboración de alimentos con gran potencia cancerígena (12-14).

En 1950 se reportó por primera vez que el cáncer bronquial y de pulmón estaban asociados al consumo de cigarrillos (15) y más recientemente se han encontrado evidencias de que los fumadores pasivos (aquellos que inhalan el humo de cigarrillo producido por otros individuos) pueden padecer cáncer de pulmón, aunque en menor proporción que los fumadores (16,17).

El cáncer es una enfermedad multifactorial, ya que además de los factores inductores ya descritos se le ha encontrado relación con el consumo prolongado de anticonceptivos orales, con determinados tipos de virus y, gracias al descubrimiento de los oncogenes, con factores genéticos (18).

II. CANCER CERVICO UTERINO

Un tipo de cáncer que está asociado con una etiología viral es el Cáncer Cérico Uterino (CaCu). Este es el de mayor incidencia en nuestro país, ocupando el primer lugar como causa de muerte entre las enfermedades neoplásicas de la mujer (19).

Los tumores del cérvix se desarrollan de manera gradual a partir de precursores preinvasivos, que en un estado *in situ* reversible pueden existir por varios años siendo completamente asintomáticos. Las anormalidades tempranas del cérvix, conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se diagnostican comúnmente en mujeres que fluctúan entre los 30 y 40 años de edad. Para que un NIC evolucione a un CaCu invasor necesita de 8 a 20 años (20), y en la mayoría de los casos se requieren de 5 a 10 años para que las células transformadas penetren la membrana basal del cérvix e invadan otros tejidos. Una vez ocurrido este fenómeno las pacientes que no han recibido tratamiento, o que no han respondido a éste, mueren usualmente en un período de 3 a 5 años (21).

La etapa terminal del CaCu se caracteriza por la invasión a otros órganos y el consecuente bloqueo de su función. Es conocido que los carcinomas tienen una gran capacidad para diseminarse inicialmente por ocupación de los nódulos linfáticos, en los cuales se observa una reacción hiperplásica, lo cual sugiere una respuesta del enfermo contra las células tumorales o contra sus productos, misma que generalmente no resulta suficiente para detener el avance de los tumores (22).

IIa. FACTORES DE RIESGO Y ETIOLOGIA.

La etiología del CaCu es aún desconocida, sin embargo se le ha asociado con una serie de factores causales que van desde el comportamiento sexual hasta la presencia de ciertos tipos de Virus del Papiloma Humano (VPH).

Algunos experimentos han mostrado la presencia de algunos componentes del cigarro en la mucosa cervical (23). Dichos estudios sugieren que podría existir alguna relación entre el desarrollo de CaCu y el tabaquismo, ya sea directo o pasivo (24).

Se ha encontrado también que entre las mujeres que han consumido anticonceptivos orales por largos períodos existe una mayor tendencia a generar CaCu (25,26). Sin embargo, estudios más amplios han permitido comprobar que los anticonceptivos orales pueden actuar como un co-carcinógeno en conjunción con agentes infecciosos (27).

El inicio de una vida sexual activa a temprana edad, la multiparidad y el número elevado de compañeros sexuales son factores de alto riesgo para el desarrollo de CaCu dado que aumentan la probabilidad de que se adquieran infecciones genitales (28). Entre éstas quizá la de mayor peligrosidad es la causada por el VPH.

Los VPH son una familia de virus con DNA los cuales inducen tumores epiteliales y fibroepiteliales de la piel o mucosa en vertebrados. Estos tumores, conocidos con el nombre de papilomas, son generalmente benignos, muestran un crecimiento limitado y frecuentemente sufren una regresión espontánea (29,30). Sin embargo, algunos miembros de la familia de los VPH inducen tumores que pueden evolucionar hacia carcinomas malignos, usualmente después de un largo período de latencia.

Los VPH comparten la característica de ser exclusivamente epiteliotrópicos, pero el rango de epitelios susceptibles, así como el tipo de lesión causada difiere entre los tipos de virus. Por ejemplo el VPH tipo 1 (VPH 1) es responsable de los papilomas plantares, mientras que el VPH 6 es el causante de lesiones benignas de laringe y mucosa anogenital (31,32).

El reconocimiento del potencial oncogénico de los VPH ha provocado un creciente interés, y el hecho de que el DNA y RNA virales persistan en algunos carcinomas hace sospechar que éstos juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del estado maligno de las células infectadas.

La primera asociación de un VPH con un cáncer humano fue reportada en pacientes con epidermodisplasia verruciforme, algunos de los cuales mostraron ser altamente susceptibles a cánceres cutáneos (33,34). Recientemente los VPH tipos 16, 18 y 33 han sido catalogados como los agentes causales de los cánceres genitales, y sus ácidos nucleicos han sido detectados en un 90% de las biopsias de estos tipos de cáncer (35,36). En el caso de los VPH oncogénicos se han encontrado secuencias especiales de DNA viral integradas en el genoma celular, mientras que los DNA virales de los tipos no malignos persisten en un estado episomal (37).

Por otra parte, un gran número de estudios epidemiológicos, clínicos, patológicos y moleculares hechos durante este siglo indican que el CaCu podría ser una enfermedad producida por transmisión sexual, y que el VPH puede ser el agente sexualmente transmitido (38-40).

Quizá cada uno de los factores hasta aquí mencionados toma parte en la transformación maligna de las células cervicales humanas, aunque es claro que los VPHs tipos 16 y 18, son los agentes de más alto riesgo para el desarrollo del CaCu (41). Su presencia en los tumores, sin embargo, podría transformarse en un elemento favorable cuando pensamos en la posibilidad de implementar terapias inmunológicas, ya que éstas técnicas pueden ser más efectivas cuando existe un material antigénico potente, que en este caso sería el antígeno viral expresado en la membrana de las células tumorales.

Iib. TRATAMIENTO DEL CaCu.

El tratamiento que se da a las pacientes con CaCu en los hospitales de nuestro país depende del estadio de desarrollo del tumor. La primer alternativa es la cirugía, ésta se aplica cuando se presenta un tumor *in situ*, que no ha tocado las paredes pélvicas. Cuando la masa tumoral ha invadido áreas que no pueden ser intervenidas quirúrgicamente, o cuando se presenta metástasis las opciones terapéuticas son la radioterapia y la quimioterapia.

La radioterapia se ha venido desarrollando desde los primeros años de nuestro siglo (42). Hoy en día se aplica con buenos resultados en los estadios clínicos tempranos. Existen actualmente dos modalidades de radioterapia, la primera es la exposición a radiaciones externas, dirigidas estratégicamente hacia la zona ocupada por la neoplasia, producidas por una bomba de cobalto. La segunda es la braquiterapia, (radiaciones producidas *in situ*), donde se aplica Radium o Cesium intracavitario (43).

Los dos tipos de radiaciones son aplicados de manera combinada para la obtención de mejores resultados. En la mayoría de los casos la radioterapia se usa para reducir el tamaño de la masa tumoral, así como para eliminar las células que hayan sufrido transformación en las áreas aledañas (44).

La quimioterapia está basada en la aplicación de fármacos con efecto antineoplásico, su nivel de acción es muy amplio, y va desde el bloqueo del proceso mitótico hasta la inhibición de la función ribosomal. Generalmente los candidatos que son sometidos a quimioterapia tienen un CaCu avanzado, un carcinoma recurrente después de cirugía o radiación, o presentan metástasis pélvicas y en nódulos periaórticos, condiciones que podrían limitar la potencialidad del éxito con otros tipos de tratamiento.

Estas terapias comparten dos características esenciales: no actúan de manera específica sobre las células del tumor y, dada su agresividad, producen efectos colaterales indeseables que provocan un agravamiento del estado general de los pacientes y disminuyen notablemente su calidad de vida. Otro factor importante es que los éxitos clínicos obtenidos con su aplicación disminuyen al aumentar el desarrollo de la enfermedad, lo cual deja sin esperanzas a las personas a quienes se les diagnostica un cáncer avanzado.

Por estas razones resulta urgente el desarrollo de nuevas alternativas por medio de las cuales sea posible ofrecer una esperanza de vida a los pacientes oncológicos. Para hacer esto posible es necesario complementar la terapia médica tradicional con los conocimientos de disciplinas como la Inmunología, que permiten emplear uno de los más importantes procesos que se genera

en los organismos vivos, que es la defensa natural en contra de células transformadas.

III. INMUNOLOGIA TUMORAL.

La transformación maligna es un proceso complicado y hasta la fecha no ha podido ser comprendido en su totalidad. Algunos de los cambios más importantes en las células cancerosas ocurren a nivel de su membrana, ésto les confiere características de inmunogenicidad que las células normales no poseen y que permite que el sistema inmune las detecte y destruya. No todos los tipos de tumores presentan un mismo grado de inmunogenicidad, y ésto depende del tipo de neoantígenos (aquellos que se expresan como una consecuencia del fenómeno de transformación) relacionados con el tumor (45-50).

Se sabe por ejemplo que los tumores que surgen de manera espontánea en ratones tienden a ser menos inmunogénicos que aquellos que son resultado de una inducción, ya sea por acción viral o por la exposición deliberada a agentes carcinógenos (51-54). Estas observaciones han llevado a la consideración de que algunos cánceres humanos, los cuales poseen una fuerte relación con virus, como es el caso del CaCu, pueden ser fuertemente inmunogénicos, razón por la cual son mantenidos bajo control por el sistema inmune y requieren de muchos años para desarrollarse y llegar a invadir órganos lejanos (55).

Existen diferentes tipos de antígenos asociados a los tumores. Algunos de ellos son expresados también en células normales durante períodos específicos de su proceso de diferenciación, por lo que son conocidos como marcadores de diferenciación (56). Así es posible encontrar en algunos tumores antígenos que solo son detectables en células embrionarias y fetales. Estas peculiaridades en las células cancerosas llevaron a pensar que la malignización era un proceso que llevaba a una "retrodiferenciación" celular (57). Sin embargo este término no es del todo correcto, ya que se ha determinado que un fenómeno involucrado con estos cambios es la represión y activación de genes encargados en la síntesis y expresión de dichas proteínas, por lo tanto no existiría un fenómeno de desdiferenciación propiamente dicho (58).

Los tumores que son inducidos experimentalmente por la acción de virus con DNA, por ejemplo el SV40 o el virus del poliovirus, codifican proteínas funcionalmente similares a las normales pero antigénicamente distintas. Esto provoca que sean reconocidas, dentro del contexto de las moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), por los linfocitos T citotóxicos (59). Así mismo todos los tumores inducidos por virus con RNA

expresan antígenos virales sobre la superficie de su membrana y, al igual que los producidos por virus con DNA, son reconocidos por células T (60).

Las características de inmunogenicidad que algunos tumores presentan hacen posible la aplicación de técnicas basadas en la capacidad demostrada que los linfocitos T citotóxicos poseen para su reconocimiento y eliminación. Sin embargo, es necesario conocer cuales son los mecanismos de defensa que este tipo de células inmunocompetentes desarrollan para ejercer su efecto, y así, poder hacer uso de ellos en el tratamiento de los cánceres inmunogénicos.

IV. DEFENSA NATURAL CONTRA EL CANCER.

Estamos continuamente sometidos a los agentes causales del cáncer, sin embargo parece ser que nuestro sistema inmune es capaz de protegernos ya que las células que sufren, en consecuencia, alguna transformación maligna pueden ser eliminadas eficazmente. Por lo tanto el desarrollo del cáncer podría estar relacionado con alguna falla, de tipo aún no determinado, en el sistema inmune.

La inmunidad celular y humoral contra tumores se considera es mediada por cuatro tipos de células inmunocompetentes, los linfocitos B-célula plasmática, los fagocitos mononucleares, las células asesinas naturales (NK del Inglés: Natural Killer) y los linfocitos T (Figura 1). Las células plasmáticas secretan factores proteínicos, conocidos como Inmunoglobulinas (Ig), en el plasma sanguíneo que son capaces de identificar y unirse a los marcadores moleculares específicos de las células blanco para que éstas puedan ser reconocidas. Una vez que las células se han unido a las Igs su lisis puede ser mediada por dos procesos, el sistema del complemento (que es un sistema de amplificación de la inmunidad humoral) o por mecanismos de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC del Inglés: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) (61).

El sistema del complemento está formado por una serie de proteínas, que en situaciones normales, se encuentran en forma inactiva circulando en el plasma sanguíneo. Cuando se encuentran con una célula blanco, una tumoral por ejemplo, cubierta por Igs (IgM o IgG), el complemento se une a la Ig para ensamblarse y activarse. Las proteínas del complemento son producidas por fagocitos mononucleares (61) y por lifocitos.

Existen una serie de evidencias que muestran que los monocitos juegan un papel importante en la resistencia al desarrollo de algunos tumores experimentales (62,63). Los macrófagos son capaces de mostrar un efecto citotóxico, o citostático sobre una amplia variedad de células tumorales blanco

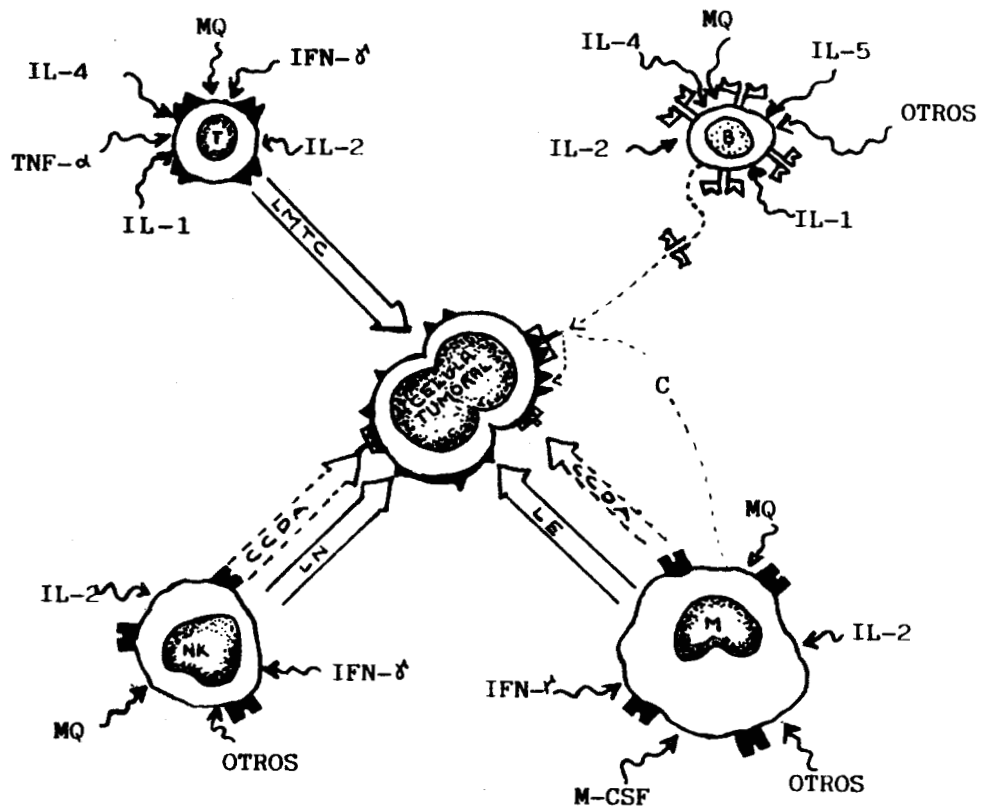


Figura 1. Representación de los mecanismos de acción que los linfocitos T y B, las células NK y los fagocitos mononucleares pueden desarrollar para la eliminación de células tumorales.

L-1	Interleucina 1	■	Receptor para Fc
L-2	Interleucina 2	▲	Receptor Antígeno Específico
L-4	Interleucina 4	■	Inmunoglobulina
L-5	Interleucina 5	▲	Antígenos Asociados al Tumor
FN-	Interferon gamma	LE	Lisis Espontánea
NF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa	T	Linfocito T
-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos	B	Linfocito B-Célula Plasmática
Q	Moduladores Químicos de la Función Inmune	C	Sistema del Complemento
CDA	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos	NK	Célula NK
MCT	Lisis Mediada por Células T	M	Fagocito Mononuclear
N	Lisis Natural		

en modelos *in vitro* (64-66). Se han realizado también experimentos *in vivo* con ratones a los que se les administran agentes antimacrofágicos, lo que trajo como consecuencia la inhibición de su resistencia natural a tumores (67,68).

Parece razonable pensar que uno de los mecanismos de defensa en contra de células transformadas requiere de la interacción específica entre los antígenos del tumor y los linfocitos del hospedero, lo cual involucra el procesamiento y presentación de dichos antígenos por parte de los macrófagos. Esto explicaría lo esencial de su presencia para el montaje de esta respuesta *in vivo*. Sin embargo, los trabajos realizados *in vitro* parecen demostrar que también puede ocurrir una destrucción de células tumorales por la citotoxicidad no específica generada en los macrófagos.

Esta capacidad antitumoral observada en los macrófagos provocó el desarrollo de trabajos experimentales tendientes a la búsqueda de su aplicación terapéutica. De estos trabajos se han desprendido datos importantes, como la posible existencia de un factor inhibidor de la actividad citostática y citotóxica de macrófagos secretado por las masas tumorales. Se ha pensado que el efecto antitumoral de este tipo celular se desarrolla sólo en las etapas iniciales de la transformación maligna, viéndose posteriormente inhibido por la secreción del factor inhibidor mencionado (69).

Los otros dos tipos de células involucradas en la respuesta contra tumores, los linfocitos T y las NK (Figura 2), han sido las de mayor uso en inmunoterapia. Los linfocitos T, al igual que los linfocitos B efectúan sus funciones al través de la formación de clonas, pero al contrario de estos últimos no se producen proteínas que sean transportadas por el torrente sanguíneo para mediar la lisis, sino que ellas mismas viajan por la sangre hasta el sitio de la invasión y de manera local eliminan a las células malignas (61).

Los linfocitos T poseen receptores antígeno específicos, y cada clona de linfocito T tiene la capacidad de reconocer, y potencialmente destruir, una célula tumoral que lleve consigo un marcador molecular complementario, ésto es, un antígeno asociado al tumor. Se han realizado cálculos acerca del número posible de clonas de linfocitos T que un ser humano puede generar, y se ha llegado a la conclusión de que el rango de clonas es suficientemente grande como para eliminar a la gran mayoría de las células tumorales que se puedan presentar durante la vida del individuo (70).

La actividad lítica mediada por linfocitos T está restringida por las moléculas del CMH. De tal forma que el linfocito T requiere de la identificación entre las moléculas del CMH que se

encuentran en la membrana de la células transformadas y los receptores específicos, que para estas moléculas, se encuentran presentes en su superficie membranal (Figura 3). La respuesta de los linfocitos T puede ser modulada por varios factores. Entre los más importantes se encuentran los moduladores biológicos, como la Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interferón- γ (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α : del Inglés, Tumour Necrosis Factor).

Las NK son células capaces de destruir un amplio rango de tumores humanos. Una de sus características es la de presentar gránulos en su citoplasma, por lo cual han sido catalogadas por algunos investigadores como linfocitos granulares grandes, sin embargo aún resulta imposible encerrar a las células NK dentro de un grupo definido, ya que además presentan marcadores análogos a linfocitos T y a monocitos (71,72).

Las células NK ejercen su acción lítica por medio de dos mecanismos. El primero es la ADCC, la cual ocurre cuando algunos receptores membranales específicos en la superficie de la NK, conocidos como receptores para Fc, enlazan a la porción terminal (Fc) de las moléculas de IgG, las cuales se encuentran unidas a los antígenos asociados al tumor. Las moléculas de IgG funcionan entonces como un ligando entre la célula tumoral y la NK, provocando que la actividad lítica de esta última se lleve a cabo (61).

De manera alternativa la NK puede desarrollar un efecto lítico independiente de la presencia de anticuerpos que es conocido como muerte o lisis natural. El marcador celular que permite el desarrollo de dicho proceso, no ha sido determinado con exactitud, sin embargo parece tratarse de un gangliósido (un glicolípido específico) que es expresado por la mayoría de las células transformadas (61).

La actividad de las células NK puede ser regulada por varios moduladores biológicos, en especial por el IFN- γ y la IL-2. Cuando las células NK son cultivadas *in vitro* en presencia de IL-2 se puede generar una población con capacidad lítica inespecífica conocida como células LAK (del Inglés: Lymphokine Activated Killer cells), las cuales han sido empleadas ampliamente en ensayos clínicos de inmunoterapia con relativo éxito.

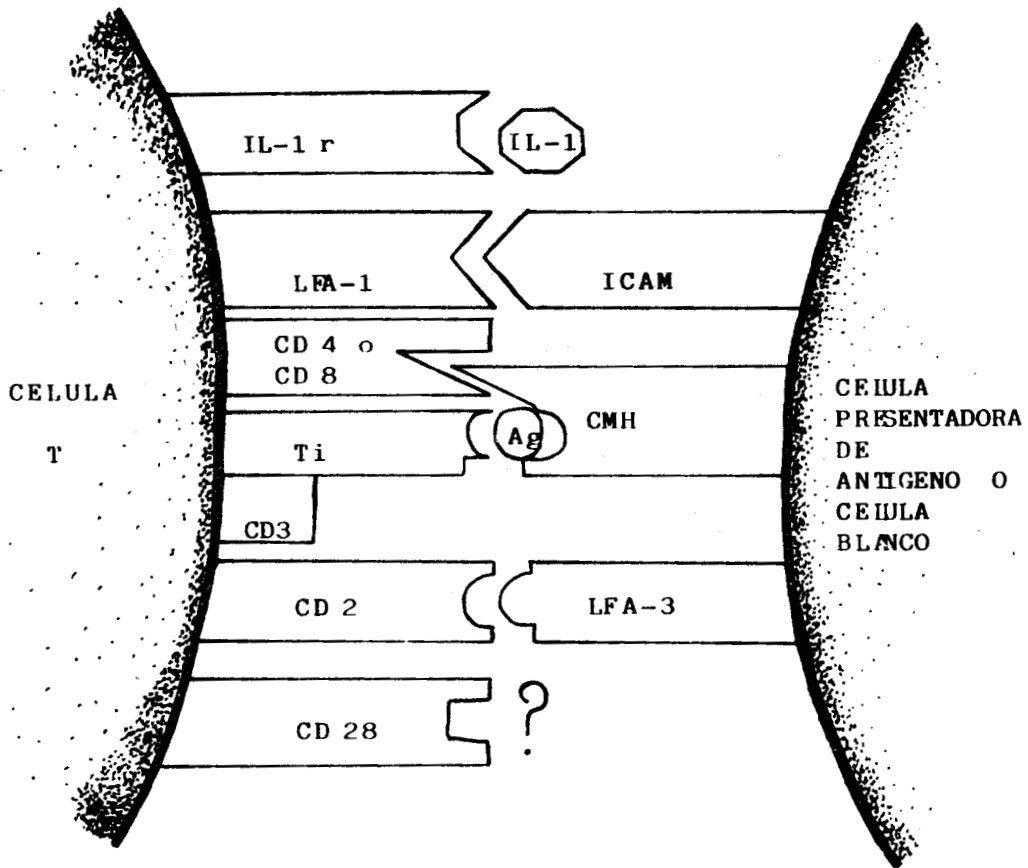


Figura 3. Representación esquemática de las uniones que se establecen entre ligandos y receptores durante la interacción de una célula T y una célula presentadora de antígeno o una célula blanco.

IV a. MODULADORES BIOLÓGICOS.**INTERLEUCINA-2.**

La IL-2 fue descubierta en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de sangre periférica estimulados con mitógenos específicos de linfocitos T. Se observó que esta molécula era capaz de inducir la proliferación *in vitro* de linfocitos T por lo cual fue nombrada como Factor de Crecimiento de Células T. Así mismo se encontró que tenía efecto mitogénico sobre timocitos y que aumentaba la lisis de células blanco mediada por linfocitos, por lo que también fue conocida como Factor Mitogénico de Timocitos y como Factor Cooperador de Lisis (73).

La IL-2 humana es una proteína de 133 aminoácidos, con un peso molecular de 15.4 KD (74). La síntesis de RNAm para IL-2 y su subsecuente secreción es inducida por mitógenos como la concanavalina A y la fitohemaglutinina. La estimulación con antígenos requiere de su presentación conjunta con las moléculas tipo II del CMH por las células accesorias. La secreción de IL-2 provocada por estos estímulos puede ser medida después de 4-6 horas en los sobrenadantes de cultivos *in vitro* de linfocitos T. La producción de IL-2 puede ser inhibida por acción de agentes inmunosupresores, como la ciclosporina (75,76).

La IL-2 ejerce efectos importantes sobre los linfocitos T (77). Tanto los linfocitos periféricos como los timocitos medulares presentan receptores para la IL-2, sin importar si son CD4 o CD8. Así mismo es posible encontrar esta clase de receptores en células inmaduras del timo cuyo fenotipo es CD4, CD8 (78,79) y que a pesar de ser inmunoincompetentes son capaces de proliferar en presencia de IL-2 (80).

La importancia biológica de la IL-2 se centra principalmente en su actividad como mitógeno y activador de linfocitos T (Figura 4). La presencia de un antígeno desencadena una respuesta que inicia con la presentación del antígeno por las células accesorias (macrófagos o células dendríticas) a los linfocitos T cooperadores, éstos responden al estímulo inducido por IL-1 (81), la cual en presencia de las moléculas de la clase II del CMH inducen la producción de IL-2 por éstas células linfoides, la expresión de receptores para IL-2 con la subsecuente proliferación (82).

Además de su actividad proliferativa, la IL-2 es capaz de inducir en cultivos *in vitro* de linfocitos la producción de linfoquinas como el Factor de Crecimiento de Células B (83), Factor Diferenciador de Células B (84), Interferón- γ (85), la propia IL-2 (86) y probablemente otras.

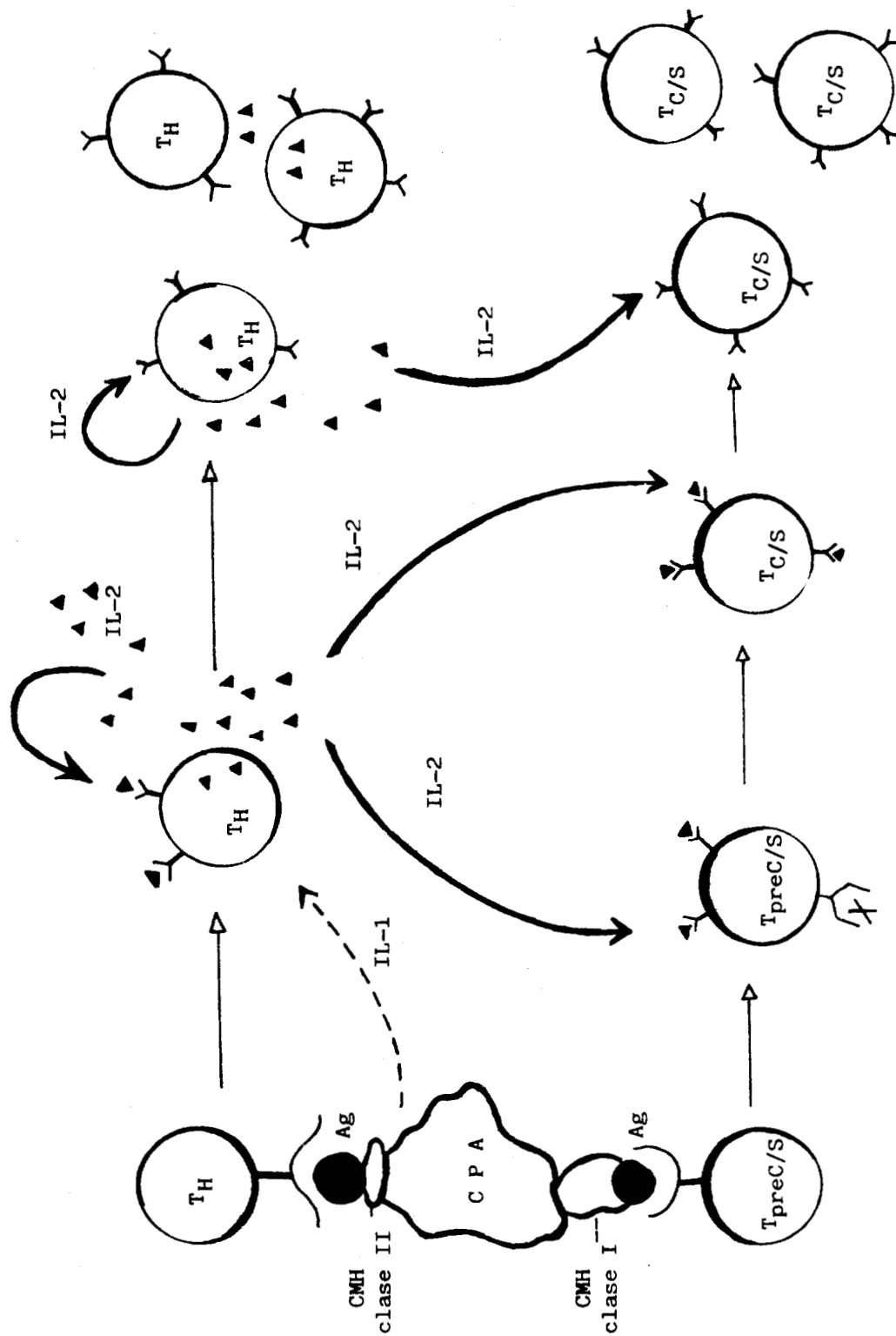


Figura 4. La Interleucina 2 (IL-2) y los linfocitos T. La estimulación de las células T por un antígeno (Ag) procesado y presentado por una célula presentadora de antígenos (CPA) resulta en la producción de IL-2 por los linfocitos T cooperadores (TH), la diferenciación de precursores de linfocitos T citotóxico/supresores (T_{prec/S}) en células efectoras (T_{c/S}), y la proliferación de todas las células T.

La molécula de IL-2 humana recombinante posee acción biológica sobre células humanas, murinas y de primates. Las aplicaciones más relevantes que se han hecho de la IL-2 son, en la inmunoterapia adoptiva para el cáncer, para el aumento de los niveles de IL-2 en inmunodeficiencias humanas, y en la creación de proteínas quiméricas para la destrucción de células blanco que presentan receptores para IL-2.

INTERFERON- γ .

Los interferones son una familia de proteínas con amplia gama de actividades sobre diferentes tipos celulares. Una de sus propiedades más prominentes, y por la cual fueron descubiertos (87) es su capacidad antiviral. En la actualidad se conocen dos tipos de IFN, los IFN_s tipo I: el IFN- α y el IFN- β ; los de tipo II son conocidos como IFN- γ . El primer tipo es producido por fibroblastos y macrófagos, y el segundo por macrófagos y linfocitos T activados por la acción de antígenos, mitógenos y enterotoxinas (88).

Los IFNs ejercen su efecto a través de receptores específicos en las membranas celulares. Existe un receptor común para IFN- α y - β y uno diferente para IFN- γ (89). Muchos son los tipos celulares que presentan receptores para IFN- γ , algunos de ellos son las células mielomonocíticas, linfoides, cebadas, endoteliales, fibroblastos, neuronales y melanocitos.

El IFN- γ humano es una molécula que, en su estado monomérico, tiene un peso molecular de 17.15 kD y está involucrada con el control fisiológico del crecimiento celular. Se ha postulado un modelo autócrino en el cual la célula proliferante secreta niveles bajos de IFN- γ , que actúa como un regulador negativo de la proliferación (90). Por otro lado se ha observado también que el IFN- γ interviene en la diferenciación de células hematopoyéticas, así como en la activación de células maduras de la sangre, como lo son los macrófagos (91).

Los efectos antitumorales mediados por el IFN- γ son muy complejos y no han sido entendidos en su totalidad (92). Sin embargo, existe uno que ha sido demostrado plenamente. Muchos tipos tumorales carecen de la expresión de antígenos de la clase I del CMH, razón por la cual dichas células pueden escapar a la vigilancia inmunológica, ya que el reconocimiento por linfocitos T se ve fuertemente limitado. El IFN- γ induce la actividad génica involucrada con la expresión de estas proteínas y, por lo tanto, restaura la respuesta normal mediada por linfocitos T. Se sabe que éste es un efecto directo de dicha molécula sobre el proceso de regresión tumoral (93).

El IFN- γ recombinante humano es especie-específico y dadas sus capacidades antivirales e inductoras a la defensa inmune contra tumores malignos, ha sido empleado en una gran cantidad de ensayos clínicos. Ha sido efectivo en el tratamiento de la leucemia de células "peludas", y ha sido empleado para tratar algunos tipos de cáncer, como el colorectal y de riñón, en combinación con agentes quimioterapéuticos, radiaciones y otras citocinas (93).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF) fue descrito primeramente como una molécula que produce necrosis en una amplia variedad de tumores cultivados *in vitro*. El TNF- α es un polipéptido de 157 aminoácidos con un peso de 17 KD. Es producido por linfocitos T y macrófagos activados. El gene que codifica para esta proteína ha sido conservado fuertemente en los mamíferos, probablemente porque tiene relación con importantes mecanismos de defensa contra infecciones microbianas, como un mediador del proceso inflamatorio y como un regulador de la homeostasis de los tejidos. Sin embargo cuando esta poderosa molécula es producida en grandes cantidades es capaz de causar daños severos al organismo, induciendo un estado conocido como caquéxico, que se caracteriza por la presencia de anorexia, pérdida de peso y anemia (94).

La tecnología para la obtención de moléculas recombinantes ha permitido obtener TNF- α puro y realizar experimentos por medio de los cuales se ha determinado que esta proteína es un importante mediador en una gran variedad de respuestas biológicas, que incluyen la citostásis y la citotoxicidad contra células tumorales (95-98).

Las actividades citostáticas y citolíticas del TNF- α sobre algunas células malignas *in vitro* lo hacen un excelente candidato para ser aplicado en terapias contra enfermedades neoplásicas. La experiencia ha demostrado que en los ensayos clínicos realizados la administración de TNF- α presenta una respuesta positiva baja (99-102). Esta limitación en su eficacia como agente antineoplásico indica que existen células tumorales resistentes a sus efectos (103).

A pesar de lo anterior el TNF- α aún se considera como un factor importante en el desarrollo de la inmunoterapia, ya que gracias a recientes estudios, se ha demostrado que tiene una importante participación en la inducción de la expresión de moléculas de la clase I del CMH en células de origen maligno que no las presentaban.

El conjunto de conocimientos que giran alrededor de las actividades de los moduladores biológicos revisten una gran importancia desde el punto de vista de su aplicación clínica. Mientras más amplio y claro sea nuestro entendimiento en esta compleja área mayores serán nuestras posibilidades de desarrollar una técnica que, haciendo uso de los mecanismos de defensa natural, permita la cura de enfermedades que no han podido ser aliviadas por otros métodos. Este es el caso del cáncer ya que a través de la inmunoterapia, que tomada como una alternativa terapéutica, aún en sus primeras etapas, parece ofrecer una mejor esperanza de vida a quienes lo padecen.

V. INMUNOTERAPIA ADOPTIVA .

Durante la década pasada se han llevado a cabo muchos intentos por dar remedio a las enfermedades de origen neoplásico (104-108). Uno de los que presenta mayores perspectivas de éxito es el que tiene como base los conocimientos acerca del funcionamiento de la respuesta natural en contra de células tumorales.

El sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar los agentes infecciosos que puedan dañar al organismo, como virus, bacterias y hongos. Existen evidencias de que las células que han sufrido una transformación maligna no sólo se comportan como invasores extraños, sino que además presentan marcadores químicos de transformación y antígenos tumorales, los cuales permiten que estas células sean reconocidas por el sistema inmune, y consecuentemente destruidas. Estos conocimientos han sido enfocados para el desarrollo de una nueva generación de bioterapias contra el cáncer, técnicas inmunoterapéuticas diseñadas para regular las funciones del sistema inmune humano, dirigiéndolo hacia la destrucción de las células malignas.

Desde una perspectiva funcional, las bioterapias que han sido aplicadas son tres (Figura 5). La primera involucra la manipulación *ex vivo* del plasma de pacientes con cáncer, con el objetivo de remover factores que pudieran bloquear la respuesta inmune, o bien de adicionar sustancias tumoricidas antes de la reinfusión del plasma (109,110).

Otro tipo de bioterapia es aquella en la que pacientes con cáncer son tratados mediante la administración de moduladores biológicos, los cuales pueden estimular de manera directa su sistema inmune. Algunos de los productos usados son los Interferones, Interleucinas, Factores Estimuladores de Colonias (CSF), anticuerpos monoclonales y algunos otros factores inmunopotenciadores como los muramilpéptidos y *Corynebacterium parvum* (111,112).

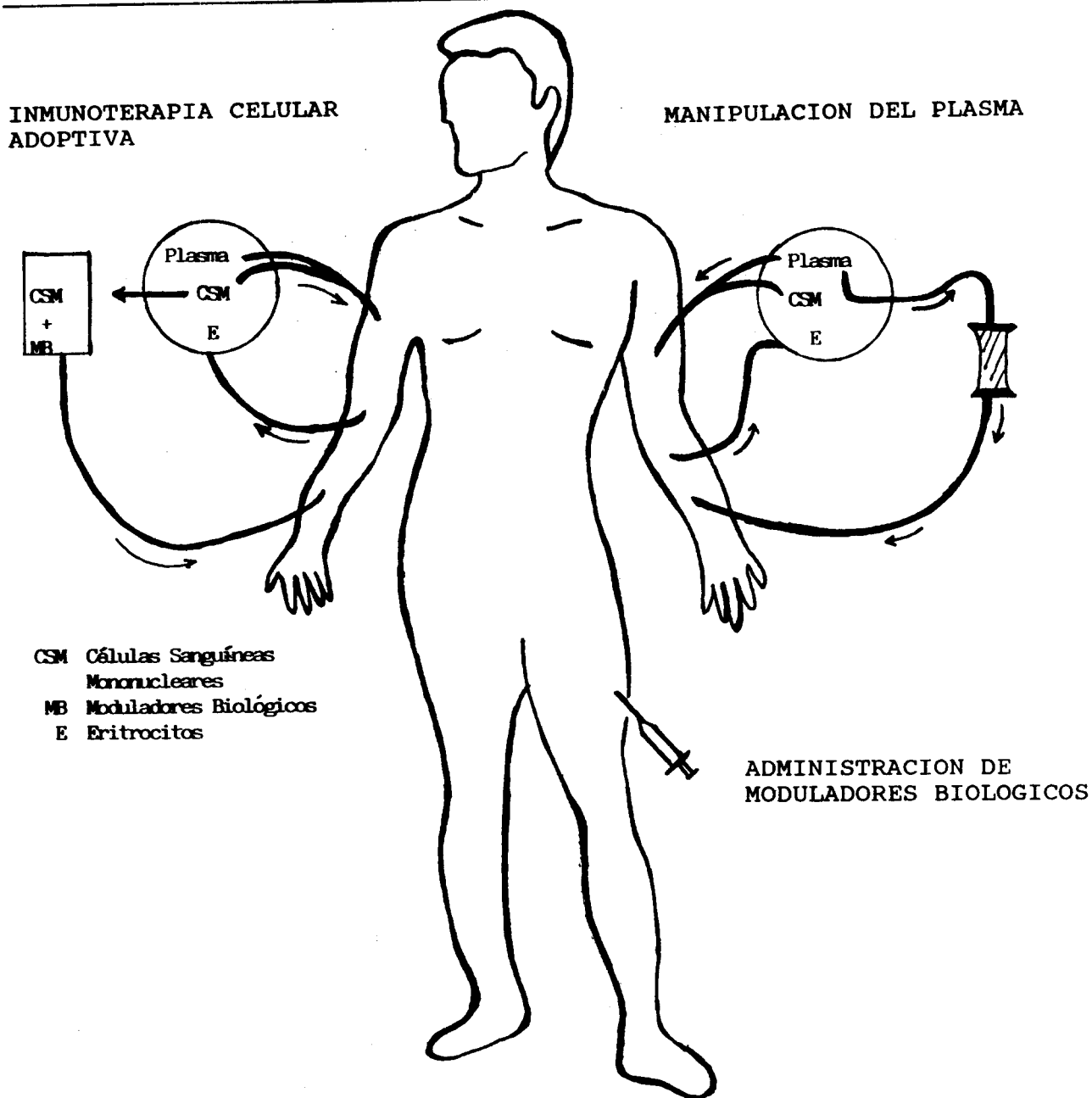


Figura 5. Tipos de Bioterapia contra el cáncer. (a) La Inmunoterapia Celular Adoptiva involucra la manipulación ex vivo de las células sanguíneas mononucleares (CSM) con el fin de incrementar su capacidad tumoricida; (b) la manipulación ex vivo del plasma de los pacientes se realiza, ya sea para remover factores inhibidores de la respuesta inmune o para adicionar factores tumoricidas; (c) la administración in vivo de moduladores biológicos puede llevarse a cabo por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea.

El tercer tipo de bioterapia está enfocada a la activación *ex vivo* de leucocitos de pacientes con cáncer por medio de moduladores biológicos, en un intento por aumentar tanto su número como su capacidad antitumoral. Esta ha sido llamada Inmunoterapia Celular Adoptiva (IA). La IA se inicia usualmente por un proceso de citoféresis y la posterior separación de las células blancas del plasma y los eritrocitos. Alternativamente los leucocitos son aislados directamente del tumor, a éstos se les conoce como Linfocitos Infiltrantes del Tumor (TIL). Los leucocitos extraídos sufren un procesamiento que incluye su incubación con moduladores biológicos, para aumentar sus capacidades tumorocidas. Una vez activados, los leucocitos son reinfundidos al paciente con la finalidad de desarrollar un ataque específico dirigido contra las masas tumorales.

Los diseños generales para los ensayos de IA incluyen pacientes con cáncer metastásico que no han respondido a las terapias comunes, o que nunca las han recibido. Otros criterios tomados en cuenta son la capacidad de tener un adecuado acceso venoso; la ausencia de infecciones importantes en hígado, pulmón o riñones y de enfermedades cardiovasculares; no haber recibido radio o quimioterapia por lo menos durante las cuatro semanas anteriores; tener una cuenta normal de leucocitos y no sufrir enfermedades del sistema nervioso.

Va. RESULTADOS DE LA APLICACION DE LA IA.

De los tres tipos de bioterapia descritos son dos los que con mayor frecuencia han sido aplicados en ensayos clínicos, la administración de altas dosis de IL-2 y la IA. Los resultados obtenidos con el primer método han sido exitosos en modelos animales aunque menos espectaculares en humanos, ya que se ha reportado la egresión de un número reducido de tumores metastásicos de pulmón, hígado y tejido subcutáneo, además de haberse detectado efectos colaterales adversos por efecto de la IL-2 (113-115). La administración de IL-2 en conjunción con IFN- α o TNF- α ha resultado en un sinergismo en la actividad antitumoral, comparada con aquella obtenida con el uso de IL-2 sola (116,117).

Por otro lado, la aplicación de la IA a partir de la administración de células LAK en conjunción con IL-2 ha resultado más efectiva que el empleo de IL-2 sola (118,119). Asimismo otros estudios han demostrado que el uso de TIL acompañados con IL-2 es de 50 a 100 veces más efectivo que la administración de LAK e IL-2 (120).

En los Estados Unidos de América se han llevado a cabo pruebas clínicas importantes de aplicación de la IA, los resultados muestran que existen diferencias en la respuesta citotóxica dependiendo del tipo de tumor. Por ejemplo, los tumores renales y melanomas presentan una mejor respuesta ante la administración de IL-2 sola, observándose promedios del 22-24% de regresiones. En tratamientos con células LAK e IL-2 los linfomas no Hodgkin, los tumores renales, colorectales y los melanomas presentaron entre el 17% y el 57% de regresiones. Por otro lado la administración de IL-2 en conjunción con IFN- γ , o con TNF- α , no mostró un mayor efecto que el anterior y, en general, la respuesta se limitó a tumores renales, colorectales y melanomas (121).

De manera global la IA ha mostrado tener cierta eficacia, pero no en el grado deseado, además de presentar el inconveniente de requerir grandes dosis de IL-2, las cuales son perjudiciales para los pacientes. Por esta razón es importante buscar nuevas opciones que den a la IA una mayor eficacia. Un factor importante a ser tomado en cuenta para lograr este objetivo es el conocimiento de la regulación de la respuesta inmune por las diferentes citocinas, con el fin de detectar cuales de ellas podrían ser usadas como complemento de este tipo de bioterapia.

V b. ALTERNATIVAS PARA LA IA.

COMBINACION DE MODULADORES BIOLÓGICOS.

TNF- α e IFN- γ son citocinas con efectos biológicos pleiotrópicos *in vitro* y en modelos animales. Ambas moléculas tienen actividad antitumoral de manera individual sobre algunos tipos de cáncer humano, de ratón y en algunas líneas celulares (122-129). Además estas moléculas tienen efecto sobre células del sistema inmune, algunas de las más importantes son: la inducción a la proliferación y citotoxicidad de monocitos (130-132), la activación de células NK (134-136) así como la estimulación a la expresión de moléculas de la clase I y II del CMH en células tumorales (137,138). Este amplio rango de actividad inmunoregulatoria, aunado a su potencial antiproliferativo sobre células tumorales, han impulsado los estudios y aplicaciones clínicas para tratar pacientes con cáncer usando estos agentes (133, 139-141).

Se ha reportado un efecto sinérgico antiproliferativo por el uso combinado de ambos factores en cáncer humano de mama, colorectal y en líneas celulares derivadas de carcinoma de cérvix y melanomas (122-124, 142, 143). También han sido encontrados efectos inmunológicos sinérgicos en la activación tumoricida de macrófagos murinos (144), incremento en la inducción por linfoquinas a la citotoxicidad de células asesinas (145), y el

aumento de la secreción de factores estimuladores de colonias por monocitos positivos a antígenos de clase II del CMH (146).

Las pruebas que se han desarrollado en pacientes con la administración de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de $\text{TNF-}\alpha$ en combinación con 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de $\text{IFN-}\gamma$, en forma de una infusión por 30 minutos tres veces por semana, mostraron que estos factores no ejercen efectos adversos severos como la IL-2. Los trastornos observados fueron hipotensión, fatiga, fiebre, mialgias, dolores de cabeza, náusea y vómito, los cuales fueron reversibles. No se encontraron efectos colaterales a nivel hematológico, hepático o renal.

Algunos de los efectos producidos por la combinación de $\text{IFN-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ en los pacientes tratados fueron la elevación de receptores solubles para IL-2, el aumento en la expresión de receptores para Fc en monocitos, y el aumento en la actividad inmune de linfocitos. Estos no están alejados del efecto inducido por los factores aplicados individualmente (147).

Por otra parte se ha probado que la combinación de $\text{TNF-}\alpha$ con IL-2 en un sistema de células T incrementa su proliferación, esto se debe a que el $\text{TNF-}\alpha$ induce la expresión de receptores para IL-2 de alta afinidad en las células linfocíticas (148). En un sistema LAK, la combinación de éstos factores no incrementa la proliferación, aunque se observa un aumento en el porcentaje de receptores para IL-2, identificados por el epítipo Tac (149).

La respuesta biológica al $\text{TNF-}\alpha$ está mediada por una interacción con receptores específicos de membrana (150,151), y se ha demostrado que la expresión de receptores para $\text{TNF-}\alpha$ en PBL ocurre después de haber sido estimulados por IL-2. La inducción del receptor es un fenómeno que depende tanto del tiempo como de la concentración de IL-2, observándose una inducción máxima a los 5 días en presencia de 1000 U/ml de IL-2. Estos hallazgos llevan a la suposición de que el $\text{TNF-}\alpha$ forma parte de un circuito operativo de retroalimentación positiva en la activación antígeno-independiente y en la regulación de la actividad de los linfocitos citotóxicos humanos (152).

El uso del $\text{IFN-}\gamma$ y del $\text{TNF-}\alpha$ en terapias contra el cáncer no se limita a su capacidad tumoricida, quizá son de mayor importancia sus propiedades regulatorias de la respuesta inmune. En el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer se ha descubierto que existe entre estos factores y la IL-2 un efecto sinérgico en la inducción a la proliferación de LSP de donadores normales. Este hecho es relevante ya que la aplicación de la IA requiere de grandes cantidades de linfocitos reactivos que sean capaces de eliminar los tumores. Aunado a esto, es posible que el empleo de factores sinérgicos permita reducir las concentraciones requeridas de ellos, lo cual permitiría disminuir los efectos

colaterales que causan en los pacientes y así se mejoraría importantemente la terapia.

CULTIVOS DE CELULAS EFECTORAS A LARGO PLAZO.

La aplicación tradicional que se ha hecho de la IA, incluye de manera general la administración de células LAK y de IL-2, este tipo de células tienen un gran poder lítico, pero no poseen especificidad, ya que no están restringidas por el CMH y son capaces de actuar tanto sobre células transformadas como sobre las normales. Las células LAK son obtenidas a través de un cultivo de cuatro días de LSP con IL-2, su actividad lítica *in vitro* es impresionante, pero *in vivo* no se mantiene el tiempo suficiente, ya que la experiencia marca que en la mayoría de los casos donde se presenta respuesta ésta es solo en forma de una regresión parcial del tumor.

Los pobres resultados obtenidos con la IA clásica (basada en las células LAK) se deben probablemente, a mecanismos de regulación natural que ocurren dentro del organismo, los que impiden que la respuesta LAK se prolongue lo suficiente para eliminar totalmente al tumor. Además estas células tienen un tiempo de vida limitado. Por tal razón resulta conveniente el estudio de otro tipo de poblaciones inmunocompetentes que sean capaces de generar una respuesta completa contra células malignas, que posean capacidad de reconocimiento específico y que puedan mantener su acción por tiempos prolongados. Los linfocitos T citotóxicos, obtenidos de co-cultivos con antígenos particulares, son las células que reúnen este conjunto de características y su aplicación a la IA parece ser una buena alternativa.

Las condiciones óptimas para la proliferación de linfocitos a largo plazo no han sido establecidas con claridad. A finales de los años 70's se lograron mantener clonas de linfocitos T por un máximo de 13 meses (153). Después de 30-60 días de proliferar en presencia de IL-2 los linfocitos dejan de responder al estímulo de dicha molécula, a éste lapso de tiempo se le conoce como "período de crisis".

Es posible que algunas células que proliferan en presencia de IL-2 tengan la propiedad de limitar la proliferación de otras como un mecanismo homeostático, o de vigilancia inmunológica, en contra de la rápida expansión de linfocitos, incluso algunas clonas linfoides humanas exhiben límites en su proliferación (153).

En la década de los 80's se establecieron cultivos de linfocitos T hasta por 9 meses, gracias a la implementación de un sistema de cultivo de doble compartimento, donde en uno de ellos se producía constantemente IL-2 fresca accesible para las células

del otro compartimento. Esto ayudó a diluir los productos de desecho y las toxinas producidas por la actividad celular, y proveer de medio nutritivo al cultivo. Con el tiempo las células finalmente murieron, probablemente debido a que las células no malignas poseen un tiempo de vida finito, el cual podría estar limitado a 15 generaciones, lo que ocurre en los linfocitos a los 30 días de proliferar en presencia de IL-2 (154). Este fenómeno no ha sido observado en células linfocíticas de ratón, lo que sugiere las malas condiciones del cultivo de estos linfocitos (155).

En 1980 se publicaron datos acerca del cultivo de líneas de linfocitos T citotóxicos humanos por 6-8 meses en presencia de IL-2. En este trabajo se demostró que se requería la adición semanal de linfocitos alogénicos irradiados para mantener la actividad citolítica. Los cultivos control que crecieron solo en presencia de IL-2 no fueron capaces de mantener su efecto lítico por más de 16 días, a pesar de que continuaron proliferando (156).

Posteriormente se logró mantener un cultivo de linfocitos T citotóxicos (CTL), con especificidad contra un tipo de célula blanco, por más de un año, debido a la inclusión de células estimuladoras irradiadas y de IL-2. Los CTL conservaron su poder lítico específico durante el tiempo de cultivo, pero además desarrollaron una ligera capacidad de respuesta en contra de otros tipos de célula blanco, como son las líneas celulares DAUDI y K562 (157), probablemente como una manifestación de los cambios que sufren las células normales en cultivos *in vitro*.

Estos estudios ponen de manifiesto la importancia que reviste la presencia de un factor antigénico, como un estimulante de la proliferación y desarrollo de la citotoxicidad, en cultivos de linfocitos que pretenden ser mantenidos por períodos considerables de tiempo, ya sea para estudios básicos, o para su aplicación en prácticas terapéuticas. La población de linfocitos T que responden, tanto a los estímulos antigénicos como a los producidos por moduladores biológicos como la IL-2, podría ser empleada en pruebas clínicas de inmunoterapia, ya que es capaz de desarrollar una respuesta específica en contra de células tumorales inmunogénicas (158). El desarrollo de un ataque dirigido contra células malignas no es un evento sencillo, y para su comprensión es necesario conocer las características de las células efectoras, en este caso de los linfocitos T.

POBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4 Y CD8.

Los linfocitos T están formados principalmente por dos subpoblaciones, los linfocitos T CD4, conocidos como linfocitos cooperadores (Th: del Inglés, Helper) y los linfocitos T CD8

conocidos como citotóxico-supresores (Tc). Los estudios realizados sobre estas subpoblaciones indicaron que los T_H tenían la función de sintetizar y secretar IL-2 ante el estímulo producido por las células presentadoras de antígeno, dicha molécula influye en la expresión de receptores para IL-2 en los linfocitos que proliferaban y expresaban citotoxicidad (Tc).

Los Tc tienen una función lítica y son capaces de regular o suprimir la respuesta inmune una vez eliminado al agente agresor. La concepción actual sobre los mecanismos que rigen las actividades y relaciones entre los dos tipos de linfocitos T ha cambiado radicalmente. La característica que da nombre a cada subgrupo de linfocitos T no es una función exclusiva, ya que el T_H es capaz de lisar células blanco, de la misma forma los Tc pueden producir IL-2 y trabajar como auxiliares.

Se ha observado que es posible la generación de linfocitos T citotóxicos independientemente de la presencia de linfocitos CD4 (159-161). Sin embargo, algunos estudios reportan que la presencia de linfocitos CD4 es esencial para la actividad citotóxica de los linfocitos CD8 (162). La actividad de los linfocitos CD4 es muy importante en los fenómenos de regulación de la citotoxicidad, ya que son capaces de ejercer un efecto de inhibición o estimulación de dicha actividad en los linfocitos citotóxicos (163).

Gracias a las técnicas de clonación se ha descubierto que no todas las clonas de células Tc originadas a partir de su activación por antígenos tumorales son capaces de generar una respuesta citotóxica. Estas clonas no pueden considerarse como citotóxicas contra las células tumorales, aunque sean positivas para el marcador CD8. Estudios recientes demuestran que la actividad de los Tc en contra de tumores está mediada por la secreción de factores reguladores de la respuesta inmune, como son el IFN- γ y el TNF- α (164).

Aquellas clonas de linfocitos T que surgen del co-cultivo con células antigénicas, y que mantienen su capacidad de lisis específica en contra de éstas por períodos indefinidos son llamadas células T de memoria. Este grupo de células inmunocompetentes es poco conocido, pero su existencia queda demostrada gracias a los estudios realizados con modelos animales, donde la exposición de linfocitos T a células infectadas por virus *in vivo*, promueve el desarrollo de subpoblaciones T CD8 específicas contra las células infectadas desde los 8 días después del contacto inicial.

Estos linfocitos efectúan la lisis de las células infectadas por virus y eliminan la infección en el animal. Si estos linfocitos son transferidos a un animal infectado son capaces de controlar la infección de manera específica y mantienen la memoria

adquirida por el resto de la vida del animal de experimentación. Dichos linfocitos son exclusivamente CD8, están restringidos al CMH y su especificidad es tal que no atacan a células no infectadas, ni células infectadas por un tipo de virus diferente (165).

Los linfocitos T de memoria presentan cambios fenotípicos que permiten diferenciarlos de las poblaciones T normales, por ejemplo la molécula CD45RA es un marcador que define células T simples, sin embargo el anticuerpo monoclonal que reacciona solo con la forma de bajo peso molecular CD45RO identifica a las células T de memoria, que son capaces de reaccionar ante el reto con antígenos conocidos (166).

El fenómeno de la adquisición de memoria en linfocitos T tiene relación con la avidéz que éstos poseen por un antígeno dado. Las células T de memoria incrementan su avidéz por el antígeno al que son expuestas al aumentar la expresión de moléculas accesorias de adhesión, como son CD2, LFA-1, LFA-3 e ICAM-1. Algunas de estas moléculas también funcionan induciendo las señales de transducción y manteniendo a la célula T en un estado de "alerta", por medio del cual puede responder con mayor rapidez y efectividad a un segundo encuentro con el agente inmunogénico (167).

Las células T de memoria funcionan como un sistema de ataque ideal en contra de células que han sufrido una transformación maligna, por lo que se considera viable su aplicación en la inmunoterapia, pues si en humanos respeta el comportamiento que han mostrado en modelos animales, presentarían grandes ventajas sobre la inmunoterapia tradicional, como por ejemplo: un efecto mantenido, la eliminación de la administración de concentraciones elevadas de interleucinas, además de la posibilidad de conservar una población latente de memoria que proteja definitivamente al individuo en contra de las células tumorales.

Con base en los antecedentes señalados se realizó el presente trabajo, y se presenta como una contribución a los conocimientos que deben desarrollarse para el establecimiento de terapias inmunológicas que ayuden a resolver el problema del CaCu en nuestro país.

HIPOTESIS DE TRABAJO

El sistema inmune es capaz de eliminar células transformadas y células que expresan antígenos virales en su superficie. Se sabe que la IL-2 es un mitógeno natural de linfocitos T, que permite la generación de clonas de este tipo celular al activar LSP. Además existen evidencias de que factores como el IFN- γ , el TNF- α y la IL-2 inducen una mayor efectividad en el reconocimiento y ataque de células efectoras contra células malignas. Finalmente se sabe que la mayoría de los tumores de CaCu tienen integrados el genoma del VPH tipos 16 y 18 y con esto la capacidad de expresar en la superficie de la membrana antígenos virales.

En consecuencia, suponemos que si se co-cultivan células tumorales de CaCu con LSP de la misma paciente en presencia de IL-2, IFN- γ y TNF- α se esperaría el reconocimiento antigénico, así como la generación de una gran cantidad de células efectoras con capacidad citotóxica-específica hacia el tumor de la misma paciente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener poblaciones de linfocitos T citotóxico-específicos contra células de tumor cérvico uterino autólogo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Medir la capacidad proliferativa de leucocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu) en co-cultivo con células de tumor autólogo en presencia de Inteleucina-2, Interferón- γ y Factor de Necrosis Tumoral- α .

2. Evaluar la potencialidad citotóxica de los LSP, generados mediante el co-cultivo, contra células del tumor autólogo.

3. Determinar la especificidad citotóxica de los LSP provenientes del co-cultivo autólogo retándolos contra células de tumores homólogos (CaCu de otras pacientes), heterólogos (tumores no relacionados), células de cérvix normal y células sanas de la propia paciente.

METODO

El material biológico que se utilizó en el presente trabajo consistió de biopsias de tumores de CaCu y de muestras de sangre periférica de las mismas pacientes, las cuales fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaría de Salud.

Los reactivos empleados fueron de grado reactivo, a menos que se indique lo contrario. El material de cristalería fue esterilizado en autoclave a 21 libras de presión durante 20 minutos, y posteriormente fue secado en estufa por 30 minutos a 100°C.

Todas las soluciones utilizadas en el cultivo de tejidos fueron previamente esterilizadas por medio de filtros de poro de 0.22 micras (Millipore, Type GS, U.S.A.).

Los medios nutritivos y soluciones fueron calentadas a 37°C en Baño de María antes de ser empleados en las técnicas de cultivo de tejidos

OBTENCION DE MUESTRAS SANGUINEAS

Las muestras sanguíneas fueron tomadas en condiciones de esterilidad con tubos Vacutainer 100 x 16 mm (Becton Dickinson Co. U.S.A.) conteniendo 0.1 ml de heparina 1000 U.I./ml (Rickercab/NCB, U.S.A.) como anticoagulante.

SEPARACION DEL PLASMA

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 500 g durante 15 minutos. El plasma fue separado del paquete celular por medio de pipeteo suave y colocado en un tubo de vidrio, se le adicionaron 0.1 ml de clorhidrato de protamina 1000 U/ml (F. Hoffman-La Roche & Cie., S.A. Basilea/Suiza), antagonista de la heparina, que permite la coagulación y la separación del suero

libre, mismo que se obtuvo rompiendo el coágulo formado y transfiriendo el líquido restante a un tubo de vidrio.

INACTIVACION DEL COMPLEMENTO SERICO

Los sueros obtenidos fueron inactivados en un Baño de María a 57°C durante 30 minutos, con el fin de eliminar las proteínas del complemento, que podrían interferir en los experimentos.

SEPARACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP)

Al paquete celular, una vez separado del plasma, se le practicó un lavado adicionando 10 ml de Medio de Eagle (ME) (Apéndice 1) y centrifugando a 500 g por 15 minutos, el sobrenadante fue desechado. Se adicionó un volumen de ME equivalente a la cantidad de sangre contenida en el tubo y se resuspendió suavemente.

Esta mezcla se vertió en tubos de vidrio que contenían 2 ml de Ficoll-Paque (Ficoll 400, Farmacia Fine Chemicals, Suiza). En cada uno de ellos se adicionaron 5 ml de la mezcla de sangre, haciéndola resbalar muy lentamente por las paredes del tubo. Se centrifugó a 500 g por 30 minutos. La interfase de color blanco, formada por células mononucleadas, fue separada cuidadosamente con una pipeta y trasladada a tubos para centrífuga a los cuales se había adicionado 2 ml de EM procurando mojar las paredes con dicho medio para evitar que las células se adhirieran a ellas. Se centrifugaron a 500 g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Apéndice 2).

Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer (American Optical, U.S.A.), algunas de ellas fueron utilizadas inmediatamente y el resto se conservaron en congelación, por medio de la técnica de criopreservación, para ser empleadas posteriormente.

TECNICA DE CRIOPRESERVACION

Para preservar las células que no fueron usadas en un ensayo inmediato se aplicó la técnica de criopreservación que consiste en lo siguiente:

Las células fueron centrifugadas a 500 g por 5 minutos y resuspendidas en una solución para congelación compuesta, para el

caso de LSP, por 90% de suero autólogo y 10% de dimetil sulfóxido (Sigma Chemical Co. U.S.A.) y para células tumorales de 80% de ME, 10% de suero fetal de bovino (SFB) (Microlab, México) y 10% de dimetil sulfóxido. Inmediatamente después las células se transfirieron a pequeñas ampollitas (Cooke Laboratory Products, U.S.A.) de 1 ml y se congelaron a -70°C durante 24-72 horas para ser posteriormente introducidas en Nitrógeno líquido a una temperatura aproximada de -190°C .

Para descongelar las células se sacó la ampollita del nitrógeno líquido y se colocó en un Baño de María a 37°C hasta que la muestra quedó completamente líquida. A continuación se centrifugó a 500 g por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en RPMI para su utilización en los ensayos pertinentes.

OBTENCION DE CELULAS TUMORALES

Las biopsias de tejido tumoral fueron primeramente lavadas con una solución amortiguadora de verseno (Apéndice 3), para eliminar coágulos sanguíneos y tejido necrótico. Posteriormente se cortó en trozos de aproximadamente 0.5 mm de diámetro y se colocó dentro de un matraz, se adicionaron 5 ml de verseno y se sometió a agitación constante a una temperatura de 37°C por 15 minutos con la finalidad de eliminar eritrocitos, tejido necrótico superficial y de preparar la muestra para su disgregación enzimática, ya que el verseno (que contiene EDTA) debilita las uniones intercelulares y facilita la separación de las células que conforman la masa tumoral. El sobrenadante obtenido con esta primera agitación fue desechado y se adicionaron 2 ml de colagenasa tipo IV (Sigma Chemical Co. U.S.A.) al 0.05%, hialuronidasa (Sigma Chemical Co. U.S.A.) al 0.01% y DNasa (Sigma Chemical Co. U.S.A.) al 0.002% (Apéndice 4), durante 30 minutos a 37°C .

El sobrenadante, que contiene las células resultantes de la disgregación, se colectó y centrifugó a 500 g por 5 minutos, el botón celular se lavó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Apéndice 5) dos ocasiones y las células se contaron, midiendo su viabilidad por exclusión de azul tripano (Sigma Chemical Co. U.S.A.) al 4% en PBS.

Una parte de las células tumorales fue criopreservada para ser empleadas en los ensayos de citotoxicidad y otra fue sometida a la técnica de adherencia en microplacas de cultivo para las pruebas de proliferación de LSP.

ADHERENCIA DE CELULAS MALIGNAS A PLACAS DE CULTIVO

Para la evaluación de la capacidad proliferativa de los LSP en presencia de las células tumorales y de los factores inductores IL-2 (Cetus Co. U.S.A.), IFN- γ (Genzyme, U.S.A.) y TNF- α (Sigma Chemical Co. U.S.A.), se procedió a la adherencia de células malignas sobre la superficie de micropozos de cultivo para posteriormente realizar el co-cultivo con LSP. En una placa de microtitulación se depositó glutaraldehído al 0.1% en una solución salina de boratos (Apéndice 6) 0.1 ml/pozo y se incubaron a 4°C durante toda una noche.

Una vez transcurrido este tiempo se lavaron dos veces con una solución de cloruro de sodio (J.T. Baker, S.A. de C.V. México) al 0.85% en agua bidestilada. Las células suspendidas en PBS fueron adicionadas a los pozos en un volumen de 50-100 μ l/pozo y se centrifugaron a 500 g por 15 minutos. Posteriormente se añadieron 100 μ l/pozo de glutaraldehído al 0.1% en PBS, teniendo el cuidado necesario para no desprender la capa adherida, se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos y finalmente se lavó con PBS-Tween (Apéndice 7) dos veces.

CO-CULTIVOS CELULARES

Se realizaron dos tipos de co-cultivos celulares, el primero para medir la proliferación de los LSP y el segundo para la evaluación de la citotoxicidad de los mismos sobre diversos tipos celulares.

- CO-CULTIVOS PARA MEDIR LA PROLIFERACION DE LSP

Sobre las capas de células tumorales adheridas en los micropozos se colocaron LSP en una proporción de 10:1 (LSP:célula tumoral), el medio de cultivo consistió de RPMI suplementado con 10% de suero autólogo, 1000 U/ml de IL-2, 10 U/ml de IFN- γ y 500 U/ml de TNF- α . Se realizaron cambios del medio y evaluaciones del número de células cada 5 días.

- CO-CULTIVOS PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD.

LSP provenientes del co-cultivo con células tumorales fueron colocados en micropozos de cultivo en presencia de las células blanco, en RPMI con 10% de suero autólogo, e incubados durante 4 horas. La citotoxicidad fue evaluada mediante el conteo de

células tumorales muertas (distinguidas por la técnica de inclusión de Azul Tripano).

GENERACION DE CELULAS ACTIVADAS PARA MATAR POR LINFOCINAS (CELULAS LAK)

Para obtener células LAK se separan LSP de sangre periférica, por el método antes descrito, y se cultivan en RPMI-1640 (Sigma, Chem. Co. U.S.A.) suplementado con L-glutamina (Sigma Chemical Co. U.S.A.) y 10% de suero autólogo, en presencia de 100 U/ml de IL-2 (Cetus Co. U.S.A.) durante 4 días. Las células presentes en el cultivo, una vez transcurrido este tiempo, son consideradas como LAK en período de máxima actividad.

CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora (Forma Scientific, Division of Mallinckrodt, Inc. U.S.A.) a 37°C, en una atmósfera con 10% de bióxido de carbono y un ambiente saturado de humedad.

131905

RESULTADOS

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu) EN PRESENCIA DE CELULAS TUMORALES AUTOLOGAS E INTERLEUCINA-2 (IL-2).

Hoy en día se sabe que la IL-2 ejerce un efecto proliferador sobre LSP cultivados *in vitro* (83). Así mismo, se ha comprobado que los LSP extraídos de pacientes con CaCu conservan su capacidad de proliferar ante el estímulo de IL-2, además de que en su suero no se encuentran factores inhibidores a tal respuesta (170).

Por otro lado, los conocimientos aportados por la Inmunología nos indican que debe presentarse una respuesta proliferativa y de inducción a la citotoxicidad en LSP una vez que estos han sido puestos en contacto con un agente antigénico, este fenómeno incluye la producción de factores inductores como la misma IL-2, el IFN- γ y el TNF- α . No se ha comprobado que las células de CaCu presenten un antígeno tumoral particular, sin embargo su fuerte relación con los VPH tipos 16 y 18 las hacen ser buenos candidatos a la expresión de antígenos fuertes, lo cual sería la clave para su tratamiento por métodos de inmunoterapia.

Por este motivo, y dado que el primer paso para el desarrollo de una inmunoterapia tumoral es la generación de una cantidad elevada de células efectoras, se realizó el cultivo de los LSP de la paciente I para evaluar su capacidad proliferativa utilizando como mitógeno IL-2. Para ello se cultivaron los LSP sobre monocapas de células tumorales autólogas adheridas a placas de cultivo, utilizando como control LSP en presencia de IL-2 libres de antígeno.

El cultivo de LSP se prolongó por 21 días y tanto los cambios de medio como las evaluaciones de la cantidad de células se realizaron cada 7 días. En este caso el número inicial de LSP fue de 100,000 observándose una disminución paulatina de éstos en el ensayo negativo; en ausencia de inductor y de células tumorales.

Los resultados de proliferación muestran que cuando las células tumorales están presentes en el cultivo, la muerte leucocítica disminuye, en comparación al ensayo negativo. La evaluación de la proliferación nos muestra que la población final es cuatro veces mayor a la inicial (Gráfica I).

Por otro lado, la adición de IL-2 a los cultivos, ya sea en ausencia o presencia de tumor incrementó la proliferación de los LSP, observándose un número final de 500,000 en el ensayo sin células tumorales y de 600,000 en presencia de ellas. (Gráfica I).

Con este ensayo podemos decir que es posible amplificar la respuesta proliferativa de LSP inducida por IL-2 *in vitro*, si son colocados en presencia de células de tumor autólogo, las cuales actúan como agente antigénico.

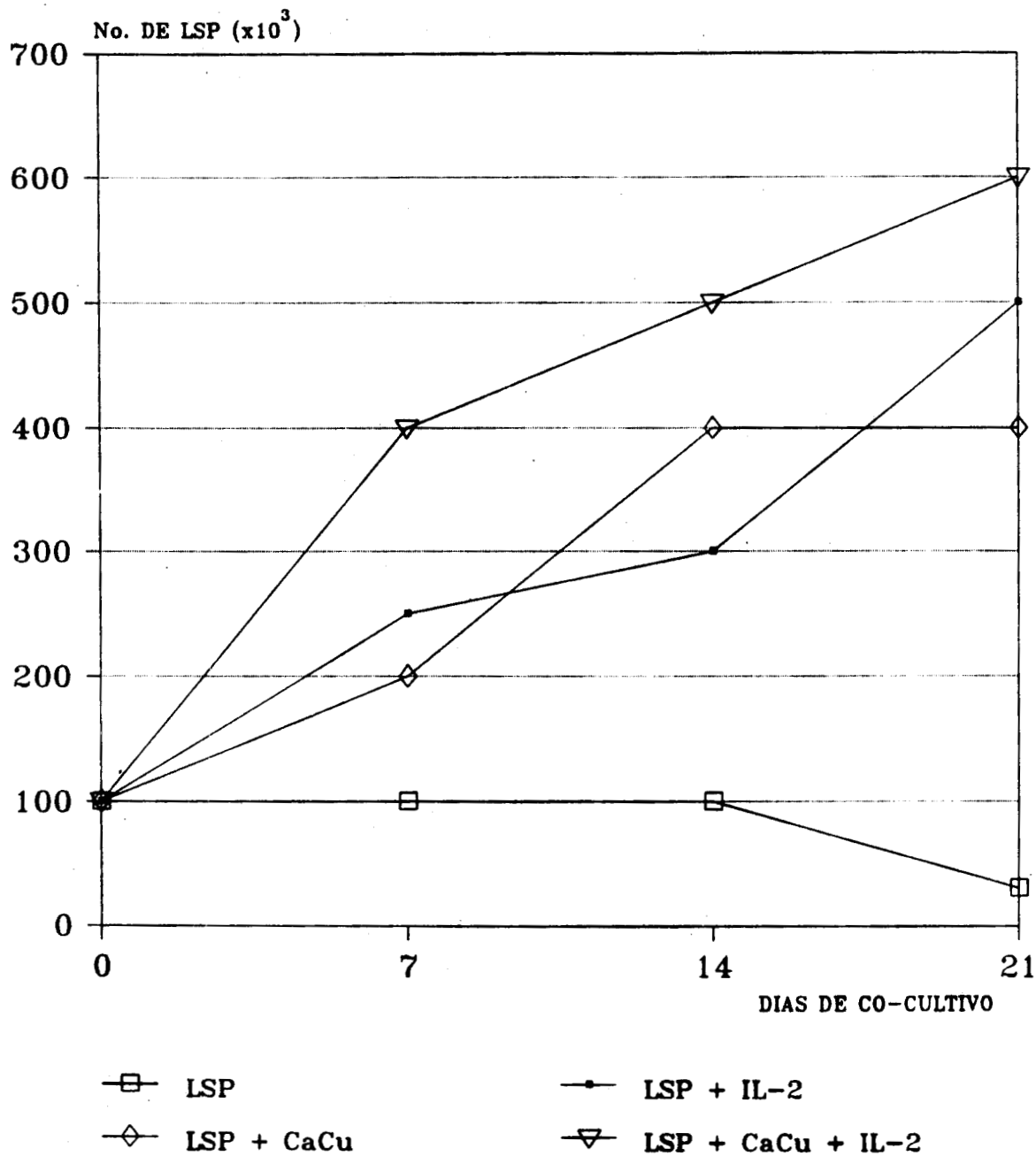
PROLIFERACION DE LSP DE PACIENTES CON CaCu EN PRESENCIA DE CELULAS TUMORALES AUTOLOGAS E IL-2, IFN- γ Y TNF- α .

Una vez demostrado que los LSP de pacientes con CaCu son capaces de aumentar su respuesta proliferativa en presencia de células tumorales autólogas e IL-2, se decidió buscar alguna alternativa metodológica con la cual se pudiera reducir la concentración normalmente recomendada de IL-2 sin alterar su actividad mitogénica, debido a los efectos tóxicos producidos por esta molécula cuando es administrada a la paciente en altas concentraciones para mantener la efectividad proliferativa de los LSP. Para ésto se pensó utilizar otras citocinas como el IFN- γ y el TNF- α cuyo efecto inductor de la proliferación de LSP de donadores sanos ha sido evaluado en nuestro laboratorio, observándose que existe un efecto sinérgico entre estos tres moduladores biológicos, lo que nos ha permitido reducir diez veces las concentraciones de IL-2, IFN- γ y TNF- α que son recomendadas para la activación de LSP *in vitro*.

Con el propósito de evaluar si los LSP de pacientes con CaCu modificaban su capacidad proliferativa, inducida por las tres citocinas, en presencia de las células tumorales, se realizaron co-cultivos autólogos con LSP de tres pacientes, en ausencia y presencia de las células provenientes de CaCu a las cuales se adicionó tanto IL-2 sola como una combinación de ésta con IFN- γ y TNF- α . En todos los ensayos el número inicial de LSP fué de 100,000.

Los cultivos celulares de la paciente II se prolongaron por 28 días; las evaluaciones del número de células y los cambios del medio se llevaron a cabo cada 7 días. Para los ensayos en ausencia del antígeno los resultados muestran, en forma general, una disminución en la proliferación de los LSP después de los 21

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP)
DE LA PACIENTE CON CaCu (I) EN CO-CULTIVO CON CELULAS
DE TUMOR AUTOLOGO EN PRESENCIA DE IL-2



GRAFICA I

días de cultivo, obteniéndose para el ensayo negativo, sin inductor ni células tumorales, la menor población final, que fue 10 veces menor a la inicial. La mayor proliferación se encontró a los 21 días con 1'300,000 células en donde los tres factores estaban presentes, sin embargo a los 28 días este número sufrió un decremento importante quedando en 270,000 LSP.

Los LSP que fueron cultivados en presencia de células tumorales tuvieron un comportamiento diferente, ya que la proliferación se mantuvo después de los 21 días. La proliferación de los LSP en presencia del tumor fue semejante a la inducida en el ensayo sin antígeno pero con IL-2, obteniéndose 650,000 células a los 21 días, con una disminución a 230,000 células a los 28 días. (Gráfica II).

El cultivo en presencia del antígeno e IL-2 tuvo un aumento en la proliferación con respecto al tiempo, obteniéndose a los 28 días 2'700,000 LSP. La mayor proliferación en este ensayo, se encontró cuando los LSP se cultivaron en presencia del antígeno y la combinación de los tres factores, obteniéndose a los 28 días la cantidad de 5'300,000 células. (Gráfica II).

Los LSP de la paciente número III presentaron un comportamiento semejante para los ensayos sin células tumorales, donde el control sin inductor mostró un decremento en el número de LSP llegando a 30,000 a los 14 días (Gráfica III), desafortunadamente la evaluación posterior, en estas condiciones, no fue posible ya que el cultivo se contaminó con bacterias. En la prueba con IL-2 el número de células aumentó con respecto al tiempo y llegó a 1'800,000 LSP a los 28 días; cuando se adicionó al cultivo la combinación de los tres factores se logró un número final de 2'200,000 células (Gráfica III). A diferencia de la paciente II, las células de la paciente III se mantuvieron proliferando después de los 21 días.

En las pruebas con las células tumorales se tuvo contaminación bacteriana en el control sin inductor, por lo que no fué posible evaluarlo. El ensayo con IL-2 mostró un aumento constante en el número celular, obteniéndose 4'500,000 LSP a los 28 días. De manera similar al experimento con la paciente 2, el número máximo de células correspondió al ensayo con la combinación de los tres moduladores biológicos, con 5'500,000 células (Gráfica III).

Las células de la paciente IV se mantuvieron por 42 días. El ensayo usado como control negativo, sin inductor ni antígeno, mostró un decremento en el número de células similar a lo que ocurrió en las pruebas anteriores, aunque en este caso la población inicial decayó totalmente ya que al final del ensayo no fue posible encontrar células vivas. Los LSP cultivados en presencia de IL-2 mostraron un incremento en su número a los 28

días, llegando a registrarse 2'800,000 células; este número sufrió un decremento a los 42 días observándose solamente 1'000,000. El ensayo en el que se adicionó la combinación de las citocinas indujo una proliferación de 4'700,000 a los 28 días, sin embargo esta cantidad de células se redujo cuatro veces al llegar a los 42 días, observándose un número final de 1'100,000 células (Gráfica IV).

Los LSP incubados con células tumorales mostraron proliferación hasta el final del ensayo, así en el control sin el inductor el número final de LSP fue de 3'800,000, el cual es mayor al que se ha reportado para la prueba sin el antígeno y combinando las tres citocinas. La presencia de la IL-2 en el cultivo dio lugar a una proliferación mayor que la del control, registrándose un número final de 6'500,000 LSP. En el ensayo con la combinación de los tres factores se registró un número final de 8'500,000 de LSP, esta cifra fue la mayor tanto en el ensayo como en el experimento completo.

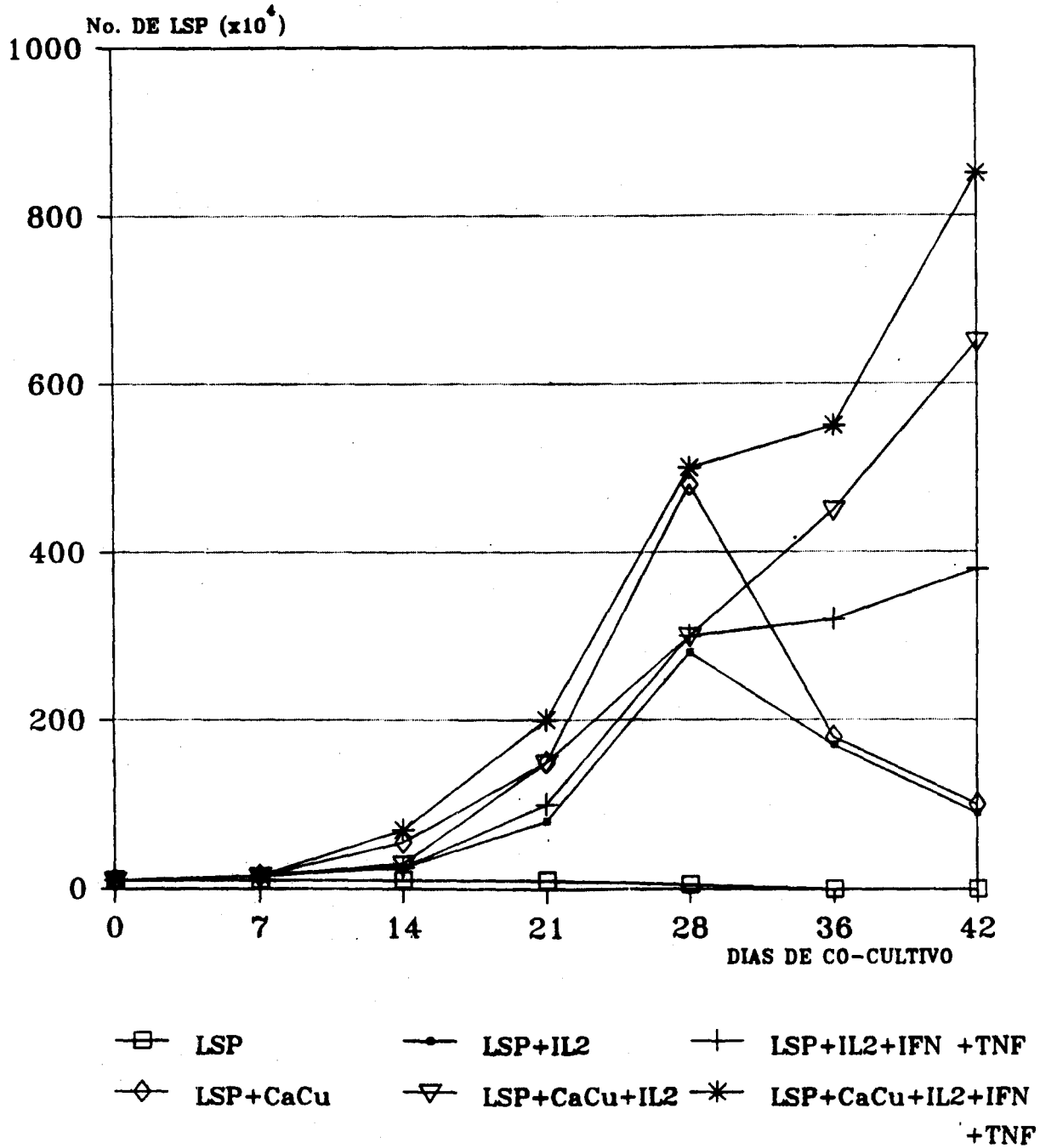
En todos los ensayos presentados se repite la inducción de un mayor grado de proliferación de los LSP de pacientes con CaCu en presencia de una combinación de IL-2, IFN- γ y TNF- α . En dos de tres pacientes, la presencia del estímulo antigénico, dado por las células tumorales en el cultivo, parece haber jugado un papel importante en el mantenimiento de la respuesta proliferativa por un mayor período (resumen de gráficas).

CITOTOXICIDAD DE LSP DE PACIENTES CON CaCu, PROVENIENTES DE CO-CULTIVOS AUTOLOGOS CON CELULAS TUMORALES , SOBRE CELULAS DE TUMOR AUTOLOGO Y DE UN TUMOR HETEROLOGO.

Una vez establecidas las condiciones que facilitan la obtención de un número elevado de LSP, el siguiente paso es conocer si éstas son capaces de reconocer y eliminar las células del tumor contra las que fueron retadas. Con el objeto de precisar el potencial lítico de los LSP provenientes del co-cultivo con las células del tumor autólogo, se llevaron a cabo pruebas de citotoxicidad de los LSP en contra de células del propio tumor, células del tumor de otra paciente (tumor heterólogo) y de células provenientes de un cérvix sano.

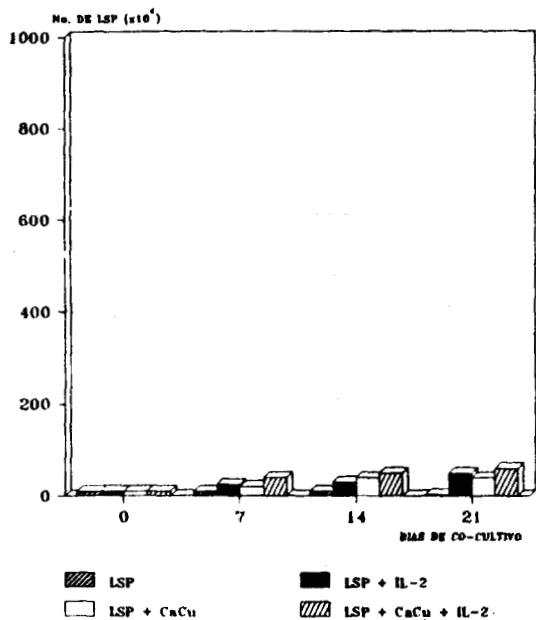
Los resultados de la prueba con la paciente número V mostraron diferentes grados de citotoxicidad. Para los leucocitos provenientes del co-cultivo en presencia de IL-2 se observó un 17% de citotoxicidad en contra de las células de su propio tumor y de 2.4% en contra tanto de células del tumor heterólogo como del cérvix sano. Para los LSP provenientes del co-cultivo en presencia de la combinación de los tres factores se observó una

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP)
DE LA PACIENTE CON CaCu (IV), EN CO-CULTIVO CON CELULAS
DE TUMOR AUTOLOGO EN PRESENCIA DE IL-2, IFN- γ Y TNF- α

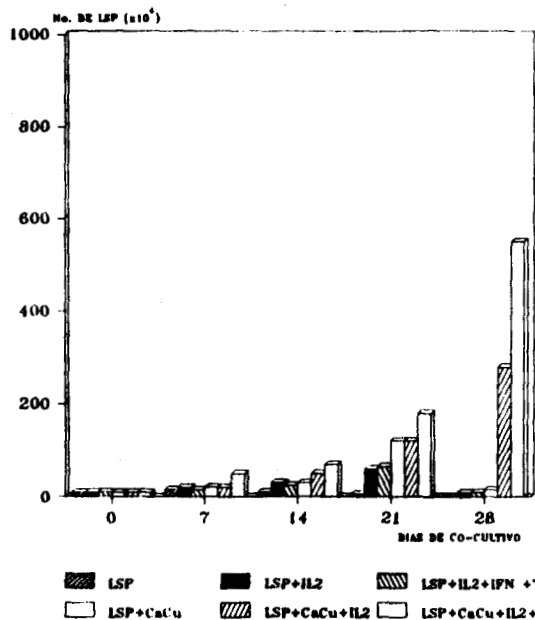


GRAFICA IV

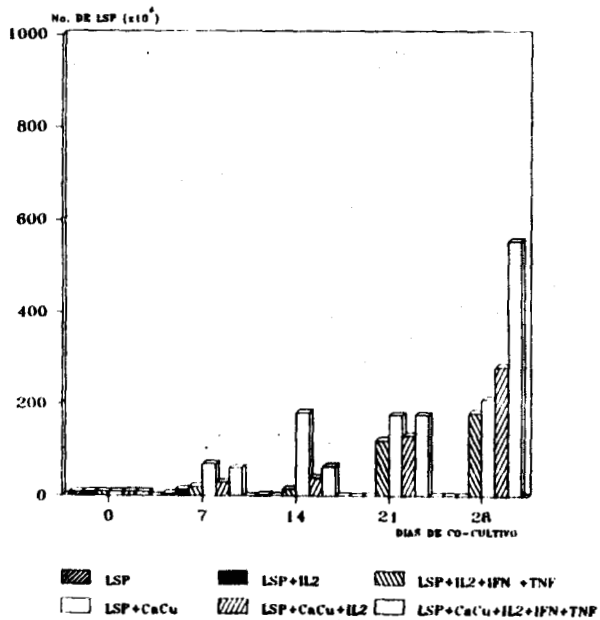
PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP)
 DE PACIENTES CON CaCu EN CO-CULTIVO CON CELULAS
 DE TUMOR AUTOLOGO EN PRESENCIA DE IL-2, IFN- γ Y TNF- α



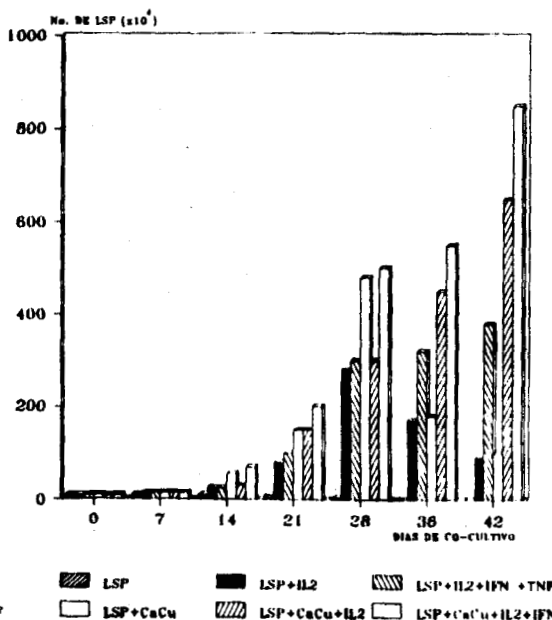
PACIENTE I



PACIENTE II



PACIENTE III



PACIENTE IV

mayor capacidad citotóxica en contra del tumor autólogo con un 93%, mientras que la citotoxicidad contra células tumorales heterólogas y del cérvix sano fue muy baja siendo para el primero de 2.3% y para el segundo de 3.1% (Tabla 1).

La paciente número VI tuvo un comportamiento similar a la paciente número V, ya que los LSP generados en el co-cultivo con IL-2 produjeron la muerte de un 18% de las células del tumor autólogo, un 4% de un tumor heterólogo y 2% del cérvix sano. Mientras que aquellos provenientes del co-cultivo en presencia de IL-2, IFN- γ y TNF- α produjeron un efecto citotóxico del 97% sobre tumor autólogo, 2% sobre tumor homólogo y 3% sobre cérvix sano (Tabla 2).

Estos ensayos indican que los linfocitos que proliferan durante el reto con un tipo de células transformadas poseen la capacidad de generar una respuesta citotóxica en contra de éstas. Asimismo se observó que dicha respuesta se incrementa cuando el impulso proliferador es mediado por una combinación de IL-2, IFN- γ y TNF- α . Sin embargo el hecho de haber encontrado una respuesta baja en contra de células sanas y células de otro tumor, hablaría de la adquisición de especificidad por parte de los linfocitos hacia las células sobre las cuales fueron activadas.

CITOTOXICIDAD DE LSP DE PACIENTES CON CaCu, PROVENIENTES DE CO-CULTIVO AUTOLOGO CON CELULAS TUMORALES, SOBRE CELULAS DE TUMOR AUTOLOGO Y CELULAS HETEROLOGAS TUMORALES Y NORMALES.

Los cultivos de los LSP presentaron proliferación y citotoxicidad. Enseguida se debe establecer su especificidad en el reconocimiento y ataque contra células tumorales y compararlo con la respuesta que pudieran desencadenar al entrar en contacto con otras células sanas del organismo. Esta prueba es importante y debe llevarse a cabo antes de llegar a la fase aplicativa, ya que se debe tener la seguridad de que las células producidas no atacarán a las células sanas de la paciente, lo que causaría efectos colaterales adversos.

Para ello se realizaron pruebas de citotoxicidad de las células efectoras generadas, tanto en cultivos con IL-2 como en aquellos donde se encontró la combinación de los tres inductores, en contra de células de tumor autólogo, de tres tumores heterólogos, de dos líneas celulares derivadas de CaCu, de una línea celular derivada de un carcinoma de laringe, de células de cérvix sano y por último de células sanas de la propia paciente, que en todos los casos fueron LSP.

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu) PROVENIENTES DEL CO-CULTIVO A 20 DIAS CON CELULAS DE TUMOR AUTOLOGO.

TABLA 1

CELULAS BLANCO	CO-CULTIVO EN PRESENCIA DE	
	<i>IL-2</i>	<i>IL-2 + IFN-γ + TNF-α</i>
TUMOR CaCu AUTOLOGO (V)	17	93
TUMOR CaCu HETEROLOGO (VI)	2	2
CERVIX SANO	2	3

IL-2 INTERLEUCINA-2
IFN- γ INTERFERON- γ
TNF- α FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu) PROVENIENTES DEL CO-CULTIVO A 20 DIAS CON CELULAS DE TUMOR AUTOLOGO.

TABLA 2

CELULAS BLANCO	CO-CULTIVO EN PRESENCIA DE	
	IL-2	IL-2 + IFN- γ + TNF- α
TUMOR CaCu AUTOLOGO (VI)	18	97
TUMOR CaCu HETEROLOGO (V)	4	2
CERVIX SANO	2	3

IL-2 INTERLEUCINA-2
 IFN- γ INTERFERON- γ
 TNF- α FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α

Los LSP de la paciente número VII provenientes del co-cultivo con IL-2 solamente mostraron respuesta citotóxica en contra de las células tumorales autólogas y contra las células del tumor de la paciente X, con un 62% y 60% de citotoxicidad respectivamente; una respuesta pequeña, de 14% de citotoxicidad, en contra del tumor de la paciente VIII, y ninguna respuesta tanto en contra del tumor de la paciente número IX, como de las líneas celulares, del cérvix normal y de los LSP autólogos (Tabla 3).

Las células efectoras provenientes del co-cultivo con IL-2, IFN- γ y TNF- α mostraron una fuerte respuesta en contra tanto del tumor autólogo como del tumor de la paciente X, con un 94% y 90% de citotoxicidad respectivamente; nuevamente una respuesta pequeña, de 18% de citotoxicidad, en contra del tumor VIII y una respuesta nula en contra tanto del tumor IX, como del cérvix sano, de las líneas celulares y, lo que es muy importante, de los LSP normales de la propia paciente (Tabla 3).

Los LSP de la paciente número VIII presentaron, en general, una respuesta citotóxica baja. Para aquellos que fueron estimulados con IL-2 se observaron valores de citotoxicidad no mayores al 10%, incluso para el ensayo autólogo, que fue del 4% (Tabla 4).

Para los LSP estimulados por IL-2, IFN γ y TNF- α los porcentajes de citotoxicidad fueron también bajos siendo de 17% para la prueba con tumor autólogo, del 30% contra el tumor X, del 21% contra el tumor IX y no presentándose respuesta en contra del tumor VII, del cérvix sano, de las líneas celulares ni de los LSP autólogos (Tabla 4).

En el caso de la paciente número IX se observó, para los LSP del co-cultivo con solo IL-2 una respuesta del 70% de citotoxicidad en contra de las células del tumor autólogo y del tumor X, mientras que no existió ataque en contra de los tumores VII y VIII, ni de las líneas celulares, del cérvix sano ni de los LSP autólogos (Tabla 5).

Los porcentajes de citotoxicidad se vieron aumentados en la prueba con los LSP obtenidos del co-cultivo con las tres citocinas empleadas, observándose un 92% de lisis de las células tumorales autólogas, un 90% del tumor de la paciente X y un 17% de las células del tumor VII. En este caso se presentó una pequeña respuesta del 13% en contra de la línea celular derivada de un CaCu (InB1) y un 11% en contra del cérvix sano, no presentándose efecto contra en tumor VIII, contra las líneas derivadas de CaCu (T3) y de un carcinoma de laringe (Hep) ni contra los LSP frescos de la paciente (Tabla 5).

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu) PROVENIENTES DEL CO-CULTIVO A 20 DIAS CON CELULAS DE TUMOR AUTOLOGO.

TABLA 3

CELULAS BLANCO	CO-CULTIVO EN PRESENCIA DE	
	IL-2	IL-2 + IFN- γ + TNF- α
LSP AUTOLOGOS	2	0
TUMOR CaCu AUTOLOGO (VII)	62	94
TUMOR CaCu HETEROLOGO (VIII)	14	18
TUMOR CaCu HETEROLOGO (IX)	5	0
TUMOR CaCu HETEROLOGO (X)	60	90
CERVIX SANO	3	0
T 3	2	2
InB1	2	5
Hep	2	2

IL-2

INTERLEUCINA-2

IFN- γ INTERFERON- γ TNF- α FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α

T 3 e InB1

LINEAS CELULARES DE CANCER CERVICO UTERINO

Hep

LINEA CELULAR DE CANCER DE LARINGE

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu) PROVENIENTES DEL CO-CULTIVO A 20 DIAS CON CELULAS DE TUMOR AUTOLOGO.

TABLA 4

CELULAS BLANCO	CO-CULTIVO EN PRESENCIA DE	
	<i>IL-2</i>	<i>IL-2 + IFN-γ + TNF-α</i>
LSP AUTOLOGOS	ND	ND
TUMOR CaCu AUTOLOGO (VIII)	5	17
TUMOR CaCu HETEROLOGO (VII)	4	2
TUMOR CaCu HETEROLOGO (IX)	10	21
TUMOR CaCu HETEROLOGO (X)	0	29
CERVIX SANO	6	4
T 3	2	0
InB1	1	0
Hep	4	5

IL-2 INTERLEUCINA-2
IFN- γ INTERFERON- γ
TNF- α FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α
 T 3 e InB1 LINEAS CELULARES DE CANCER CERVICO UTERINO
 Hep LINEA CELULAR DE CANCER DE LARINGE
 ND NO DETERMINADO

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu) PROVENIENTES DEL CO-CULTIVO A 20 DIAS CON CELULAS DE TUMOR AUTOLOGO.

TABLA 5

CELULAS BLANCO	CO-CULTIVO EN PRESENCIA DE	
	IL-2	IL-2 + IFN- γ + TNF- α
LSP AUTOLOGOS	0	0
TUMOR CaCu AUTOLOGO (IX)	70	92
TUMOR CaCu HETEROLOGO (VII)	0	17
TUMOR CaCu HETEROLOGO (VIII)	8	2
TUMOR CaCu HETEROLOGO (X)	65	90
CERVIX SANO	0	11
T 3	0	0
InB1	2	13
Hep	3	5

IL-2

INTERLEUCINA-2

IFN- γ INTERFERON- γ TNF- α FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α

T 3 e InB1

LINEAS CELULARES DE CANCER CERVICO UTERINO

Hep

LINEA CELULAR DE CANCER DE LARINGE

Los LSP de la paciente X, que estuvieron en presencia de IL-2 durante el co-cultivo, mostraron porcentajes de citotoxicidad del 62% contra las células del propio tumor, del 56% contra el tumor IX, del 11% contra el cérvix normal y no mostraron respuesta en contra de los tumores VII y VIII, tampoco respondieron en contra de las líneas celulares ni contra los LSP autólogos (Tabla 6).

Por su parte los LSP sometidos al estímulo de IL-2 en combinación con IFN- γ y TNF- α presentaron un 86% de citotoxicidad contra las células del tumor autólogo, un 60% contra el tumor IX y ninguna respuesta contra los tumores VII y VIII; un 10% de citotoxicidad en contra del cérvix normal y de la línea Hep, mientras que no hubo respuesta en contra de la línea InBl, T3 ni contra los LSP autólogos (Tabla 6).

EVALUACION DEL TIPO DE SUBPOBLACION DE LINFOCITOS T GENERADA POR EL CO-CULTIVO DE LSP DE LA PACIENTE VIII EN PRESENCIA DE IL-2, IFN- γ y TNF- α , MEDIANTE EL USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD4 Y ANTI-CD8.

En todas las pacientes, excepto la número VIII, se presentó una respuesta de reconocimiento y lisis en contra de las células tumorales propias. En este punto es pertinente aclarar que de manera general la respuesta citotóxica generada por las células efectoras de esta paciente fue muy baja, comparada con las otras pacientes. El comportamiento de estas células sugiere la posibilidad de que las subpoblaciones de linfocitos T resultantes del estímulo durante el co-cultivo, estuvieran representadas de manera dominante por linfocitos T cooperadores (CD4) lo cual provocaría una disminución en la respuesta lítica dada por un número reducido de células T citotóxicas (CD8).

Con la finalidad de conocer el tipo de subpoblación de linfocitos T presente en el conjunto de células resultantes del co-cultivo con células tumorales autólogas de la paciente VIII, realizamos una prueba de marcaje diferencial para linfocitos CD4 y CD8, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (anti-CD4 y anti-CD8). La evaluación pudo llevarse a cabo solo de manera aproximada, ya que en la preparación hecha se encontró una gran cantidad de desechos celulares que no permitieron una observación clara de las células marcadas, sin embargo es interesante mencionarla aquí, ya que nos será de mucha utilidad en el entendimiento del fenómeno observado.

La observación del marcaje por los anticuerpos monoclonales mostró, como esperábamos, una dominancia de la población de linfocitos CD4 y una cantidad baja de linfocitos CD8.

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (LSP) DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO (CaCu) PROVENIENTES DEL CO-CULTIVO A 20 DIAS CON CELULAS DE TUMOR AUTOLOGO.

TABLA 6

CELULAS BLANCO	CO-CULTIVO EN PRESENCIA DE	
	<i>IL-2</i>	<i>IL-2 + IFN-γ + TNF-α</i>
LSP AUTOLOGOS	0	0
TUMOR CaCu AUTOLOGO (X)	60	86
TUMOR CaCu HETEROLOGO (VII)	0	10
TUMOR CaCu HETEROLOGO (VIII)	9	4
TUMOR CaCu HETEROLOGO (IX)	56	60
CERVIX SANO	12	11
T 3	0	4
InB1	0	4
Hep	0	10

IL-2

INTERLEUCINA-2

IFN- γ INTERFERON- γ *TNF- α* FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α

T 3 e InB1

LINEAS CELULARES DE CANCER CERVICO UTERINO

Hep

LINEA CELULAR DE CANCER DE LARINGE

La preponderancia de linfocitos cooperadores en la población efectora en esta paciente, parece ser la clave de los resultados obtenidos, en los cuales podemos apreciar un decremento considerable en la potencialidad lítica de las células provenientes de los co-cultivos con el tumor autólogo, en comparación con la observada en las otras pacientes.

EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD DE LAS CELULAS DE TUMOR DE LA PACIENTE X A SER ATACADAS POR CELULAS ACTIVADAS A MATAR POR LINFOCINAS (CELULAS LAK).

Los resultados de las pruebas de citotoxicidad mostraron que las células del tumor de la paciente número X fueron lisadas, en diferente grado, tanto por los linfocitos autólogos como por los linfocitos de todas las demás pacientes. Incluso la paciente número VIII, quien presentó una respuesta baja a lo largo de toda la prueba, mostró su más alto grado de lisis en contra de las células de la paciente número X.

La inespecificidad de ataque contra el tumor X sugiere que podría tratarse de un tumor, que a diferencia de los otros, fuera poseedor de una susceptibilidad natural al ataque por células LAK, lo cual es conocido que ocurre en un cierto porcentaje de células transformadas.

Tomando en cuenta que los co-cultivos se hicieron durante 20 días en promedio, consideramos factible la presencia de un pequeño número de células LAK viables y activas dentro de nuestra población final, las cuales podrían estar involucradas en la respuesta lítica observada, en todos los casos, contra las células del tumor X, siempre y cuando este fuera realmente sensible a su ataque.

Para corroborar lo anterior se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad en el cual se probó la capacidad de células LAK de un donador sano para lisar células del tumor X. Se ensayaron las siguientes relaciones de células LAK contra las tumorales: 100:1, 10:1, 1:1, 1:10 y 1:100.

Los resultados indican que en cada una de las relaciones probadas los LSP fueron capaces de lisar al total de las células tumorales (Tabla 7), sin existir diferencia entre las relaciones utilizadas, por lo que se corrobora nuestra sospecha de su alta sensibilidad a células LAK.

TABLA 7

RELACION LAK : CELULA TUMORAL	CITOTOXICIDAD %
100 : 1	100
10 : 1	100
1 : 1	100
1 : 10	100
1 : 100	100

LAK: Células obtenidas a partir de Leucocitos de Sangre Periférica de un donador sano, activados durante cuatro días por IL-2

DETERMINACION DE LA POTENCIA LITICA DE LINFOCITOS
CITOTOXICO-ESPECIFICOS CONTRA EL TUMOR AUTOLOGO DE UNA PACIENTE
CON CaCu.

Los resultados obtenidos han mostrado la posibilidad de tener cantidades considerables de células efectoras capaces de desarrollar una respuesta lítica específica contra células de tumor autólogo. La cantidad final de células citotóxico-específicas depende del número inicial de LSP sembrados en el co-cultivo, y esto a su vez de la disponibilidad de sangre periférica que se tenga de las pacientes. La cantidad de sangre que pueda ser extraída de las pacientes depende del estado general de salud de cada una de ellas. En ocasiones la cantidad obtenida resulta pequeña y por ende el número inicial de LSP con el que se cuenta es de una magnitud similar.

Dada esta situación resulta necesaria la evaluación de la potencia citotóxica de los linfocitos, ya que este dato sería de gran ayuda en el cálculo de la cantidad de sangre requerida para la generación final de un grupo de células efectoras capaces de desarrollar una respuesta en contra de la masa tumoral.

Por esta razón se llevó a cabo una prueba de citotoxicidad, en la cual se eligieron los linfocitos de una paciente que hubieran presentado efecto citotóxico-específico en contra del propio tumor y fueron enfrentados contra diferentes concentraciones de células tumorales autólogas, en relaciones de linfocitos:células tumorales de 100:1, 10:1, 1:1, 1:10 y 1:100 (Tabla 8).

Los resultados muestran que se presentó un efecto lítico óptimo, del 100% de citotoxicidad, en las relaciones de 100 y 10 linfocitos por cada célula tumoral. El efecto disminuyó a un 65% cuando se enfrentó 1 linfocito contra 1 célula tumoral. El porcentaje de lisis continuó descendiendo mientras menor era el número de linfocitos empleados, obteniéndose un 42% de lisis en la relación 1:10 y hasta un 19% cuando se enfrentó 1 linfocito contra 100 células tumorales.

Los resultados anteriores mostraron que la relación 1:10 es la mínima para lograr un resultado óptimo de citotoxicidad, lo cual debe ser tomado en cuenta en el momento de la aplicación terapéutica, ya que el emplear un número menor de linfocitos podría provocar que la lisis de las masas tumorales no se llevara a cabo en un 100%, reduciéndose así la efectividad de la inmunoterapia.

TABLA 8

RELACION LSP : CELULA TUMORAL	CITOTOXICIDAD %
100 : 1	100
10 : 1	100
1 : 1	65
1 : 10	40
1 : 100	20

LSP: Leucocitos de Sangre Periférica

DISCUSION

En la actualidad el desarrollo de la ciencia está basado en el trabajo interdisciplinario, y la posibilidad de aplicaciones prácticas depende, en gran medida, de la capacidad que los investigadores tengan para realizar una labor de conjunto. Así es como las disciplinas jóvenes se unen a aquellas que han venido generándose por siglos, para lograr la creación de una serie de conocimientos con clara tendencia a su aplicación. Este es el caso de la Inmunología que en conjunción con la Biología y la Medicina ha permitido emprender proyectos con el objeto de solucionar problemas de salud que no han podido ser resueltos por la aplicación individual de ellas.

La inmunoterapia contra el cáncer es uno de los más claros ejemplos de la cooperación intercientífica y ha mostrado tener un futuro prometedor, revelado por los éxitos que se han obtenido con su aplicación en el tratamiento del cáncer en muchos países (169). En México, esta terapia innovadora aún no ha sido aplicada, sin embargo ya se están dando los primeros pasos en la investigación básica necesaria para la futura implementación de la inmunoterapia.

En nuestro país el CaCu es un grave problema de salud pública, que año con año cobra un mayor número de víctimas entre las mujeres con enfermedades neoplásicas. Por esta razón y ante la regular efectividad de los métodos terapéuticos tradicionales, y dada la fuerte relación de este cáncer con una etiología viral se ha propuesto como un buen candidato para incluirse en los proyectos pioneros sobre inmunoterapia que se desarrollan en el territorio nacional.

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio, previos a la implementación de la técnica de inmunoterapia, muestran que la transformación maligna en pacientes con CaCu no ha producido cambios en algunas funciones del sistema inmune, ya que se mantiene la respuesta de los linfocitos de estas pacientes ante el estímulo mitogénico dado por citocinas como la IL-2 (170), la cual es una sustancia usada para la inmunoterapia. Se ha observado también que el suero de estas pacientes no presenta

factores que inhiban tal respuesta (170). Se ha reportado que la capacidad proliferativa de los linfocitos extraídos de sangre periférica se mantiene sólo por un período limitado de tiempo, aún en presencia constante de IL-2 (154), lo que resulta poco conveniente desde el punto de vista de la inmunoterapia, pues impediría que las poblaciones citotóxicas obtenidas *in vitro* cumplieran eficazmente con su función lítica *in vivo* por largo tiempo.

En el presente trabajo observamos que la actividad mitótica de los LSP cultivados en presencia de células tumorales se prolongaba con respecto a preparaciones sin dichas células. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos de algunos investigadores que mantuvieron cultivos de LSP humanos a largo plazo sembrados sobre monocapas de células con inmunógenos, como ocurre con las infectadas por virus específicos. El mantenimiento y aumento de la proliferación podría deberse a que las células tumorales expresen un antígeno de origen viral, lo cual estaría induciendo una selección de poblaciones linfocíticas, manteniéndose a través del tiempo sólo las que hubieran adquirido una especial avidez por los antígenos presentes en estas células transformadas, eliminándose las poblaciones con actividad inespecífica (LAK, NK, Monocitos). El grupo de células que reconocen específicamente a los antígenos son conocidas como población T de memoria (156). Estas tienen un tiempo de vida mayor que el de las poblaciones LAK (157), y son capaces de permanecer activos mientras el antígeno, o el factor mitogénico, estén uniéndose a las células T (156). En las condiciones de cultivo usadas en este trabajo, se encuentran presentes de manera constante el antígeno y los mitógenos por lo que se considera la posibilidad de que las poblaciones proliferantes que se observan correspondan al linfocito T de memoria.

Por otro lado la proliferación fue aún mayor cuando los cultivos fueron suplementados simultáneamente con IL-2, IFN- γ y TNF- α . El efecto sinérgico que existe entre estos factores ya había sido demostrado en nuestro laboratorio con LSP de donadores normales y se mantiene cuando los LSP provienen de pacientes con CaCu.

Las poblaciones de LSP que proliferaron mostraron ser citotóxicas, y en cuatro de seis pacientes ésta fue específica en contra de las células del tumor autólogo. Dichas células inmunocompetentes podrían deber su efecto específico a que son células T citotóxicas de memoria, ya que se ha reportado que cuando se estimula un cultivo *in vitro* de LSP con IL-2, misma que es empleada en nuestros ensayos, se produce una proliferación diferencial de las subpoblaciones de linfocitos T, detectándose un importante incremento de las células T de memoria con capacidad lítica (158). Se ha demostrado que en ratones infectados por

virus se pueden encontrar poblaciones de linfocitos T citotóxico-específicos, que lisan a células infectadas, aún en otros ratones, y que conservan su memoria de ataque por tiempo indefinido (156). Estos linfocitos son generados durante los primeros ocho días del contacto con el agente antigénico, participan activamente en el control de la infección y una vez terminada ésta se mantienen en un estado de latencia en la sangre periférica y órganos linfoides, en concentraciones bajas (165). Una exposición ulterior con dicho agente, o bien con IL-2, provoca que proliferen y se alistén para el ataque (165). Esta información hace pensar que las células efectoras provenientes de los co-cultivos son de este tipo.

Por otra parte el no haber detectado citotoxicidad hacia las líneas celulares podría atribuirse a varios factores. En particular, para el caso de la línea de carcinoma de laringe es claro que se trata de un tumor no relacionado al de CaCu, y aunque se ha comprobado la presencia de VPH en esta clase de cáncer, también se ha demostrado que éstos no son del mismo tipo de los que infectan al epitelio cervical (39), por lo tanto no esperaríamos que expresara antígenos similares a los del CaCu, lo que elimina la posibilidad de reconocimiento por parte de las células efectoras específicas. Esto apoya nuestra propuesta de que los linfocitos derivados de los co-cultivos son T de memoria, ya que éstos tienen una capacidad tan fina de reconocimiento, que son capaces de diferenciar entre los antígenos de las subclases de virus de una misma familia (165).

En las líneas derivadas de carcinomas del cérvix, debemos tomar en consideración que se trata de líneas celulares, y se ha reportado que durante largos tiempos de cultivo *in vitro* ocurren cambios importantes, tanto genotípicos como fenotípicos, que pueden influir fuertemente en la expresión de los antígenos (46). Así pues podríamos sospechar que los antígenos reconocidos por los LSP en las células tumorales no se encuentren expresados en las líneas celulares.

Una consideración más que debe hacerse con respecto a la falta de reconocimiento de las líneas celulares derivadas de tumores de CaCu, y que además podría ser una explicación a la observación de que los LSP no lisaron las células tumorales heterólogas, es que el reconocimiento y la lisis de las células tumorales por linfocitos T está mediada por el CMH, cuyas moléculas presentan varios haplotipos; de tal forma que la respuesta por linfocitos T está restringida al reconocimiento específico de uno de estos haplotipos en las células tumorales en asociación con el antígeno viral, o tumoral. Estudios realizados en ratones infectados por virus demuestran que la acción de los T citotóxicos es mediada por el reconocimiento asociado de un haplotipo más el antígeno viral. Esto provoca que se generen lo que se conoce como "pares excluyentes", esto es, que un linfocito

sólo reconocerá a la célula donde se presente el par haplotipo-antígeno que fue reconocido originalmente. La posibilidad de encontrar un par igual es pequeña, provocándose que no exista efecto lítico contra cualquier célula, aunque se encuentre infectada por el mismo virus. Este fenómeno podría manifestarse en nuestros ensayos, y el que no reconozcan los tumores heterólogos sería debido a que éstos presentan un par asociativo (CMH-antígeno) diferente al del tumor ante el cual fueron proliferados y retados.

Al igual que las líneas de CaCu las células normales de cérvix no fueron lisadas por los linfocitos previamente sensibilizados con células de pacientes, lo cual se debe a que las células normales no expresan en su membrana ningún antígeno tumoral que pueda despertar una respuesta inmune. Si se postula que se obtuvieron células T de memoria después del co-cultivo, resulta lógico pensar que sólo responderán ante la presencia del antígeno, viral o tumoral, con el cual fueron retados inicialmente, lo cual puede explicar que no tengan efecto ante aquellas células que carecen del antígeno correspondiente.

Por otra parte no se observó un efecto citotóxico de los linfocitos activados en contra de linfocitos de la propia paciente. Los LSP sin activar representan una población de células sanas autólogas, las cuales no presentan antígenos de membrana que sean similares a los presentados por las células malignas, por lo tanto no son lisadas por los LSP provenientes de los co-cultivos. Se asume que la capacidad citotóxica de las células efectoras es realmente específica y que, de ser aplicadas en inmunoterapia, no dañarían a las células normales de las pacientes.

Los resultados señalan que no todas las pacientes presentan un mismo comportamiento. La paciente no.X tuvo células tumorales que fueron lisadas en un grado similar, tanto por sus propios linfocitos como por los purificados de las otras pacientes. Esta falta de especificidad del efecto lítico contra las células cancerosas puede atribuirse a una alta sensibilidad de este tumor al ataque mediado por células LAK, que pudieron permanecer viables, en números reducidos en los co-cultivos hasta el momento de evaluar la citotoxicidad, provocándose un ataque inespecífico en contra del tumor. En los tumores altamente sensibles a la lisis por LAK un número reducido de éstas es capaz de ejercer un efecto citotóxico notable (115). Por lo que las células LAK persistentes en los co-cultivos que se realizaron en éste trabajo pudieron ser capaces de realizar la lisis de las células tumorales de la paciente X.

La paciente VIII tuvo LSP que mostraron una capacidad lítica débil en todo el ensayo, y se podría suponer que las células originadas a partir de los co-cultivos no poseían capacidad

citotóxica. En los grupos de pacientes involucrados en experimentos dirigidos a la obtención de linfocitos con acción citotóxica, existen algunos en los que no se generan poblaciones de linfocitos con esta capacidad, y al final de los ensayos la población dominante es de linfocitos CD4, o cooperadores, con escasa o nula capacidad lítica. Es probable que en la paciente VIII predominaran los linfocitos CD4, pues en una evaluación cualitativa preliminar de los linfocitos provenientes del co-cultivo mediante la utilización de anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, se observó una dominancia de esta clase de linfocitos.

El efecto lítico de los LSP provenientes de un co-cultivo decrece cuando el número de células inmunocompetentes disminuye con respecto al de células blanco. En este trabajo la relación 1:10 (célula blanco:LSP) fue la mínima para lograr una lisis del 100% de las células tumorales. Extrapolando estos resultados a un modelo *in vivo*, se esperaría que el efecto lítico sobre la masa tumoral estuviera en función del número de células efectoras inoculadas en la paciente. Probablemente este fenómeno se deba a que los mecanismos de lisis de una célula inmunocompetente (secreción de perforinas, TNF- α , etc.) no son suficientes para dañar definitivamente a la célula transformada, la que es capaz de defenderse del ataque por varios mecanismos, como por ejemplo, la generación de resistencia contra los efectos del TNF- α (103). Por lo que resultaría necesaria la presencia de varias células efectoras, que en conjunto pudieran producir y secretar la cantidad adecuada de factores líticos que produjeran, finalmente, la muerte de las células malignas.

Ante las evidencias mostradas en este trabajo, consideramos que estamos en vías de obtener poblaciones de células efectoras, con acción específica contra tumores de CaCu, que en un futuro cercano podrán ser evaluadas en su potencialidad de aplicación clínica.

CONCLUSIONES

1. Los leucocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) que han sido co-cultivados en presencia de células de tumor autólogo, además de proliferar son capaces de generar una respuesta citotóxica específica en contra de las células tumorales.
2. La citotoxicidad, así como el grado de proliferación alcanzada por los LSP co-cultivados en presencia de IL-2, IFN- γ y TNF- α es mayor a la presentada por aquellos que fueron co-cultivados solamente con IL-2. Las dosis de los moduladores fueron 10 veces menores que al usarse separadamente.
3. Los linfocitos efectores producidos durante los co-cultivos no tienen efecto citotóxico sobre LSP autólogos frescos.
4. Las poblaciones citotóxicas poseen especificidad de ataque en contra de las células del tumor autólogo y son incapaces de reaccionar en contra de tumores heterólogos y líneas celulares.

BIBLIOGRAFIA

1. Pott, P. (1775). Chirurgical Observations Relative to the Cataract, the Polypus of the Nose, the Cancer of the Scrotum, the Different Kinds of Ruptures, and the Mortification of the Toes and Feet. James, Clarke and Clive, London.
2. Bell, R. (1876) Paraffin epithelioma of the scrotum. Edimburg Journal, 22:135.
3. Case, R.A.M. and Hosker, M.E. (1954). Tumour of the urinary bladder as an occupational disease in the rubber industry in England and Wales. Br. J. Ind. Med. 8:39.
4. Case, R.A.M., Hosker, M.E., McDonald, D.B. and Pearson, J.T. (1954). Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine. Br. J. Ind. Med. 11:75.
5. Henry, S.A. (1946). Cancer of the Scrotum in Relation to Occupation. Oxford University Press, London.
6. Henry, S.A. (1947). Occupational Cancer Attributable to Certain Chemicals in Industry. Br. Med. Bull. 4:389.
7. Yamagiwa, K. and Ichikawa, K. (1918). Experimental Study of the Pathogenesis of Carcinoma. J. Cancer Res. 3:1.
8. Cook, J.W., Hieger, I., Kenneway, E.L. and Mayneord, W.V. (1932). The Production of Cancer by Pure Hydrocarbon part I. Proc. R. Soc. B. 111:455.
9. Wilson, R.H., DeEds, F. and Cox, A.J. (1941). The Toxicity and Carcinogenic Activity of 2-acetaminofluorene. Cancer Res. 1:595.
10. Wattenberg, L.W. (1978). Guest Editorial: Inhibition of Chemical Carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 60:11.

131905

11. Statutory Instruments. (1953). Carcinogenic Substances (Aromatic Amines). Order No. 1740. H.M. Stationary Office, London.
12. U.S. Food and Drug Act. (1958). Public Law 85-929. 85th. Congress, HE 13254, September 6 1958.
13. Clayson, D.B., Krewsky, D. and Munro, I. (1985). Toxicological Risk Assessment, Vol. I. Biological and Statistical Criteria. CRC Press, Boca Raton, Florida.
14. Clayson, D.B., Krewsky, D. and Munro, I. (1985). Toxicological Risk Assessment, Vol. II. General Criteria and Case Studies. CPC Press, Boca Raton, Florida.
15. Wynder, E.L. and Graham. E.A. (1950) Tobacco smoking as a possible etiological factor in bronchiogenic carcinoma. J. Am. Med. Assoc. 113:329.
16. Wigle, D.T., Collishaw, N.E., Kirkbride, J. and Mao, Y. (1987). Deaths in Canada from lung cancer due to involuntary smoking. Canc. Med. Assoc. J. 136:945.
17. Wigle, D.T., Collishaw, N.E., Kirkbride, J. (1987). Exposure of involuntary smokers to toxic components of tobacco smoke. Canc. J. Public Hlth. 78:151.
18. Clayson, D.B. (1990). The Prevention of Cancer. Introduction: An overview of current and anticipated methods for cancer prevention. Cancer Letters. 50:3.
19. Stern. P. (1991). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. From: Paterson Symposium No. 26. 28-30th October 1991. Manchester, England.
20. Rommery, S.L. et. al. (1980). Gynecology and Obstetrics: The Health Care of Women. 2a. Mc. Graw-Hill.
21. Krupp, M.A., Chatton, M.J. (1982). Diagnóstico Clínico y Tratamiento. 17a. Ed. El Manual Moderno, S.A. 1324 pp.
22. Thorn, G.W., Adams, R.D. et. al. (1979). Medicina Interna de Harrison. 5a. Ed. La Prensa Médica Mexicana, S.A. 2499 pp.
23. Haley, N.J., Hoffmann, D., Wynder, E.L. (1986). Uptake of tobacco smoke components. In: Hoffmann, D., Harris, C.C., eds. Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 186:3.

24. Slattery, M.L., Robinson, L.M., Schuman, K.L., et. al. (1989). Cigarette smoking and exposure to passive smoke are risk factors for cervical cancer. *JAMA*. 261:1593.
25. Vessey, M.P., Lawless, M., McPherson, K., and Yeates, D. (1983). Neoplasia of the cervix uteri and contraception: a possible adverse effect of the pill. *Lancet*, II, p.930.
26. Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptive. (1985). Invasive cervical cancer and combined oral contraceptives. *Brit. Med. J.* 290:961.
27. Brinton, A.L., Huggins, G.R., Lehman, H.F., Mallin, K., Savitz, D.A., Trapido, E., Rosenthal, J. and Hoover, R. (1986). Long-Term Use of Oral Contraceptives and Risk of Invasive Cervical Cancer. *Int. J. Cancer*. 38:339.
28. McNab, J. (1991). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. From: Paterson Symposium No.26. 28-30th October, 1991. Manchester, England.
29. Rulison, R.H. (1942). Spontaneous regression of human papillomas. *Arch. Dermatol. Syphilol.* 46:66.
30. Massing, A.M. and Epstein, W.L. (1963). Study of Human Papilloma Virus lesions. *Arch. Dermatol.* 87:306.
31. Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K. and Howley, P.M. (1988). Benignant human larynx lesions and Human Papilloma Virus type 6. *Cell*. 53:539.
32. Kanda, T., Watanabe, A. y Yoshiike, K. (1988). Different human lesions are caused by the family of Human Papilloma Virus. *Virology*. 165:321.
33. Orth, G., Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., Jablonska, S., Obalek, S., Jarzabek-Chorslezka, M. and Rzeska, G. (1980). Skin cancer and human papilloma virus. *Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation*. 7:259.
34. Orth, G. (1986). Human Papilloma Virus is a high risk factor in skin cancer. *Ciba Fund. Symp.* 120:157.
35. Zur Hausen, H. (1988). Prevalence of Human Papilloma Virus type 16 and 18 in cervical cancer. *Mol. Carcinogenesis*. 8:147.
36. Walboomers, J. and Schiffman, M. (1991). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. From: Paterson Symposium No.26, 28-30th October, 1991. Manchester, England.

37. Sousa, R., Dostanti, N. and Yaniv, M. (1990). Control of papillomavirus gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1032:19.
38. Peto, R. and Zur Hausen, H. (ed). (1986). *Viral etiology of cervical cancer*. 21, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
39. Jenson, A.B. and Lancaster, W.D. (1990). Association of human papillomavirus with benign, premalignant, and malignant anogenital lesions. In: H. Pfister (ed), *Papillomaviruses and human cancer*, p. 11. CRC Press, Boca Raton.
40. Reeves, W.C., Caussy, D., Briton, L.A., and Rawes, W.E. (1987). Case-control study of human pailomaviruses and cervical cancer in Latin America. *Int. J. Cancer*. 40:450.
41. Morrison, E., Ho, G., Vermund, S., Goldberg, G., Kadish, A., Kelley, K. and Burk, R. (1991). Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int. J. Cancer*. 49:6.
42. Tak, W., Munzenrider, J. and Mitchell, G. (1979). External irradiation and one radium application for carcinoma of the cervix. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 5(1):29.
43. Prempre, T., et. al. (1982). Radiation treatment of carcinoma of the cervix with extension into the endometrium. *Cancer*. 49:20.
44. Gómez, G., Fuentes, F., Guadarrama, F. y Mota, G. (1991). Estudio comparativo de dos diferentes técnicas de radioterapia utilizadas para el tratamiento de cáncer cérvico uterino en el Instituto Nacional de Cancerología. *Cancerología* 37(1):1239.
45. Robbins, S., Cotran, R. and Kumar, V. (1984). Neoplasia. In: *Pathologic Basis of Disease*. Chap. 6, 3rd. ed., p. 214.
46. Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J. and Weiner, A. (1987). The genetic Basis of cancer. In: *Molecular Biology of the Gene*. Vol.2, Chap. 26. p.1006. Benjamin-Cummings.
47. Farber, E. and Camerson, R. (1980). The sequential analysis of cancer development. *Adv. Cancer Res.* 31:125.
48. Snell, G. (1981). *Studies in histocompatibility*. Science. 213:172.

49. Koch, S., Zaleberg, J. and McKenzie, I. (1984). Description of a murine B lymphoma tumor-specific antigen. *J. Immunol.* 133:1070.
50. Carswell, E., Wanebo, H., Old, L. and Boyse, E. (1970). Immunogenic properties of reticulum cell sarcomas of SJL/J mice. *J. Natl. Cancer. Inst.* 44:1281.
51. Baldwin, R. (1966). Tumor-specific immunity to spontaneous rat tumors. *Int. J. Cancer.* 1:257.
52. Klein, G. and Klein, E. (1977). Immune surveillance against virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:2121.
53. Hewitt, H., Blanke, E. and Walder, A. (1976). A critique of the evidence for active host defense against cancer based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer.* 33:241.
54. Middle, J. and Embelton, M. (1981). Naturally arising tumors of the inbred WAB/Not rat strain. II. Immunogenicity of transplanted tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 67:637.
55. Hewitt, H.B. (1978). The choice of animal tumors for experimental studies on cancer therapy. *Adv. Cancer Res.* 27:149.
56. Lloyd, K. (1987). Philip Levine award lecture. Blood group antigens as markers for normal differentiation and malignant change in human tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 87:129.
57. Uriel, J. (1979). Retrodifferentiation and fetal patterns of gene expression in cancer. *Adv. Cancer Res.* 29:127.
58. Nadler, L., Stashenko, P., Reinherz, E., Ritz, J., Hardy, R. and Scholssman, S. (1982). Expression of normal differentiation antigens on human leukemia and lymphoma cells. In : *Malignant Lymphomas. Etiology, Immunology, Pathology, Treatment.* Bristol-Myers Cancer Symposia, edited by S.A. Rosenberg and H. Kaplan. Vol.3, p.107.
59. O'Connell, K. and Gooding, L. (1984). Cloned cytotoxic T lymphocytes recognize cells expressing discrete fragments of the SV40 tumor antigen. *J. Immunol.* 132:953.

-
60. Gomard, E., Henin, Y., Colombani, M. and Levy, J. (1980). Immune response genes control T killer cell response against Moloney tumor antigen. Cytolysis regulating reactions against the best available H-2 + viral antigen association. *J. Exp. Med.* 151:1468.
 61. Stevenson, H. Editor. (1989). *Adoptive Cellular Immunotherapy of Cancer*. Marcel Dekker, Inc.
 62. Fink, M. (1976). *The macrophage in neoplasia*. Academic Press, New York.
 63. Nelson, D., Hopper, K. and Nelson, S. (1977). Role of the macrophage in resistance to cancer. *Handbook of Cancer Immunology* (ed. by H. Waters). Garland Publishing Co.
 64. Keller, R. (1973). Cytostatic elimination of syngeneic rat tumor cells in vitro by nonspecifically activated macrophages. *J. Exp. Med.* 138:625.
 65. Hibbs, J. Jr. (1974). Discrimination between neoplastic and non-neoplastic cells in vitro by activated macrophages. *J. Nat. Cancer Inst.* 53:1487.
 66. Evans, R. and Alexander, P. (1976). Mechanisms of extracellular killing of nucleated mammalian cells by macrophages. *Immunobiology of the Macrophage*. (ed. by D.S. Nelson) p.535. Academic Press.
 67. Zarling, J. and Tevethia, S. (1973). Transplantation immunity to Simian Virus 40-transformed cells in tumor-bearing mice. II. Evidence for macrophage participation at the effector cell level of tumor cell rejection. *J. Nat. Cancer Inst.* 50:149.
 68. Keller, R. (1976). Promotion of tumor growth in vivo by anti-macrophage agents. *J. Nat. Cancer Inst.* 57:1355.
 69. Nelson, D., Shneider, C. and Penrose, J. (1976). Inhibition of lymphocyte transformation by products of macrophages and others cells. *The role of mitogens in Immunobiology*. (Oppenheim and Rosenstreich editors). Academic Press, New York. p.477.
 70. Stevenson, H., Foon, K. and Sugarbaker, P. (1986). Ex vivo activated monocytes in adoptive immunotherapy trials in colon cancer patients. *Prog. Clin. Biol. Res.* 211:75.
 71. Oldham, R. (1982). Natural killer cells: History and significance. *J. Biol. Response Mod.* 1:217.

72. Timonen, T., Ortaldo, J., Herberman, R. (1981). Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and T cells. *J. Exp. Med.* 153:569.
73. Yamada, T., Fujishima, A., Kawahara, K., Kato, K. and Nishimura (1987). Importance of disulfide linkage for constructing the biologically active human interleukin-2. *Arch. Biochem. Biophys.* 257:194.
74. Robb, R. (1984). Interleukin-2: the molecule and its function. *Immunology Today.* 5:203.
75. Krönke, M., Leonard, W. and Depper, M. (1984). Cyclosporin inhibits T cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:5214.
76. Weib, J., Schwinzer, B., Kirchner, H., Gemsa, D. and Resch, K. (1986). Effects of cyclosporin A on functions of specific murine T cell clones: inhibition of proliferation, lymphokine secretion and cytotoxicity. *Immunobiology.* 171:234.
77. Smith, F. and Ruscetti, F. (1981). T cell growth factor and the culture of cloned functional T cells. *Adv. Immunol.* 31:137.
78. Cederig, R., Lowenthal, J., Nabholz, M. and MacDonald, H. (1985). Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker on intrathymic stem cells. *Nature.* 314:98.
79. Habu, S., Okumura, K., Diamantstein, T. and Shevach, E. (1985). Expression of interleukin-2 receptor on murine fetal thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 15:456.
80. Raulet, D. (1985). Expression and function of interleukin-2 receptors on immature thymocytes. *Nature.* 314:101.
81. Chu, E., Rosenwasser, L., Dinarello, C., Lareau, M. and Geha, R. (1984). Role of interleukin-1 in antigen-specific T cell proliferation. *J. Immunol.* 132:1311.
82. Jacques, Y., Le Mauff, B., Godard, A., Olive, D., Moreau, J. and Soulillou, J. (1986). Regulation of interleukin-2 receptor expression on a human cytotoxic T lymphocyte clone, synergism between alloantigenic stimulation and interleukin-2. *J. Immunol.* 136:1693.

83. Howard, M., Matis, L., Malek, T., Shevach, E., Kell, W., Cohen, D., Nakanishi, K. and Paul, W. (1983). Interleukin-2 induces antigen-reactive T cell lines to secrete BCGF-1. *Exp. Med.* 158:2024.
84. Miedema, F., Vanoostve, J., Aarden, L. and Melief, C. (1985). Induction of immunoglobulin-synthesis by interleukin-2 is $T4^+/T8^-$ cell dependent- a role for interleukin-2 in the pokeweed mitogen-driven system. *Eur. J. Immunol.* 15:107.
85. Farrar, J., Benjamin, W., Hilfiker, M., Howard, M., Farra, W. and Fuller-Farra, J. (1982). The biochemistry, biology, and role of interleukin-2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming cell responses. *Immunol. Rev.* 63:129.
86. Hu, J., Vaquero, C., Huet, S., Bernard, A. and Sterkes, G. (1987). Interleukin-2 up-regulates its own production. *J. Immunol.* 139:4109.
87. Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 147:258.
88. Stewart, W. (1979). The interferon system. Springer, Vienna, New York.
89. Branca, A., Faltynek, C., D'Allesandro S. and Biglioni, C. (1982). Interaction of interferon with cellular receptors. internalization and degradation of cell-bound interferon. *J. Biol. Chem.* 257:13291.
90. Zullo, J. and Stiles, C. (1985). Platelet-derived growth factor and double stranded ribnucleic acids stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. *Cell.* 43:793.
91. Burke, D. (1986). Interferon and cell differentiation. *Br. J. Cancer.* 53:301.
92. Balkwill, F. (1985). Antitumor effects of interferons in animals. In: Finter NB, Oldham R. (eds) Interferon: in vivo and clinical studies. p.23.
93. Habenicht, A (ed). (1990). Growth factors, differentiation factors, and cytokines. p.243.
94. Balkwill, F., Osborne, R., Burke, F., Naylor, S., Talbot, D., Durbin, H., Tavernier, J. and Fiers, W. (1987). Evidence for tumour necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet* 2:1229.

95. Fransen, L., Ruyschaert, R. and Fiers, W. (1986). Recombinant tumor necrosis factor: Its effects and its synergism with interferon- γ on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur. J. Cancer Oncol.* 22:419.
96. Haranaka, K. and Satomi, N. (1981). Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cells in vitro. *Jpn. J. Exp. Med.* 51:191.
97. Ruggiero, V., Latham, K. and Baglioni, C. (1987). Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. *J. Immunol.* 138:2711.
98. Sugarman, B. and Shepard, H. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science.* 230:943.
99. Blick, M., Sherwin, S., Rosenblum, M. and Gutterman, J. (1987). Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res.* 47:2986.
100. Creaven, P., Plager, J. and Proefrock, G. (1987). Phase I clinical trial recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 20:137.
101. Kimura, K., Taguchi, T. et. al. (1987). Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 20:223.
102. Sherman, M., Spriggs, S. and Kufe, D. (1988). Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J. Clin. Oncol.* 6:344.
103. Bethan, C, Mutch, G. and Collins, L. (1990). Common expression of a tumor necrosis factor resistance mechanism among gynecological malignancies. *Cancer Immunol. Immunother.* 32:131.
104. Ray, P. (1980). Suppressor control as a modality of cancer treatment: Perspectives and prospects in the immunotherapy of malignant disease. *Plasma Ther. Transfusion Technol.* 3:101.
105. Ray, P. Raychard-Luri, S. (1982). Immunotherapy of cancer: Present status and future trends. In: Ray P.K. (ed).: *Immunobiology of Transplantation, Cancer and Pregnancy.* pp. 183.
106. Oldham, R. (1984). Biologicals and biological response modifiers:: The fourth modality of cancer treatment. *Cancer Treat. Rep.* 68:221.

-
107. Oldham, R., Smallley, R. (1984). Immunotherapy: The old and the new. *J. Biol. Response Mod.* 2:1.
 108. Fefer, A. (1971). Immunotherapy of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 47:171.
 109. Fer, M., Beman, J., Stevenson, H., et. al. (1984). A trial of autologous plasma perfusion over protein A in patients with breast cancer. *J. Biol. Response Mod.* 3:352.
 110. Foon, K., Maluish, A., Abrams, P., et.al. (1984). Recombinant leukocyte α -interferon therapy for advanced hairy cell leukemia: Therapeutic and immunologic results. *Am. J. Med.* 80:351.
 111. Foon, K., Sherwin, S, Abrams, P., et. al. (1984). Recombinant leukocyte α -interferon: An effective agent for the treatment of advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 311:1148.
 112. Kyogo, I., Tilden, A., Kumagai, K., et. al. (1985). Leu 11⁺ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin-2 (rIL-2)-induced activated killer (AK) cells. *J. Immunol.* 134:802.
 113. Rosenberg, S. (1985). Lymphokine activated killer cells: a new approach to the immunotherapy of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 75:595.
 114. Rosenberg, S. (1986). Adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. In: DeVita, V., Hellman, S. Rosenberg, S. eds. *Important Advances in Oncology.* p. 55.
 115. Rosenberg, S. (1987). The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2. *Ann. Surg.* 208:121.
 116. Cameron, R., McIntosh, J., Rosenberg, S. (1988). Synergistic antitumor effects of combination immunotherapy with recombinant interleukin-2 and a recombinant hybrid interferon-alpha in the treatment of established murine hepatic metastases. *Cancer Res.* 48:5810.
 117. McIntosh, J., Mule, J., Merino, M., et. al. (1988). Synergistic antitumor effects of immunotherapy with recombinant interleukin-2 and recombinant tumor necrosis factor-a. *Cancer Res.* 48:4011.

118. Lafreniere, R., Rosenberg, S. (1985). Adoptive immunotherapy of murine hepatic metastases with lymphokine activated killer (LAK) cells and recombinant interleukin-2 (RIL-2) can mediate the regression of both immunogenic and non-immunogenic sarcomas and an adenocarcinoma. *J. Immunol.* 135:4273.
119. Papa, M., Mule, J. and Rosenberg, S. (1986). The antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo: successful immunotherapy of established pulmonary metastases from weakly- and non-immunogenic murine tumors of three distinct histologic types. *Cancer Res.* 46:4973.
120. Rosenberg, S., Spiess, P. and Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 223:1318.
121. Rosenberg, S., Lotze, T., et. al. (1989). Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Annals of Surgery.* 210(4):474.
122. Williamson, B.D., Carswell, E., Rubin, B. and Old, L.J. (1983). Human tumour necrosis factor produced by human B-cell lines: Synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 80:5397.
123. Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass P.E., Figari, I.S. and Palladino, M.A. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor- α : Effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science.* 230:943.
124. Balkwill, F.R., Lee, A., Aldam, G. et. al. (1986). Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res.* 46:3990.
125. Schiller, J.H., Groveman, D.S. Schmid, S.M. Wilson, J.K. and Borden, E.C. (1986). Synergistic antiproliferative effects of human recombinant α 54- or β ser interferon with γ -interferon on human cell lines of various histogenesis. *Cancer Res.* 46:483.
126. Schiller, J.H. Wilson, J.K., Bittner, G. Wolberg, W.H. Hawkins, M.J. and Borden, E.C. (1986). Antiproliferative effects of interferons on human melanoma cells in the human tumor colony-forming assay. *J. Interferon Res.* 6:615.
127. Trotta, P.P., Harrison, S.D. Jr. (1987). Evaluation of the antitumor activity of recombinant human γ -interferon employing human melanoma xenografts in athymic nude mice. *Cancer Res.* 47:5347.

128. Rubin, B.Y., Gupta, S.L. (1980). Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 77:5928.
129. Ijzermans, J.N., Marquet, R.L. Bouwmann, E., van der Meide P.H. (1987). Successful treatment of colon cancer in rats with recombinant interferon-gamma. Br J Cancer. 56:795.
130. Feinman R, Henriksen-DeStefano, D., Tsujimoto, M., Vilcek, J. (1987). Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. J Immunol. 138:635.
131. Nathan, C.F., Horowitz, C.R., de la Harpe, J., et. al. (1985). Administration of recombinant interferon γ to cancer patients enhances monocyte secretion of hydrogen peroxide. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 82:8686.
132. Paulnock, D.M., Havlin, K.A., Storter, B.M., Spear, G.T. (1989). Induced proteins in human peripheral mononuclear cells over a range of clinically tolerable doses of interferon gamma. J Interferon Res. 9:457.
133. Schiller, J.H., Storer, B.E., Witt, P.L. et. al. (1991). Biological and clinical effects of intravenous tumor necrosis factor-alpha administered three times weekly. Cancer Res. 51:1651.
134. Talmadge, J., Tribble, H.R., Pennington, R.W., Phillips, H., Wiltrout, R.H. (1987). Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of recombinant interferon and recombinant tumor necrosis factor in mice. Cancer Res. 47:2563.
135. Ostensen, M.E., Thiele, D.L., Lipsky, P.E. (1987). Tumor necrosis factor- α cytolytic activity of human natural killer cells. J. Immunol. 138:4185.
136. Talmadge, J.E., Herberman, R.B., Chirigos, A., et. al. (1985). Hyporesponsiveness to augmentation of murine natural killer cell activity in different anatomical compartments by multiple injections of various immunomodulators including recombinant interferons and interleukin-2. J. Immunol. 135:2483.
137. Basham, T.Y., Merigan, T.C. (1983). Recombinant interferon- γ increases HLA-DR synthesis and expression. J. Immunol. 130:1492.
138. Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Kronke, M. (1987). Tumor necrosis factor enhances HLA-A, B, C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. J. Immunol. 138:975.

139. Spriggs, D.R., Sherman, M.L., Michie, H. et. al. (1988). Recombinant human tumor necrosis factor administered as a 24-hour intravenous infusion: A phase I and pharmacologic study. *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1039.
140. Vadhan-Raj, S., Al-Katib, A., Bhalla, R. et. al. (1986). Phase I trial of recombinant interferon gamma in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 4:137.
141. Kurzrock, R., Quesada, J., Talpaz, M. et. al. Phase I study of multiple dose intramuscularly administered recombinant gamma interferon. *J. Clin. Oncol.* 4:1101.
142. Lee, S.H., Aggarwal, B.B., Rinderknecht, E., Assisi, F. (1984). The synergistic anti-proliferative effect of γ -interferon and human lymphotoxin. *J. Immunol.* 133:1083.
143. Schiller, J.H., Bittner, G., Storer, B., Willson, J. (1987). Synergistic antitumor effects of tumor necrosis factor and γ -interferon on human colon carcinoma cell lines. *Canc. Res.* 47:2809.
144. Hori, K., Ehrke, M., Mace, K., Mihich, E. (1987). Effect of recombinant tumor necrosis factor on tumoricidal activation of murine macrophages: Synergism between tumor necrosis factor and γ -interferon. *Cancer Res.* 47:5868.
145. Williams, T., Bellanti, J. (1983). *In vitro* synergism between interferons and human lymphotoxin: Enhancement of lymphotoxin-induced target cell killing. *J. Immunol.* 130:518.
146. Lu, L., Walker, D., Graham, C.D., Waheed, A. (1988). Enhancement of release from MHC class II antigen-positive monocytes of hematopoietic colony stimulating factors CSF-1 and G-CSF by recombinant human tumor necrosis factor-alpha: Synergism with recombinant human interferon gamma. *Blood.* 72:34.
147. Schiller, J., Witt, P., Storer, B., et. al. (1992). Clinical and Biologic Effects of Combination Therapy With Gamma-Interferon and Tumor Necrosis Factor. *Cancer.* 69(2):562.
148. Scheurich, P., Thomas, B., Ucer, U. and Pfizenmaier, K. (1987). Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: Induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *J. Immunol.* 138:1786.

149. Owen-Schaub, L., Gutterman, J. and Grimm, E. (1985). Synergy of TNF in the activation of human cytotoxic lymphocytes. Tumor necrosis factor is synergistic with interleukin-2 in the generation of human lymphokine activated killer cell cytotoxicity. *Cancer Research*. 48:788.
150. Beutler, B., Milsark, I. and Cerami, E. (1985a). Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J. Immunol*. 135:3972.
151. Ruggiero, V., Latham, K. and Baglioni, C. (1987). Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. *J. Immunol*. 138:2711.
152. Owen-Schaub, L. and Grimm, E. (1989). Lymphokine-activated killer lymphocytes: Evidences for regulation of induction and function by multiple cytokines. In: *Adoptive Cellular Immunotherapy of Cancer*. Edited by H. Stevenson. p. 19.
153. Ruscetti, F., Morgan, D. and Gallo, R. (1977). Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *J. Immunol*. 119:131.
154. Boylston, G. and Anderson, R. (1980). Continuous culture of human lymphocytes. *J. Immunol. Methods*. 39:39.
155. Rosenberg, S., Schwartz, S. and Spiess, P. (1978). In vitro growth of murine T cells II. Growth of in vitro sensitized cells cytotoxic for alloantigens. *J. Immunol*. 121:1951.
156. Reiss, C., et. al. (1980). Development and characterization of allospecific long-term human cytolytic T cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 77:5432.
157. Spits, H., de Vries, J. and Terhorst, L. (1981). A permanent human cytotoxic T cell line with high killing capacity against a lymphoblastoid B-cell line shows preference of HLA-A, B target antigens and lacks spontaneous cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 59:435.
158. Rosenberg, S. and Grimm, E. (1982). Production and properties of human IL-2. In: *Isolation, characterization and utilization of T lymphocyte clones*. Ed. by C. Garrison Fathman. Ac. Press.
159. Roopenian, D.C., Widmer, C.G., and Bach, F.H. (1983). Helper cell-independent cytolytic T lymphocytes specific for a minor histocompatibility antigen. *J. Immunol*. 130:542.
160. Widmer, M. and Bach, F. (1981). Antigen-driven helper cell independent cloned cytolytic T lymphocytes. *Nature*. 294:750.

-
161. Buller, R., Holmes, K., Hugion, A., Frederickson, N. and Morse H. (1987). Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature*. 328:77.
 162. Cassell, D. and Forman, J. (1988). Linked recognition of helper and cytotoxic antigenic determinants for generation of cytotoxic T lymphocytes. *Ann. NY Acad. Sci.* 532:51.
 163. Cassell, D. and Forman, J. (1991). Two roles for CD4 cells in the control of the generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 146(1):3.
 164. Barth, R., Mulé, J., Spiess, J. and Rosenberg, S. (1991). Interferon γ and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 173:647.
 165. Jamieson, B. and Ahmed, R. (1989). T cell memory. Long-term persistence of virus-specific cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* 169:1993.
 166. Hood, L., Weissman, J., Wood, W. and Wilson, J. (1984). *Immunology*. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., U.S.A. 558p.
 167. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. (1986). *Immunology*. The C.V. Mosby Co. St. Louis Toronto, Canada.
 168. Winkelstein, A., Weaver, D., Salva, N. and Machen, L. (1990). Interleukin-2-induced lymphoproliferative responses. *Cancer Immunol. Immunother.* 32:110.
 169. Dillman, R., Oldham, R., Tauer, K., Orr, D., Barth, N., Blumenschein, G., Arnold, J., Birch, R. and West, W. (1991). Continuous interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for advanced cancer: a national biotherapy study group trial. *J. Clin. Oncol.* 9:1233.
 170. Rocha, Z. (1990) Evidencias de que los leucocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer cérvico uterino conservan su capacidad de proliferar en presencia de interleucina-2 y de que el suero de estas pacientes no contiene un factor inhibidor de tal respuesta. Tesis de licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

APENDICES

APENDICE 1

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO
EAGLE MEDIUM (EM)

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen demedio total deseado, utilizando para ello dos matraces. Se adicionan 13.4 g/l de EM en polvo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Chem. U.S.A.) agitándose suavemente, se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin. Se complementa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del ideal, que es 7.2, empleando para ello ácido clorhídrico diluido y se esteriliza por filtración con membrana de poro de 0.22 micras.

COMPOSICION DEL EM

<i>Aminoácidos</i>	<i>Concentración (mg/l)</i>
L-arginina	84.00
L-cistina	62.57
L-glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-histidina	42.00
L-isoleucina	105.00
L-leucina	105.00
L-lisina	146.00
L-metionina	30.00
L-fenialanina	66.00
L-serina	42.00
L-treonina	95.00
L-triptofano	16.00
L-tirosina (sal disódica)	104.20
L-valina	94.00

Vitaminas

D-Ca Pantotenato	4.00
Cloruro de Colina	4.00
Acido Fólico	7.20
Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxal	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina	4.00

Sales Inorgánicas

Cloruro de Calcio Anhidro	200.00
Nitrato de Hierro III nonhidratado	0.10
Cloruro de Potasio	400.00
Sulfato de Magnesio anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.00
Fosfato Monosódico monohidratado	125.00

Otros Compuestos

L-glucosa	4500.00
Rojo Fenol	15.00

APENDICE 2

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO
RPMI-1640

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

A la solución obtenida se le adicionan 2.0 g de bicarbonato de sodio o 26.7 ml de solución de bicarbonato de sodio al 75% por cada litro de volumen final de medio a prepararse. El medio en su presentación comercial contiene ya el aminoácido L-glutamina, sin embargo, el cultivo de células linfoides requiere de una mayor concentración del mismo. Por tal motivo, en esta etapa de la preparación se adiciona L-glutamina (Sigma, Chem. U.S.A.) en una concentración 2mM. La agitación es útil para la total disolución de estos compuestos.

Se ajusta la solución a pH 7.2-7.4 a 20°C usando, para este fin, una solución concentrada de hidróxido de sodio. Se adiciona la cantidad de agua requerida para completar el volumen final y se esteriliza la solución filtrándola con membranas de poro de 0.22 micras.

COMPOSICION DEL RPMI-1640

<i>Sales Inorgánicas</i>	<i>Concentración (g/l)</i>
Nitrato de Calcio 4H ₂ O	0.100
Sulfato de Magnesio anhidro	0.04884
Cloruro de Sodio	6.0
Fosfato Dibásico de Sodio anhidro	0.8

Aminoácidos

L-arginina	0.2
L-asparagina	0.050
L-ácido aspártico	0.20
L-cistina 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.300
Glicina	0.10
L-histidina	0.015
L-hidroxiprolina	0.020
L-isoleucina	0.050
L-leucina	0.050
L-lisina HCl	0.040
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.020
L-serina	0.030
L-treonina	0.020
L-triptofano	0.005
L-tirosina	0.02883
L-valina	0.020

Vitaminas

D-biotina	0.0002
Cloruro de Colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Acido-p-Amino Benzóico	0.001
Acido-D-Pantoténico	0.00025
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B-12	0.000005

Otros

D-Glucosa	2.00
Glutation reducido	0.001
HEPES	5.958
Rojo Fenol	0.0053

APENDICE 3

PREPARACION DE VERSENO

A 800 ml de agua bidestilada se adicionan las siguientes sustancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g/l)
Tris Base	3.04
Cloruro de Sodio	8.00
Cloruro de Potasio	0.40
Etilén-diamín-tetra-acético (EDTA)	0.20

Posteriormente se agitan perfectamente los compuestos con el agua y se afora a 1 l con agua bidestilada, ajustándose el pH a 7.7 con ácido clorhídrico 10 N y se esteriliza en autoclave a 20 lb de presión durante 20 minutos.

APENDICE 4**PREPARACION DE ENZIMAS****COLAGENASA**

La solución de colagenasa al 0.05% se prepara disolviendo 0.05 g de collagenase type IV (Sigma Chem. U.S.A.) y 0.1 g de glucosa anhidra en 100 ml de verseno. La solución final se esteriliza mediante el uso de filtros de membrana millipore de 0.22 micras. Para facilitar su manejo, la solución estéril se distribuye en tubos pequeños y se almacena a -4°C para evitar su autodigestión.

HIALURONIDASA

La solución de hialuronidasa al 0.01% se prepara disolviendo hyaluronidase (Sigma Chem. U.S.A.) y 0.01 g de glucosa anhidra en 100 ml de verseno. La esterilización y almacenaje son similares a los de la colagenasa.

DNasa.

La solución de DNasa al 0.002% se prepara disolviendo DNasa (Sigma Chem. U.S.A.) y 0.01 g de glucosa anhidra en 100 ml de verseno. La esterilización y almacenaje son similares a los de la colagenasa.

APENDICE 5

PREPARACION DE LA SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS
(PBS)

En 1 l de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de Sodio	8.00
Fosfato de Sodio Monobásico	2.16
Fosfato de Potasio	0.20
Cloruro de Potasio	0.20

Una vez disueltas las sustancias, se ajusta el pH a 7.2 con ácido clorhídrico y se esteriliza la solución por medio de autoclave por 20 minutos a 20 lb de presión.

APENDICE 6

PREPARACION DE LA SOLUCION AMORTIGUADORA (SALINA) DE BORATOS

En un litro de agua bidestilada (la destilación se debe llevar a cabo en destiladores de vidrio) se disuelven las siguientes sustancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g)
Acido Bórico	6.19
Borato de Sodio	9.54
Cloruro de Sodio	4.39

Esta solución debe ser aforada a 1000 ml.

APENDICE 7

PREPARACION DE LA SOLUCION PBS-TWEEN

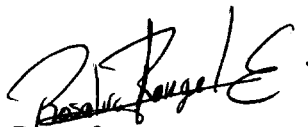
En un litro de agua destilada se disuelven las siguientes substancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g)
Cloruro de Sodio	8.0
Fosfato de Potasio	0.2
Fosfato de Sodio monobásico	2.9
Cloruro de Potasio	0.2
Tween 20	0.5

Se ajusta el pH a 7.4 y se almacena a 4°C.


El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 10 de Septiembre de 1992.

TUTOR



M. en C. Rosalva Rangel Corona

ASESORES



Dr. ~~Benny Weiss Steider~~



Dr. Rubén Darío Martínez Pérez