



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

“OBTENCION DE INTERLEUCINA-2 (IL-2) A PARTIR DEL  
MEDIO CONDICIONADO DE LA LÍNEA CELULAR C<sub>63</sub>”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**ROMERO TREJO DANIEL**

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

La excelencia a través de la investigación

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGIA CELULAR L-4 PLANTA BAJA, DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACION EXPERIMENTAL UMIEZ EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA "UNAM". DIRIGIDA POR LA M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA Y ELABORADA POR EL ALUMNO ROMERO TREJO DANIEL.**

**MEXICO D.F 22 DE NOVIEMBRE DEL 2011**

## DEDICATORIA

A mi **Dios** por darme la oportunidad de vivir, por permitirme seguir luchando y por darme una familia maravillosa.

A mis padres: **Joel Romero y Guadalupe Trejo** por sus valiosos consejos, deseos, apoyos y motivaciones que día a día me brindan y en especial por el amor, comprensión, cariño, orientación y confianza que han puesto en mi desde pequeño.

A mis hermanos **Guadalupe Ized, Joel Romero y Jonathan Gabriel** por todo el apoyo que me han brindado y por sus grandes consejos.

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis M. en C. **Rosalva Rangel Corona** por su apoyo, coordinación, orientación y consejos que me brindo ya que sin ellos no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo.

Al Doctor **Armando Isibasi Araujo** (Abuelito) por su apoyo, empeño, consejos, observaciones, confianza y motivación que me brindó para ponerme al tanto y seguir con mis estudios.

A mis sinodales **Carlos Bautista Reyes, Cristina Alvarado Domínguez, Benny Weiss Steider y Carlos Martinez Montoya** por su apoyo y asesoría que me brindaron para la realización de este escrito.

A mis compañeros de Laboratorio de la "UMIEZ" Alfredo, Poncho Pancho, Luz, Chencho, Tania, Leo, Jose Luis, Itzel, Rubi, Miguel y Noemi por todas las cosas que hemos pasado juntos y las salidas que realizamos en grupo y a mi pequeña Edith por la motivación, el apoyo, el amor y las cosas que pasamos y seguiremos pasando juntos para salir adelante.

A mis compañeros del IMSS Ismael, Jacqueline, Mario, Liz y a la doctora lulú por sus buenas observaciones, apoyos y propuestas que me brindaron para proseguir con mis experimentos y ponerme al tanto.

A mi institución la **UNAM** por brindarme la educación y preparación necesaria para ponerme al tanto y proseguir con mis estudios académicos y por haberme hecho uno más de sus hijos. *"Por mi raza hablara el espíritu"*

---

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS</b> .....	4
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	8
Sistema inmunológico .....	8
Inmunidad innata.....	9
Inmunidad adaptativa .....	10
Inmunidad humoral.....	11
Inmunidad celular .....	11
Linfocitos T .....	12
Subpoblación de linfocitos Th1 y Th2.....	13
Linfocitos B.....	14
Citocinas.....	15
Interleucina-2 (IL-2) .....	17
Efectos biológicos .....	18
Receptor de IL-2 en células normales.....	19
Presencia del RIL-2 en células tumorales .....	21
Inmunoterapia con IL-2.....	22
Cáncer Cervicouterino (CaCu) .....	23
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	28
General.....	28
Particulares .....	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29

<b>RESULTADOS</b> .....	33
Obtención de IL-2, a partir del medio condicionado de la línea celular C <sub>63</sub> .....	33
Liofilización, dialización y concentración de IL-2 obtenida del medio condicionado de la línea celular C <sub>63</sub> .....	34
Detección y cuantificación por la técnica de ELISA de IL-2 obtenida del medio condicionado. ....	36
Evaluación de la actividad biológica de IL-2 obtenida del medio condicionado mediante la activación y proliferación de LSP por medio de la técnica cristal violeta.....	37
Confirmación de la actividad biológica de IL-2 ..	38
<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	40
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	43
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	46
<b>APÉNDICE</b> .....	55

**ABREVIATURAS**

<b>IL</b>	Interleucina
<b>RIL</b>	Receptor de Interleucina
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gama
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>TCR</b>	Receptor de Células T
<b>Th</b>	Subpoblación de células T
<b>Ig</b>	Inmunoglobulinas
<b>CaCu</b>	Cáncer Cervicouterino
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano
<b>LSP</b>	Linfocitos de Sangre Periférica
<b>UI</b>	Unidades Internacionales
<b>M-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonia de Macrófagos
<b>G-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonia de Granulocitos
<b>GM-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
<b>NGF</b>	Factor de Crecimiento del Nervio
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidermal



<b>MCP</b>	Proteína Quimiotáctica de Monocitos
<b>MIP</b>	Proteína Inflamatoria de Macrófagos
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>TCGF</b>	Factor de Crecimiento de Linfocitos T
<b>MCC</b>	Medio Condicionado Concentrado
<b>mc</b>	Medio condicionado de la línea C <sub>63</sub>
<b>mc C<sub>63</sub></b>	Medio condicionado de la línea C <sub>63</sub>
<b>cmcC<sub>63</sub></b>	Concentración del medio condicionado de la línea C <sub>63</sub>

## RESUMEN

**Antecedentes:** La línea celular C<sub>63</sub> procedente de fibroblastos de piel humana es una fuente natural de Interleucina-2 humana (IL-2), dicha línea fue transfectada con el gen para IL-2, siendo este el responsable de la secreción de la citocina en altas concentraciones en su medio condicionado después de un periodo de 7 días de incubación. Por esta razón, a partir del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub>. Se obtuvo IL-2, empleando las técnicas de liofilización y diálisis. El extracto de IL-2 fue detectado y cuantificado por un método de ELISA indirecta. Su actividad biológica se evaluó por medio de la técnica cristal violeta empleando linfocitos de sangre periférica (LSP). En el extracto obtenido del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> se evaluó una concentración de 12.65 ng/mL de IL-2 con una actividad biológica de 9 349.5 UI/mL. Además, se observó la formación de conglomerados al activar LSP tanto con la IL-2 obtenida del extracto como con la recombinante humana comercial. Los resultados muestran que la línea celular C<sub>63</sub> produce IL-2, por lo que puede ser empleada como una fuente natural para su obtención, ya que no se detectaron diferencias entre los datos de activación de LSP estimulados con IL-2 recombinante humana comercial (rhIL-2) y aquellos activados con IL-2 extraída del medio condicionado. Además de que la línea C<sub>63</sub> posee la ventaja de ser una proteína glicosilada de forma natural, en comparación con las proteínas recombinantes comerciales, lo cual su actividad biológica se mantiene y es posible obtener en grandes cantidades en un corto plazo.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es el proceso por el cual las células normales se transforman en células malignas por la adquisición de mutaciones, las cuales acarrearán como consecuencia el daño del genoma, este daño puede resultar de un proceso endógeno o exógeno (Weiss y Valle, 2003). Se caracteriza por una multiplicación y un crecimiento anormal desordenado de células que tienen la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y diseminarse por todo el organismo a través del sistema linfático o vascular mediante un proceso denominado metástasis, todo tipo de cáncer comparte esta característica en común. Entre estos cánceres se encuentra el Cáncer Cervicouterino (CaCu) que representa la segunda causa de muerte por neoplasias en la población femenina registrando más de 4,000 muertes al año en México, siendo este el más frecuente en las últimas décadas. Se caracteriza por un tumor maligno que se origina en el epitelio del cuello uterino no siendo detectado en sus etapas iniciales si no hasta las etapas invasivas (Frías y Zentella, 2005). Respecto a esto nuestro grupo de trabajo ha venido realizando estudios relacionados al CaCu empleando Interleucina-2 (IL-2), a diferentes concentraciones demostrando que esta proteína juega un papel citotóxico y anti-proliferativo ante este tipo de células, para ello se ha trabajado y demostrado que en líneas celulares de CaCu CALO e INBL su uso a bajas concentraciones (10 UI/mL) estimula su proliferación celular, mientras que a altas concentraciones (100 UI/mL) se inducen a muerte mediante el uso de IL-2 exógena. Además de reportar que estas mismas líneas celulares son capaces de secretar IL-2 para su propio factor de crecimiento (Rangel, et al, 2010).

Por esta razón, es necesario contar con una fuente que nos permita abastecernos de IL-2 en grandes cantidades, para proseguir con nuestros estudios biológicos relacionados al CaCu permitiendo así proponer una alternativa terapéutica para este tipo de pacientes con cáncer, por lo cual el presente trabajo tuvo como objetivo extraer IL-2 a partir del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> siendo esta una fuente natural de obtención de IL-2 humana.

## MARCO TEÓRICO

### **SISTEMA INMUNOLÓGICO**

Uno de los sistemas más importantes del cuerpo humano es el inmunológico, encargado de proteger al organismo contra la agresión o presencia de agentes patógenos y elementos tóxicos, entre los primeros se encuentran todos los microorganismos como bacterias, virus, parásitos y hongos mientras que los segundos incluyen a todos los contaminantes ambientales y venenos, tales como corrosivos, radiaciones, quemaduras, cortaduras, etc.

El sistema inmunológico es el mecanismo más eficiente para la eliminación de agentes extraños y ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo. Para la eliminación de un patógeno que ha establecido una infección lo primero que debe hacer el sistema inmunológico es reconocerlo como tal y desarrollar una respuesta adecuada para destruirlo, este sistema actúa mediante dos tipos de mecanismos que se diferencian en las estructuras de reconocimiento de patógenos (Abbas y Lichtman, 2004, Regueiro y López, 1996). Tales mecanismos son la inmunidad Innata y la Inmunidad Adaptativa que se presentan sucesivamente e interaccionan entre sí, lo cual aumenta su eficacia.

#### **Inmunidad *Innata***

Es la primera respuesta en manifestarse ante la presencia de cualquier agente extraño al organismo y consta tanto de mecanismos externos como internos, dicha inmunidad es inespecífica y se dispara con gran rapidez. Entre los principales mecanismos externos que componen esta inmunidad, están las estructuras anatómicas que funcionan como barreras primarias contra los gérmenes invasores, desde luego está la piel, cuya relativa resequedad y constante

---

descamación limita el crecimiento de microorganismos y ayuda a su eliminación, del mismo modo las mucosas cuya superficie ciliada recubierta de moco capturan microorganismos y los empuja hacia el exterior para ser expulsados. En colaboración con estas barreras participan diversos componentes secretados que refuerzan su capacidad protectora, tales como enzimas antimicrobianas, Lisozima, ácido clorhídrico, etc. Los reflejos fisiológicos también pueden contribuir a expulsar con violencia a los microorganismos en desarrollo (estornudos, tos, vómito, diarrea) (Abbas y Lichtman, 2004, O´ Hara y Shanahan, 2006).

Dentro de los mecanismos internos de la inmunidad innata hay participación de células fagocitarias como monocitos, macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares y células asesinas naturales (NK) que lisan e inhiben el crecimiento de antígenos y células tumorales de manera inespecífica (Kagi, et al, 1995). Así mismo, interacciones entre células activan y secretan moléculas conocidas como mediadores que van a limitar la difusión o expansión del agente extraño. Las células cebadoras liberan histamina y leucotrienos quienes son las que provocan la inflamación local y tienden a focalizar el proceso infeccioso, al igual liberan factores quimiotácticos que atraen a las células fagocíticas al sitio de lesión y éstas inician la ingesta de los agentes patógenos.

Los fagocitos dentro de los cuales encontramos a los neutrófilos y macrófagos tienen dos funciones muy importantes, una es la de capturar, ingerir y destruir en su interior a los materiales fagocitados y la otra es la de secretar moléculas de comunicación intercelular conocidas como citocinas proinflamatorias llamadas Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF) que tienen efectos muy importantes a distancia al promover el aumento de temperatura corporal, anorexia, somnolencia, malestar general, etc. Todos estos efectos son característicos del inicio de un proceso infeccioso y no son más que la manifestación de los primeros intentos del organismo para eliminar al invasor (Janeway, et al, 2001).

Las células asesinas naturales (NK) están especializadas para eliminar células que han sufrido cambios en su fisiología, ya sea que estén infectadas por un virus o que se hayan transformado neoplásicamente, estas células son inmediatamente identificadas e inducidas a suicidarse mediante un proceso de muerte programada (apoptosis) por el que se destruyen sin violencia y sin afectar a los tejidos circundantes (Janeway, 2005).

Aunque la inmunidad innata es eficaz contra muchos de los agentes infecciosos a veces es insuficiente ante la presencia de agentes patógenos que pueden evadir o contrarrestar esta forma de inmunidad por lo que al establecerse en el individuo inician una multiplicación ilimitada y le resultan nocivas al organismo, por lo que existe otro tipo de respuesta ante este tipo de agentes.

### **Inmunidad Adaptativa**

Es más compleja y eficaz para eliminar agentes extraños comparados con la inmunidad innata. Se induce por moléculas llamadas antígenos que forman parte estructural de todos los virus, microorganismos y células, y que al ser reconocidos desencadenan una serie de sucesos que llevan a la activación de linfocitos efectores altamente específicos para el inmunógeno y a la producción de anticuerpos (Suites, 1991, Ross, et al, 2005). Las características que definen a este tipo de inmunidad son: una especificidad precisa por distintas moléculas y una capacidad de recordar y responder con más intensidad a la exposición repetida a un mismo antígeno, al mismo tiempo es capaz de reconocer, reaccionar, bloquear y eliminar a un gran número de sustancias microbianas (Abbas y Lichtman, 2004).

La inmunidad adaptativa a su vez se divide en dos partes: inmunidad humoral e inmunidad celular de acuerdo a las células que en ella participan.

## **Inmunidad humoral**

La inmunidad humoral esta mediada por proteínas o moléculas solubles mejor conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) que son producidas por el linaje de linfocitos B, se encuentran en el plasma sanguíneo y en secreción de mucosas. Esta tipo de respuesta inmune combate a los microorganismos de múltiples formas, por ejemplo sus anticuerpos son capaces de identificar al antígeno microbial, neutralizarlo evitando que infecte células vecinas. Su principal mecanismo de defensa es contra los microbios extracelulares y sus toxinas ya que pueden secretar anticuerpos y unirse al microbio para eliminarlo, algunos de ellos promueven la fagocitosis, otros desencadenan la liberación de mediadores inflamatorios y algunos otros son especializados y diferenciados para activar los diferentes mecanismos efectores (Roitt, et al, 1997).

## **Inmunidad celular**

Este tipo de inmunidad es mediada por linfocitos T y es capaz de eliminar microbios intracelulares como virus, bacterias, hongos, y células transformadas que sobreviven dentro de los fagocitos o del hospedero. Este tipo de linfocitos son los encargados de llevar a cabo el reconocimiento y eliminación de las células blanco, mediante la secreción de citocinas como interferon gama (INF- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la acción de células efectoras (Roitt, et al, 1997, Stockt, et al, 1998). Las células efectoras CD4+ de vida corta forman grandes cantidades de citocinas que aumentan la capacidad de protección de otras células como macrófagos o las células NK y cooperan con los linfocitos B en la formación de anticuerpos, mientras que células T efectoras CD8+ son células citotóxicas y provocan apoptosis en células infectadas por virus y en células neoplásicas (Abbas y Lichtman, 2004).

Los linfocitos son las células del sistema inmune sobre las cuales recae la respuesta inmune adaptativa.

---

## LINFOCITOS T

En los mamíferos los linfocitos T regulan y dirigen la respuesta inmune adaptativa, son caracterizados principalmente por poseer en su membrana un complejo de proteínas llamado receptor para antígeno de linfocitos T (TCR) el cual reconoce péptidos antigénicos que le son presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) siendo expresado en diferentes tipos de células. Dicha señal de reconocimiento es transmitida al interior de la célula por un conjunto de moléculas de membrana llamado colectivamente CD3. La respuesta de los linfocitos T a los antígenos y coestimuladores incluyen la síntesis de citocinas que a su vez contribuyen a la activación, proliferación y diferenciación de distintos tipos celulares y a la realización de funciones efectoras (Abbas y Lichtman, 2004).

El TCR se forma de un heterodímero constituido por dos cadenas en combinaciones  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ , que permite su clasificación en dos grupos, linfocitos  $T\alpha\beta$  (TCR-2) y linfocitos  $T\gamma\delta$  (TCR1). Esto dos tipos de linfocitos se diferencian entre sí por la presencia de estas moléculas en la membrana celular. Los linfocitos  $T\alpha\beta$  se dividen en dos grandes subtipos linfocitos T CD4 (linfocitos cooperadores) y los linfocitos T CD8 (linfocitos citotóxicos). Los linfocitos T CD4 reconocen antígenos presentados por el MHC-II que contienen los fagocitos, células dendríticas y linfocitos B ayudando a destruir el patógeno y promover la síntesis de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B. Los linfocitos T CD8 reconocen antígenos presentados por MHC-I y actúan en el proceso de citotoxicidad para la eliminación de células infectadas. Mientras que los linfocitos T  $\gamma\delta$  se encuentran abundantemente en las mucosas y a menudo son CD4 y CD8 negativos (Joling, et al, 1994, Zuckermann y Husmann, 1996).



### **Subpoblación de linfocitos *Th1* y *Th2***

Tras la presentación de antígenos y por efecto de ciertas citocinas, los linfocitos CD4 pueden polarizarse en sus acciones, particularmente su producción de citocinas, de tal modo que favorezcan la respuesta inmune celular (*Th1*) o humoral (*Th2*). La liberación de citocinas por los macrófagos y otros tipos celulares en las primeras fases de la infección definen el patrón *Th1* o *Th2* que se producirá en respuesta a un agente extraño (Biron y Gazzinelli, 1995, O'Garra, 1998). La liberación de interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e IL-12 inducen la diferenciación de las células *Th* a células *Th1*, en tanto que la IL-4 e IL-10 inducen la polarización *Th2* (Romagnani, 1997, Scott, 1993, Trinchieri, 1993). Mediante un proceso de polarización *Th1/Th2*, un tipo de respuesta inhibe a otra mediante citocinas específicas. Así, los linfocitos *Th1* pueden llegar a inhibir la proliferación de las células *Th2* a través de la secreción de INF- $\gamma$ , mientras que la IL-10 producida por las células *Th2* puede inhibir la secreción de citocinas de la población *Th1* (Roitt et al., 2001).

Los linfocitos *Th1* y *Th2* se diferencian por la producción de citocinas y el tipo de respuesta inmune en la que intervienen. Los linfocitos *Th1* producen INF- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral-beta (TNF- $\beta$ ), IL-2 e IL-8, los cuales activarán a los linfocitos CD8 y células asesinas naturales NK (Kaufmann, 1996, O'Garra, 1998). Esta polarización *Th1* supondrá un predominio de la respuesta inflamatoria y citotóxica. Por su parte los linfocitos *Th2* producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 entre otras, cuyo efecto principal será la activación de linfocitos B y eosinófilos predominando la respuesta de tipo humoral (Garside y Mowart, 1995, Romagnani, 1997).

## Linfocitos B

En los mamíferos los linfocitos B se diferencian en la médula ósea constituyendo entre el 5 y 18% de los linfocitos circulantes, su función principal es la de producir inmunoglobulinas (Igs), las cuales pueden estar asociadas en la membrana de los linfocitos B o de forma soluble (Anticuerpos).

Las inmunoglobulinas de membrana son sintetizadas por los propios linfocitos B y quedan insertadas en la superficie de la membrana donde actúan como receptores antigénicos específicos. Por su parte, los anticuerpos son proteínas que se encuentran libres en el suero y que se unen específicamente a los antígenos poniendo en contacto el patógeno con el fagocito encargado de destruirlo, una vez que se ha llevado a cabo el contacto con el antígeno los linfocitos B se activan, proliferan y se diferencian en células plasmáticas o células secretoras de anticuerpos. Una parte de los linfocitos B activados no se diferencian en células plasmáticas, si no que se convierten en células de memoria que serán las responsables de la producción de una respuesta más rápida e intensa en el caso de un nuevo contacto con ese antígeno.

Los linfocitos B al igual que las células T expresan su propio receptor normalmente llamado receptor de células B (BCR) el cual le proporciona señales activadoras a los linfocitos B cuando se pone en contacto con el patógeno, además de ser también responsables de la secreción de ciertas citocinas tal como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  que a su vez activan a otros tipos de células para la rápida eliminación del patógeno (Abbas y Lichtman, 2004, Pistoia, 1997).

## CITOCINAS

Como se ha mencionado anteriormente, la respuesta inmune es muy compleja y depende de innumerables interacciones entre una gran variedad de células que deben actuar de manera coordinada para el reconocimiento, procesamiento y posterior eliminación de los agentes no reconocidos como propios. Esta interacción se realiza por contacto directo entre células o mediante factores solubles que actúan como mediadores, tal como las citocinas (Maino y Picker, 1998). Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular 15-30 kDs constituidas de 120-180 aminoácidos que pueden secretarse o permanecer unidas a la membrana por medio de receptores específicos, son producidas por células del sistema inmunológico como linfocitos T junto con macrófagos y surgen como respuesta a una amplia variedad de estímulos como estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, inflamación o infección (Meager, 1991).

Su función principal es regular la activación, proliferación y diferenciación de distintas poblaciones celulares, así como activar y regular el incremento y disminución de la respuesta inmunológica, inflamatoria y reparadora de lesiones por medio de células inflamatorias como fagocitos mononucleares, neutrófilos y eosinófilos, además de regular la activación de linfocitos estimulados por antígenos específicos (Warrens y Lechler, 1992).

Todas las citocinas comparten características semejantes: a) son de bajo peso molecular 15-30 kDs, b) son producidas cada vez que comienza la activación de la respuesta inmunológica, c) tienen una vida media limitada, d) solo estimulan a células que poseen receptores específicos para estas citocinas e) y son extremadamente potentes a bajas concentraciones (Abbas y Lichtman, 2004). Para realizar su función biológica requieren concentraciones de nanogramos a picogramos y pueden actuar de manera autocrina al modular la actividad celular, de manera paracrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras

estirpes celulares o bien sobre células y tejidos distantes a través de la sangre (Maino y Picker, 1998, Abbas y Lichtman, 2004).

En general hay dos grupos de citocinas que pueden ser distinguibles en base a su participación en los procesos de infección y/o inflamación. Las citocinas que están directa o indirectamente involucradas en los procesos inflamatorios reciben el nombre de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ ) promoviendo la respuesta inmune mediada por células. Mientras que las citocinas antiinflamatorias (IL-2, IL-4, IL-10 e IL-13) suprimen la actividad de las células proinflamatorias y son potentes mediadores de los linfocitos B. De esta manera la expresión de citocinas presentes en una enfermedad determinara el tipo de respuesta inmune despertada (Abbas y Lichtman, 2004).

Las citocinas juegan un papel muy importantes dentro de las alternativas terapéuticas aplicadas a pacientes con distintos tipos de cáncer, se ha demostrado la acción de interferones  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  sobre linfomas y leucemias, así como en tumores sólidos de ovario y riñón (Arie Belldegrun, et al, 1993, Ulka Vaishampayan, 2003). Por otra parte se ha observado la participación de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4 e IL-10 en el control inmunológico y el efecto antitumoral sobre carcinoma renal, pulmonar, mielodisplasias y mastocistomas (Ganser, et al, 1990, Terres y Coffman, 1998).

Existe una variedad de citocinas que poseen importantes funciones dentro del organismo, entre estas se incluyen los interferones, interleucinas (IL-1 a IL-33), factores estimuladores de colonias (M-CSF, G-CSF, GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento (NGF, EGF) y quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIP-1). Sin embargo IL-2 es una citocina que ha venido jugando un papel muy importante en la respuesta inmunológica antitumoral en diferentes tipos de cáncer como melanoma, mama, renal, hígado y cáncer cervicouterino (Bermudez, et al, 2005, Foa, et al, 1992, Rangel et al, 2010, Schaafsma, et al, 1991).

## INTERLEUCINAS

Las interleucinas son un grupo extenso de citocinas que son producidas principalmente por linfocitos T, aunque fagocitos mononucleares y algunas células tisulares también pueden producirla, la función de la mayoría es inducir la activación, proliferación y diferenciación de otras células.

### INTERLEUCINA-2 (IL-2)

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

La IL-2 es una glicoproteína de 15.5 kDs con 133 aminoácidos, es una molécula hidrófoba la cual se establece a pH de 3.9-5 compuesta de cuatro hélices alfa anfipáticas arregladas de forma antiparalela, con un punto isoeléctrico entre 6.8-8.2. El gen que codifica para IL-2 se encuentra localizado en el cromosoma 4q26-28 el cual contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 58, 105 y 125 en donde los dos primeros forman un puente disulfuro que es esencial para la actividad de la molécula.

La IL-2 es producida y secretada principalmente por linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> y en menor proporción por linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Estos linfocitos pueden ser activados por estimulación con antígenos, mitógenos o lectinas como Conavalina A, Fitohemaglutinina o bien por interacción del receptor de células T con el complejo antígeno para la rápida sobreexpresión de IL-2. Sin embargo, no solo células normales pueden llegar a producirla ya que se ha reportado que algunos clones de células T, células híbridas, líneas de leucemia como JURKAT,

MLA144 y líneas transfectadas como C<sub>63</sub> pueden llegar a producirla en grandes cantidades (Jane, et al, 1985, Mire y Thorpe, 1998).

## **EFFECTOS BIOLÓGICOS**

La IL-2 denominada inicialmente factor de crecimiento de linfocitos T (TCGF) es la principal citocina responsable de la expansión clonal de células T tras el reconocimiento de un antígeno. Por lo que controla la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T y facilita la destrucción de tumores mediante la activación de células NK y T citotóxicos. Así mismo IL-2 promueve el crecimiento y producción de anticuerpos por parte de los linfocito B y promueve la activación de distintos tipos celulares tal como monocitos, eosinófilos, células pancreáticas, etc. Para la eliminación de algún patógeno.

Por otra parte IL-2 es capaz de estimular la síntesis otras citocinas derivadas de células T como: TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN-  $\gamma$ , IL- 1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15 (Maas, et al, 1993, Anderson y Sorenson, 1994, Hassuneh, et al, 1997, Vella, et al, 1998). Además de contribuir a mejorar la memoria de células T CD4<sup>+</sup> al promover la reexpresión del IL-7R $\alpha$  en células T activas, dicho receptor está relacionado con el desarrollo de células de memoria, mostrando un patrón de expresión recíproco con el receptor de IL-2 (Hans, et al., 2007).

## RECEPTOR DE IL-2 EN CÉLULAS NORMALES

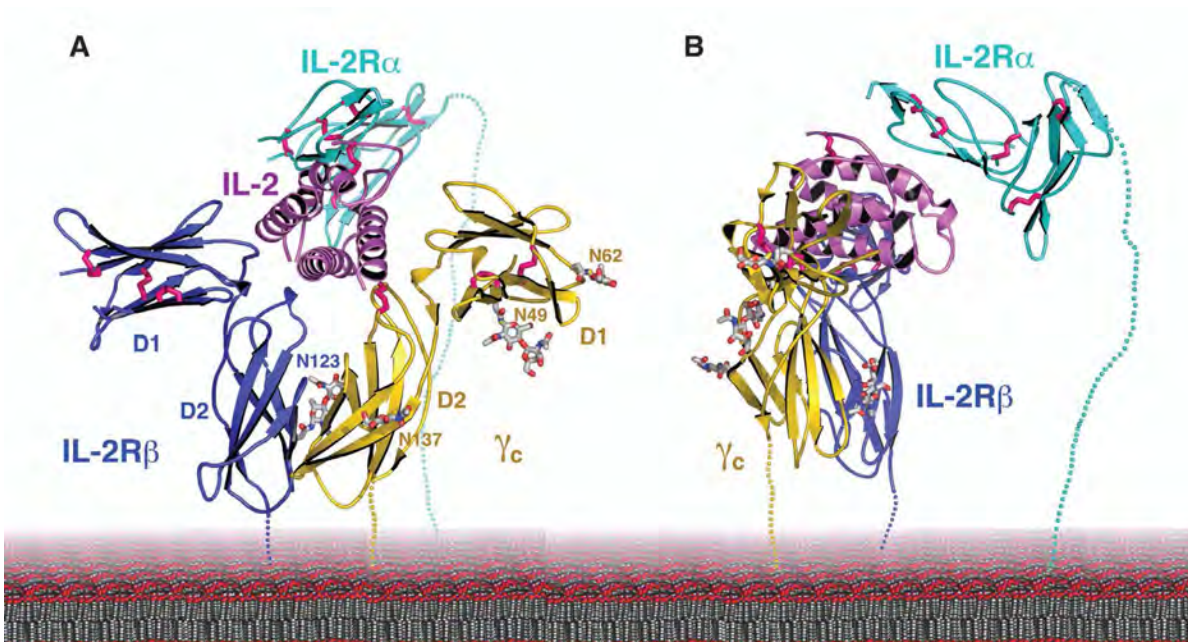
Para que la IL-2 pueda ejercer su función necesita unirse a su receptor de membrana conformado generalmente por tres subunidades glicoproteicas IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  y IL-2R $\gamma$  las cuales se asocian en la superficie celular por enlaces no covalentes para formar un complejo funcional de alta afinidad, cuya función es transmitir las señales de activación al interior de la célula (Figura 1) (Regueiro y Lopez, 1996, Damjanovich, et al, 2004).

La cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) es una subunidad específica que no está envuelta en la traducción de señales sin embargo, su expresión es potencialmente inducida únicamente en células T activas contribuyendo a generar un receptor de alta afinidad, cuando el IL-2R $\beta$  y IL-2R $\gamma$  están presentes en las células (Mc Millan, et al, 1995). La cadena  $\beta$  del receptor de IL-2 (IL-2R $\beta$ ) presenta una región citoplasmática rica en serina, prolina y una región acida involucradas en la señal de transducción intracelular, además de poseer la característica de ser una subunidad compartida con el receptor de IL-15 y ser expresada en las células en reposo (VanderSpek, et al, 1996, Damjanovich, et al, 2004). Del mismo modo la cadena gamma (IL-2R $\gamma$ ) es compartida por citocinas tal como IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 y IL-21 la cual tiene un dominio extracelular con una región rica en leucina sin embargo, no se sabe si está implicada en alguna función del receptor (Warren, et al, 1996). Su secuencia típica lo incluye en la superfamilia de receptores para citocinas tal como la cadena  $\beta$  de IL-2, conteniendo cuatro cisteínas conservadas y una región Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) (Xinquan, 2005).

Los linfocitos en reposo constitutivamente expresan las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor de IL-2, formando un receptor de afinidad intermedia ( $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ) al unirse a IL-2. Sin embargo, la rápida expresión de la cadena alfa tras la activación de células T es debido a la presencia de IL-2, así la rápida coexpresión de las tres subunidades que conforman el receptor de IL-2 dan origen a un receptor de alta afinidad

( $1 \times 10^{11} \text{M}$ ) el cual permite que se lleve a cabo más rápido la señalización al interior del núcleo.

Dentro de las células normales que expresan el receptor para IL-2, tenemos a los linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos, macrófagos, eosinófilos, células pancreáticas, fibroblastos de pulmón etc. Así mismo se ha detectado su presencia en células normales no hematopoyéticas como células endoteliales de cordón umbilical, queratinocitos, células intestinales, células de origen nervioso, etc (Arzt, et al, 1992, Theze, et al, 1996).



**Figura.1 Estructura cuaternaria del complejo de señalización de IL-2/R $\alpha\beta\gamma$ .** (A y B) IL-2 se muestra en color violeta, y los receptores se muestran en cian (IL-2R $\alpha$ ), azul (IL-2R $\beta$ ) y oro (IL-2R $\gamma$ ). Los carbohidratos observados están unidos a N-terminal como Asn123 del IL-2R $\beta$ , el Asn49, Asn62 y Asn137 del IL-2R $\gamma$  se muestran en gris. Los enlaces disulfuro se muestran en rojo. Los péptidos desordenados conectan el C-terminal de los receptores con la membrana celular como se muestran las líneas de puntos en sus respectivos colores (Tomado de Xinquan Wang, *et al.*2005).



## PRESENCIA DEL RIL-2 EN CÉLULAS TUMORALES

En la actualidad diversos autores han descrito que el receptor para la IL-2 no es exclusivo de células normales de origen hematopoyético, ya que se ha demostrado que ciertos tumores sólidos de humanos como melanoma, mama, colorectal, pulmón, hígado, estomago, renal y cáncer cervicouterino expresan dicho receptor para la IL-2 (Mc Millan, et al, 1995, Hassueneh, et al, 1997, Rangel, et al, 2010). Lo cual indica que dicho receptor en células tumorales puede permitir la señalización de la citocina al interior de la célula.

En las últimas décadas el Laboratorio de Oncología Celular ha venido realizando estudios relacionados al CaCu empleando líneas de tumores en diferentes estadios, revelando la presencia de las tres cadenas que conforman el receptor de IL-2 y observando una expresión diferencial del RIL-2 en el CaCu comparada con el receptor de IL-2 en células normales, observando que en estadios iniciales (neoplasias intraepiteliales y estadio I y II) solo se detecta la presencia de la cadena alfa del receptor de IL-2, mientras que en estadios avanzados (III y IV) se identifican las tres cadenas que conforman el RIL-2 en líneas celulares del CaCu CALO e INBL. En particular el RIL-2 presente en estas líneas celulares es funcional y dicha actividad se puede inducir dependiendo de la concentración de IL-2 administrada, inhibiendo su proliferación en presencia de altas dosis de IL-2 exógena (100 UI/mL) o induciendo su proliferación en presencia de bajas dosis (10 UI/mL). Así mismo, se ha reportado que estas mismas líneas celulares CALO e INBL son capaces de secretar su propia IL-2 para su crecimiento (Rangel, et al, 2010).

## INMUNOTERAPIA CON IL-2

IL-2 ha venido cobrando un gran interés en el estudio de la biología de algunos tumores sólidos siendo empleada sola o en combinación en altas concentraciones con interferones, gemcitabine, capecitabine, etc. Para inducir la generación de células NK y linfocitos T citotóxicos en pacientes con cáncer en fase terminal en cáncer de melanoma, renal y próstata mostrando una respuesta de 15 a 40% con 10 a 15% de completa remisión del tumor, aunque es favorable no garantiza la supervivencia del individuo en su totalidad (Vaishampayan, 2003, Atkinson y Brusko, 2009). Además de existir reportes que indican un aumento en los niveles de TNF en suero de pacientes poco después de la infusión de IL-2, lo cual se relaciona con la actividad tumoral observada (Rangel, et al, 1999). Sin embargo, su aplicación vía sistemática puede llegar a perturbar vías de regulación hematopoyética y provocar serios efectos colaterales como síndrome de goteo capilar, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vómito, diarrea, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas, gastritis, fatiga e hipotensión por lo que su uso ha sido ilimitado (Brisson, et al, 1994, Mitsuyasu y Reier, 1998). Sin embargo, se ha mostrado que el uso de IL-2 en altas concentraciones (100 UI/mL) es eficiente para reducir masas tumorales en particular las del CaCu (Alvarado, 1997, Rangel, et al, 2010).

IL-2 además de contribuir a producir regresión de masas tumorales en pacientes con cáncer en fase terminal, ha sido empleada también para combatir diferentes tipos de enfermedades autoinmunes, tales como enfermedades infecciosas (VIH), lupus eritematoso, diabetes tipo I, tuberculosis, esclerosis múltiple, etc. Además de servir como antagonista para prevenir el rechazo de trasplante de órganos, por lo que se está empleando como una posible alternativa terapéutica para combatir este tipo de enfermedades.

## CÁNCER CERVICO-UTERINO

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es un tumor maligno que se origina en el epitelio del cuello uterino se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, producidas en etapas de displasia leve, moderada y severa evolucionando a cáncer *in situ*, en grado variable cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial, luego a microinvasor y posteriormente a invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal (Zaino, et al, 1992).

Cada año se diagnostican 500, 000 nuevos casos en el mundo, en América Latina se reportan cerca de 68, 000 casos al año, las tasas más altas corresponden a Chile y México y las más bajas a Cuba, Puerto Rico y Argentina. En el 2001 el CaCu ocupó en México el primer lugar entre los tumores malignos en la población femenina con un total de 4,512 defunciones y una tasa de mortalidad de 18.3% por cada 100, 000 mujeres, de esta cifra el 47% de los casos se presentaron en mujeres de 35 a 54 años de edad (Tirado, et al., 2005). Para el 2005 se registraron 4,270 casos con una tasa de 10.2% por 100,000 mujeres (INEGI, 2005) el grupo más afectado es de 35 a 64 años de edad. Actualmente México se ha mantenido como la segunda neoplasia más importante entre la población femenina, registraron un total de 4,036 casos con una tasa de 9.8 por 100,000 mujeres (INEGI, 2008). La edad promedio al momento del diagnóstico es de 45 años, pero la enfermedad puede ocurrir inclusive en la segunda década de la vida (Sánchez, et al, 2005).

El Virus del Papiloma Humano (VPH) principalmente tipo 16 con una porción del 50% y tipo 18 con un 12% son considerados como los factores etiológicos más importante del CaCu, ya que se ha encontrado que alrededor del 70% es atribuido por estos dos tipo de virus (Lorincz, et al,1987). Sin embargo existen otros factores de riesgo que parecen estar involucrados en su desarrollo revelando que el CaCu tiene un origen multifactorial, entre los factores más importantes que influyen al desarrollo de este tumor maligno se encuentra: el inicio de las relaciones sexuales

y partos a temprana edad, higiene genital deficiente, amplio número de compañeros sexuales, infecciones virales y bacterianas, al igual el tabaquismo tiene sustancias químicas que dañan el ADN de las células del cuello uterino, el acceso limitado a los servicios de salud en mujeres de escasos recursos, la inmunodepresión, las radiaciones, el uso de anticonceptivos orales, la deficiencia de vitamina C,  $\beta$ -carotenos y fosfatos también ayudan al desarrollo de este tumor maligno (Castellsague et al, 2002, Tirado et al, 2005).

### **Etapas de evolución del CaCu**

Las siguientes etapas se usan para la clasificación del cáncer cervicouterino (Disaia, et al, 2002)

**Etapa 0 ó carcinoma *in situ*.** Es un cáncer en su etapa inicial, las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino y no invaden sus tejidos más profundos.

**Etapa I.** El cáncer está circunscrito estrictamente al cuello uterino.

**Etapa II.** Es la afección vaginal que excluye al tercio inferior o infiltración de los parámetros (ligamentos de sostén de cuello uterino) sin llegar a la pared lateral de la pelvis.

**Etapa III.** El cáncer se ha extendido a toda la región pélvica. Las células cancerosas también pueden haberse expandido a la parte inferior de la vagina y haberse diseminado para bloquear los tubos que conectan los riñones a la vejiga (los uréteres).

**Etapa IV.** Extensión por fuera de los límites del tracto reproductor.

Sólo en las etapas muy tardías cuando el cáncer se ha extendido más allá del cuello de la matriz, es cuando aparecen otros signos poco alentadores: la paciente baja de peso, puede presentar problemas urinarios de tipo infeccioso, sangrados anormales o de obstrucción al flujo de orina, por la invasión de la vejiga; o bien, estreñimiento o sangrado, por la invasión del colon y el recto. Y cuando el tumor se ha extendido por un proceso denominado metástasis a sitios lejanos como el hígado o los pulmones, que son sitios frecuentes de diseminación del tumor a través de la sangre, puede provocar síntomas dependiendo del lugar afectado (Castellsague, et al, 2002).

## JUSTIFICACIÓN

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) representa un problema de salud pública muy importante en México y a nivel mundial, principalmente en los países desarrollados se ha observado un reciente incremento de este padecimiento. Además, de que nuestro país representa la segunda causa de muerte por neoplasias en la población femenina con grandes repercusiones a nivel social. En América Latina se reportan cerca de 68, 000 casos al año; las tasas más altas corresponden a Chile y México mientras que las más bajas se reportan en Cuba, Puerto Rico y Argentina. En México, se registran más de 4,000 muertes al año por lo que se ha planteado que el uso de IL-2 podría ser utilizada como una alternativa terapéutica. Ya que se ha demostrado que, en líneas celulares de CaCu CALO e INBL, el uso de 100 UI/mL de IL-2 induce la muerte de estas células.

Si se desea utilizar IL-2 como tratamiento para las células de CaCu es necesario contar con un método que nos permita obtener cantidades considerables de IL-2. Por lo antes mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo extraer IL-2 a partir del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> productora de esta citocina, por la transfección con el gene para IL-2.

## HIPÓTESIS

Se sabe que por las técnicas de liofilización y diálisis de medios condicionados de líneas celulares, se pueden obtener citocinas de esa población celular. Entonces, si se aplican dichas técnicas al medio condicionado, obtenido de la línea celular C<sub>63</sub>, se podrá obtener IL-2.

## OBJETIVOS

### GENERAL:

- ❖ Obtener IL-2 a partir del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub>.

### PARTICULARES:

- ❖ Cultivar la línea celular C<sub>63</sub>.
- ❖ Reducir el contenido de humedad del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> a través de la técnica de liofilización.
- ❖ Dializar el medio liofilizado en una membrana de 6-8 kDs para purificar la IL-2.
- ❖ Concentrar el extracto de IL-2 empleando tubos Amicon con poro de 10 y 30 kDs.
- ❖ Detectar y cuantificar la IL-2 obtenida de la línea celular C<sub>63</sub> mediante su comparación con rhIL-2 (recombinante humana IL-2) por el método de ELISA indirecta.
- ❖ Evaluar la actividad biológica del extracto de IL-2 mediante la activación y proliferación de Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) por medio de la técnica cristal violeta.



## MATERIAL Y MÉTODO

### Material Biológico

- **Línea celular**

El material biológico consistió de la línea celular C<sub>63</sub> procedente de fibroblastos de piel humana la cual fue transfectada con el gene de IL-2. Línea obtenida de la reserva criopreservada en el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES ZARAGOZA), UNAM.

### Obtención de IL-2

Para obtener IL-2 del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> se cultivaron las células en condiciones de asepsia durante un lapso de 7 días en medio líquido RPMI-1640 (Sigma USA) suplementado con 20% de SFB. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Form Scientific, USA) a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con temperatura de 37 °C y un ambiente saturado de humedad. La densidad de las células se determinó en cámara de Neubauer (American Optical, USA) y su viabilidad fue evaluada por exclusión con azul de tripano en una dilución 1:10 (Sigma USA) (Apéndice I).

Al finalizar el periodo de incubación se colectó el medio condicionado que contenía la IL-2 y se centrifugó a 1000 rpm durante un lapso de 30 min para la eliminación de células muertas o desechos. El sobrenadante colectado se mantuvo en congelación a -70 °C para proceder a liofilizarlo en el Speed Vac (Savant AES2000, USA) por un lapso de 3 días.

Terminado el proceso de liofilización el medio condicionado fue diluido con 100 mL de PBS y depositado en una membrana de Diálisis de 6-8 kDs (Spectrum Medical, USA) el cual se mantuvo en agitación en una solución de PBS

(Phosphate Buffer Solution) a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un lapso de 5 días con un cambio constante cada 48 hrs.

El dializado se esterilizó en un filtro de  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  y finalmente fue centrifugado en tubos Amicon con poro de 10 y 30 kDs (Millipore, USA) a 4500 rpm por un lapso de 30 min con temperatura de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  encontrando nuestro extracto de IL-2 dentro de ese rango. Una vez colectado el extracto de IL-2 se mantuvo en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta evaluar su concentración y su actividad biológica.

### **Cuantificación de IL-2 obtenida del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> por el método de ELISA indirecta.**

Para la cuantificación de IL-2 obtenida del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> se empleo un kit de ELISA para IL-2. Para ello se tapizo la placa con un anticuerpo de captura (MAB602) a una concentración de  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$  diluido con PBS y se incubó toda la noche a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron 3 lavados y se bloqueo la placa con  $300\text{ }\mu\text{L}$  de block buffer durante un lapso de 1hra, para enseguida adicionar el estándar de IL-2 recombinante humana (202-IL) a una concentración de  $2\text{ ng/mL}$  con diluciones 1:2 hasta llegar a  $0.0625\text{ ng/mL}$ . Para determinar la cantidad de IL-2 presente en el extracto se tomaron  $20\text{ }\mu\text{L}$  y se llevaron a 100 para su cuantificación.

Después de un lapso de incubación de 12 hrs a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  se realizaron lavados para adicionar el anticuerpo de detección para IL-2 (BAF202) a una concentración de  $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ . Incubando la placa durante un lapso de 2hrs. La placa fue lavada y se adiciono Streptavidin-Peroxidasa (S 2438) a una dilución 1:2000 en PBS por un periodo de 30 min, para finalmente adicionar el substrato Tetramethylbenzidine (T2885) a una concentración de  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  y realizar la lectura de la placa a una absorbancia de 540 y 750 nm en el lector de ELISA (BIO-TEK, Instruments, Inc.USA).

**Activación de linfocitos de sangre periférica (LSP) a partir de estímulos con IL-2 obtenida del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> y con rhIL-2 (IL-2 recombinante humana).**

Con el objetivo de poder evaluar la actividad biológica del extracto de IL-2 obtenido de la línea celular C<sub>63</sub> se emplearon linfocitos de sangre periférica, los cuales fueron activados y estimulados con IL-2 para su proliferación, empleando tanto el extracto de IL-2 como un control positivo de rhIL-2 a 100 UI/mL, para ello se obtuvieron 10 mL de sangre periférica humana de un donador sano mediante una jeringa conteniendo 0.1 mL de heparina a una concentración de 1000 UI/mL (Rickercab/NCB, USA). El volumen de sangre obtenido se diluyó 1:1 con PBS (phosphate buffer solution) y se colocó cuidadosamente sobre una fase de Ficoll Hypaque (Microlab, México) de 1.077 de densidad en una proporción 3:1 cuidando no mezclar y formar dos fases. El tubo se centrifugó a 2500 rpm por 40 min a una temperatura de 21 °C. El cual al finalizar el periodo se logró la separación de tres bandas. La nube de células mononucleares de la interface entre el paquete de eritrocitos y el plasma se extrajo con ayuda de una pipeta serológica estéril y se lavo dos veces con 10 mL de PBS frío estéril mediante centrifugación por 10 min a 1500 rpm a 21 °C. El botón se resuspendió en 1 mL de RPMI-1640 sin suero y se procedió a verificar la viabilidad celular en cámara de Neubauer (Apéndice I).

Finalmente se colocaron  $1 \times 10^6$  células por triplicado en placas de Elisa de 96 pozos suplementadas con 10% de SFB y estimuladas con 100 UI/mL de rhIL-2 (Sigma, USA) mientras que para el extracto de IL-2 obtenido de la línea celular C<sub>63</sub> se realizaron diluciones 1:2 partiendo de un volumen inicial de 20  $\mu$ L hasta llegar a 0.625  $\mu$ L. Después de un periodo de 5 días de cultivo se evaluó su proliferación celular por medio de la técnica cristal violeta.

**Evaluación de la actividad biológica de IL-2 obtenida del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> y su comparación con rhIL-2 empleando la técnica cristal violeta.**

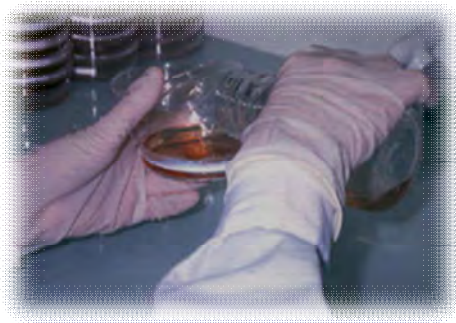
La técnica de *Cristal Violeta* nos permite valorar de una forma rápida y sencilla la cantidad de células totales en un cultivo celular. El método se basa en una tinción de células con una solución del colorante Cristal Violeta el cual nos permite evaluar la proliferación *in vitro* de linfocitos en respuesta a un antígeno específico en este caso se empleo IL-2. Para ello después de haber cultivado y estimulado a los LSP con IL-2 por un periodo de 5 días se centrifugaron las células a 1500 rpm por 5 min. El sobrenadante se retiro y se lavo tres veces la placa con PBS para fijarlas con 200 µL de Glutaraldehído 1.1% durante un lapso de 20 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se procedió a lavar la placa nuevamente y se adicionó 75 µL de la solución cristal violeta al 0.25% para teñir las células en un periodo de 10 min manteniéndolas en un agitador (Labnet Orbit, USA). El colorante se retiro y se lavó la placa por inmersión para adicionar 100 µL de la solución de ácido acético glacial al 10% la cual se mantuvo en agitación por un lapso de 20 min para proceder a leer su absorbancia a 570 nm en el lector de placas para Elisa (BIO-TEK, Instruments, Inc.USA).

## RESULTADOS

### Obtención de IL-2, a partir del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub>.

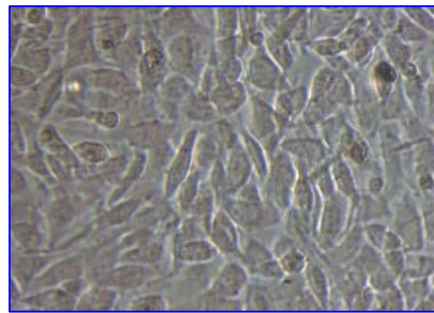
La línea celular C<sub>63</sub> es una fuente de IL-2 natural, es decir que se obtiene glicosilada a diferencia de la IL-2 recombinante. Esta línea celular se estableció a partir de fibroblastos transformados a los cuales se transfecto con el gen de IL-2. Para el desarrollo del presente trabajo se establecieron cultivos de la línea celular C<sub>63</sub> por periodos de 7 días (Figura 2A y 2B) colectando el medio obtenido a este tiempo (Figura 2C).

A



Cultivo celular

B



Línea celular C63

C

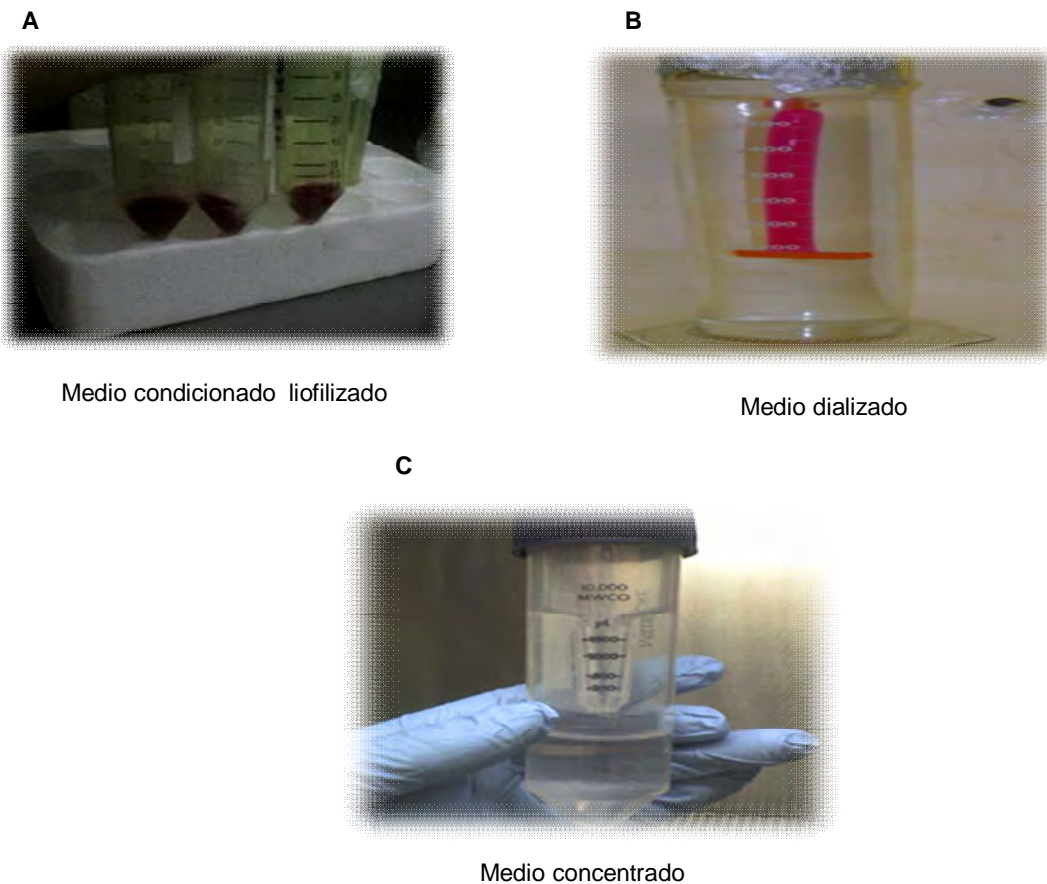


Medio condicionado

**Figura 2. Obtención de Interleucina 2 (IL-2) a partir de la línea celular C<sub>63</sub>.** El medio de cultivo de la línea celular C<sub>63</sub> (A y B) se recolecto por periodos de 7 días, para extraer la IL-2 que se encontraba en su medio condicionado (C).

***Liofilización, dialización y concentración de IL-2 obtenida del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub>.***

Una vez obtenido el medio condicionado (mc) de la línea C<sub>63</sub> (mcC<sub>63</sub>), en el que se encuentra la IL-2, se procedió a liofilizarlo para reducir su volumen eliminando el agua (figura 3A). Dado que el medio condicionado contiene una gran cantidad de azúcares y proteínas el liofilizado no fue totalmente sólido por lo cual se dializo para eliminar este tipo de moléculas. Para ello el material viscoso producto de la liofilización se diluyo en 100 mL de PBS. Para la diálisis se utilizó una membrana de Spectrum Medical,USA de 6-8 kDs, con lo cual se eliminaron los azúcares y proteínas por debajo de 8 kDs (Figura 3B).

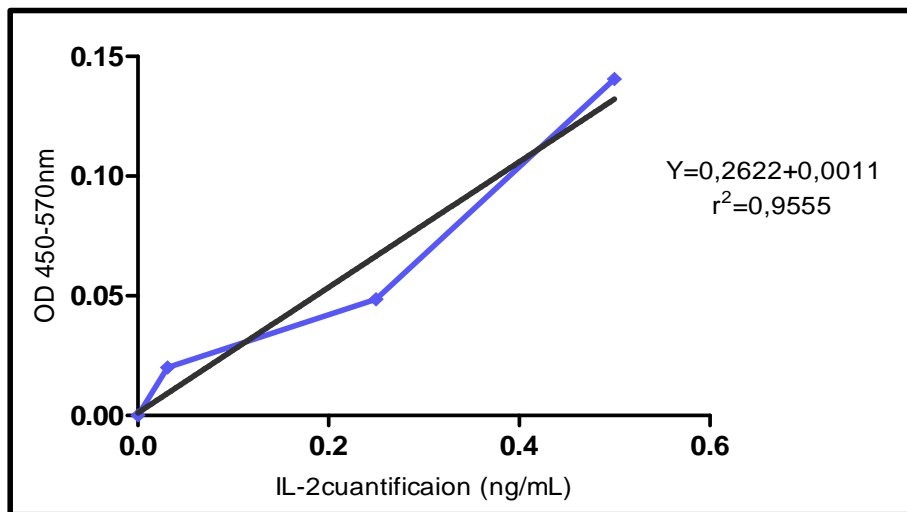


**Figura 3. Liofilización, dialización y concentración de IL-2 obtenida del medio condicionado.** Empleando las técnicas de liofilización (A), diálisis (B) y concentración (C) se pudo obtener el extracto de IL-2.

Dado que el rango de separación de proteínas a partir del medio condicionado era muy grande. Se cambió el procedimiento para la separación del contenido del medio. Con este propósito se utilizaron tubos de separación Amicon con membranas de diferentes tamaños de poro, uno de 10 y otro de 30 kDs. Además, de la separación estrecha de proteínas, en un rango de 10 a 30 kDs, las membranas nos permitieron llevar a cabo la concentración del medio condicionado de la línea C<sub>63</sub> (cmcC<sub>63</sub>). Con esto eliminamos el paso de liofilización, obteniendo muestras menos viscosas que nos permitió acortar el proceso al eliminar la diálisis (Figura 3C). Una vez realizada la separación y concentración del medio condicionado de la línea C<sub>63</sub>, se procedió a evaluar su cuantificación por un método de ELISA.

### Detección y cuantificación por la técnica de ELISA de IL-2 obtenida del medio condicionado.

Una de las formas para la detección de los antígenos y anticuerpos son los inmuno ensayos enzimáticos; los cuales combinan la especificidad de una reacción antígeno-anticuerpo con la sensibilidad que proporciona el sistema indicador. Para la cuantificación del extracto de IL-2 obtenido del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub>, se empleo un kit marca RD, para cuantificar IL-2 por el método de ELISA. Para ello se elaboró una curva estándar de IL-2 recombinante partiendo de una concentración de 2 ng/mL con diluciones 1 a 2 hasta llegar a 0.0625 ng/mL. Con los datos de densidad óptica, se elaboró una grafica que se ajusto por la ecuación de regresión lineal. Para determinar la cantidad de IL-2 presente en el cmcC<sub>63</sub> se tomaron 20 µL y se llevaron a 100 para cuantificar por el método de ELISA, el valor de densidad óptica obtenido se interpolo en la curva estándar para IL-2 recombinante, con lo cual calculamos que la cantidad de IL-2 en 20 µL del cmcC<sub>63</sub> es de 0.253 ng (Figura 4).



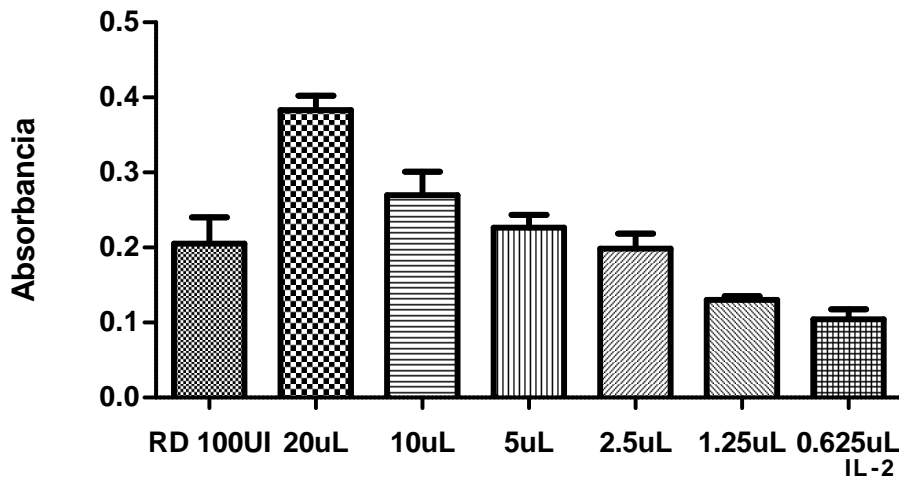
**Figura 4. Cuantificación de IL-2 en el cmcC<sub>63</sub>, empleando la técnica de ELISA indirecta.** Para la cuantificación de IL-2 se empleo un kit de ELISA a partir de una concentración de 2 ng/mL con diluciones 1:2 hasta llegar a 0.0625 ng/mL, mientras que para el extracto se tomo una alícuota de 20 µL y se llevo a 100, obteniendo una concentración de 0.253 ng/mL de IL-2 por cada 20 µL.



**Evaluación de la actividad biológica de IL-2 obtenida del medio condicionado, mediante la activación y proliferación de LSP por medio de la técnica cristal violeta.**

Una vez determinada la presencia de IL-2 en el concentrado del medio condicionado y cuantificarla, se evaluó la actividad biológica de la citocina en cultivos de leucocitos de sangre periférica (LSP).

Se sembraron  $1 \times 10^6$  LSP en presencia de 100 UI/mL IL-2 recombinante (control positivo) y del concentrado de  $C_{63}$ , en diferentes concentraciones partiendo de 0.253 ng y por medio de diluciones 1:2 se llegó a 0.0625  $\mu$ L del concentrado de  $C_{63}$ . Los ensayos se evaluaron al 5to día de cultivo por el método de cristal violeta. Los resultados muestran que a menor concentración de IL-2 disminuye la proliferación de los LSP (Figura 5).



**Figura 5. Evaluación de la actividad biológica del extracto de IL-2 mediante la Técnica Cristal violeta.** Por ensayo de proliferación con LSP por un periodo de 5 días y en presencia de un control positivo a 100 UI/mL de rhIL-2, se evaluó la actividad biológica del extracto empleando diluciones 1:2 partiendo de un volumen de 20  $\mu$ L hasta 0.625  $\mu$ L. Observando que se tiene una proliferación muy semejante a la de 100 UI/mL de IL-2 recombinante en la dilución 1:4 del concentrado, que equivalente a 46.8 UI/mL de IL-2.

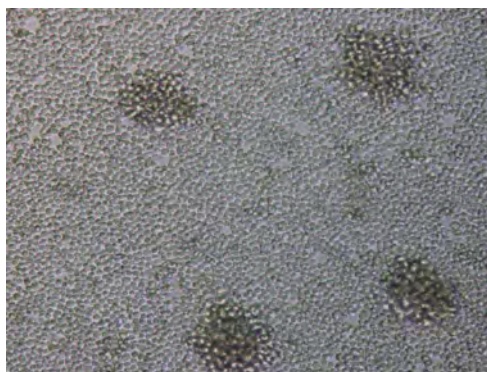
Cabe destacar que al comparar la proliferación de los LSP cultivados en presencia de 100 UI/mL de IL-2 recombinante, con la de los LSP cultivados en presencia de las diferentes diluciones del concentrado del medio condicionado, observamos que se tiene una proliferación muy semejante a la de 100 UI/mL de IL-2 recombinante, en la dilución 1:4 del concentrado, que equivalente a 46.8 UI/mL de IL-2 (Tabla 1).

Concentrado del Medio condicionado	UI/mL de IL-2
20µL	187 UI/mL
10µL	93.5 UI/mL
5µL	<b>46.8 UI/mL</b>
2.5µL	23.4 UI/mL
1.25µL	11.7 UI/mL
0.625µL	5.8 UI/mL

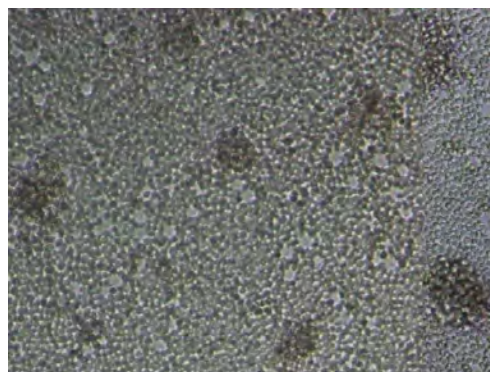
TABLA 1. Diluciones 1:2 del extracto de IL-2 empleando un control positivo 100 UI/mL de rhIL-2.

### CONFIRMACIÓN DE ACTIVADA BIOLÓGICA DE IL-2.

Con el objetivo de confirmar la actividad biológica del extracto de IL-2 se analizó la formación de conglomerados de LSP al inducir su proliferación en presencia de IL-2. Para ello se empleo como control positivo LSP cultivados con 100 UI/mL de rhIL-2 comercial y se comparó con el crecimiento de LSP cultivados en presencia de cmcC<sub>63</sub> a diferentes diluciones. Las imágenes muestran que los racimos de activación de los LSP son muy semejantes entre los inducidos por IL-2 recombinante y los observados en los LSP cultivados con el cmcC<sub>63</sub> diluido 1:4 (Figura 6).



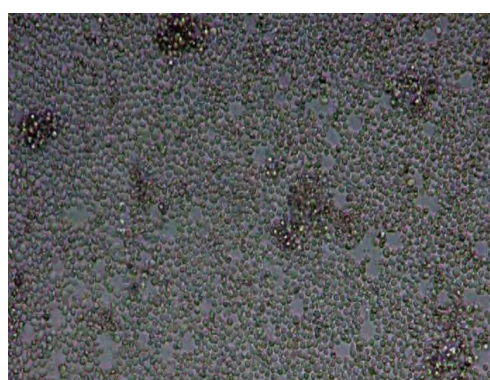
Control de RD 100 UI/mL de rhIL-2



CMcC63 20 uL



CMcC63 1:2



CMcC63 1:4



CMcC63 1:6



CMcC63 1:8

**Figura 6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO DE IL-2 MEDIANTE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LSP.** Para evaluar la actividad del extracto de IL-2 se emplearon un control positivo de rhIL-2 a 100 UI/mL, mientras que para el cmcC63 se emplearon diluciones 1:2 partiendo de un volumen inicial de 20  $\mu$ L hasta 0.625 uL. Observando que el extracto de IL-2 obtenido de la línea celular C<sub>63</sub> presenta una actividad muy similar a la del control al activar y formar conglomerados en los LSP en la

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los efectos inmunológicos de Interleucina 2 (IL-2), han sido ampliamente estudiados por lo que, se sabe que ejerce múltiples funciones entre ellas está; la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T, linfocitos B, células asesinas NK, monocitos, macrófagos, células pancreáticas, fibroblastos de pulmón, eosinófilos, etc. Dichos efectos son regulados por la unión de IL-2 a su receptor conformado por tres cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  el cual se asocia en la superficie celular por enlaces no covalentes para formar un complejo funcional de alta afinidad. Además, de encargarse de inducir la producción de otras citocinas como TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ , factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B entre los que se encuentran IL-4, IL-6, factores de crecimiento hematopoyético IL-3, IL-5, y GM-CSF (Maas, et al, 1993, Anderson y Sorenson, 1994, Regueiro y López, 1996, Hassuneh, et al, 1997, Raju, et al, 2001, Damjanovich, et al, 2004).

Por otra parte, se sabe que IL-2 juega un papel muy importante en la biología de algunos tumores sólidos humanos, por lo que se piensa en ella como un posible agente antineoplásico. La IL-2 se ha empleado en pacientes con cáncer renal y melanoma en estadios avanzados, demostrando que IL-2 aumenta la citotoxicidad de las células NK promoviendo la generación de linfocitos T citotóxicos y células asesinas activadas por linfocinas (LAK). No obstante, su aplicación vía sistemática perturba vías de regulación hematopoyética y puede provocar serios efectos colaterales como síndrome de goteo capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales, hepáticas, vomito, diarrea, etc. Por lo que su uso ha sido limitado (Khanna, et al, 1997, Eisenbarth, et al, 1998; Mitsuyasu y Reier, 1998, Vaishampayan, 2003, Atkinson y Brusko, 2009). Sin embargo, su uso en altas concentraciones ha mostrado ser eficiente para reducir masas tumorales en particular las del CaCu, se ha observado que las líneas celulares del CaCu CALO e INBL al ser estimuladas con 10 UI/mL aumentan su proliferación, mientras que al estar en presencia de 100 UI/mL hay una inhibición de la proliferación. Demostrando, así que estas líneas celulares son dependientes de la IL-2.

---

Asimismo, se demostró que estas mismas líneas celulares son capaces de secretar su propia IL-2 en un proceso autócrino para sustentar su crecimiento (Alvarado, 1997; Rangel, et al, 2010).

La aplicación de IL-2 ha tenido un impacto clínico significativo en células tumorales, ya que se ha demostrado que el tratamiento con esta proteína recombinante y su gen administrados por vía intratumoral, reduce significativamente el avance de los tumores asociados al VPH e inhibe la formación de tumores recurrentes después de ser eliminados por cirugía (Bermúdez, et al, 2005). Sin embargo, se sabe que la toxicidad de la IL-2 es dependiente de la dosis suministrada y que además el uso constante de productos recombinantes humanos comercialmente disponibles se han visto limitados por sus elevados precios o su falta de actividad (Smith, 1993, Khanna, et al, 1997). Debido a esto, debe existir una forma de obtener IL-2 en cantidades suficientes para proseguir con nuestros estudios biológicos relacionados al CaCu, empleando IL-2 de una manera fácil y rápida permitiendo así, proponer una alternativa terapéutica para las pacientes con este tipo de cáncer. Por lo antes mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo principal extraer interleucina-2, a partir del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> transfectada con dicho gen. Para ello, uno de nuestros objetivos fue cultivar la línea celular C<sub>63</sub> por un periodo de 7 días hasta colectar un volumen de 1000 mL de medio condicionado, del cual se dividió para realizar una serie de técnicas cuya finalidad fue deshidratar, dializar, purificar, esterilizar y concentrar el extracto de IL-2 en un rango de peso molecular entre 10 y 30 kDs proporcionando una mejor estabilidad al extracto. Después de este proceso se llevo a un volumen final de 1 000 µL, lo que significa una reducción del 0.1% del volumen final, de tal manera que la IL-2 fue concentrada. El hecho de cuantificar el extracto de IL-2, obtenido del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub>, por el método de ELISA, nos indica un rendimiento de 0.253 ng por cada 20 µL, obteniendo una concentración final de 12.65 ng/mL de IL-2.

Sin embargo, lo más importante, más que calcular la cantidad de IL-2 obtenida, es demostrar que esta proteína proveniente del medio condicionado tiene una actividad biológica, mayor que la IL-2 recombinante. Esto se hace evidente al comparar los conglomerados de leucocitos en los ensayos de proliferación de estos, con la IL-2 recombinante y la proveniente del cmcC<sub>63</sub>. Por lo que la línea celular C<sub>63</sub> puede ser utilizada como una fuente natural de IL-2 humana la cual nos permite obtener cantidades suficientes de la proteína que fue identificada por medio de anticuerpos monoclonales específicos. Estos resultados tienen trascendencia ya que podemos proseguir con nuestros estudios biológicos relacionados, con la actividad antitumoral de IL-2 sobre células de CaCu.

Con lo que respecta a evaluar la actividad biológica del extracto de IL-2 se midió el efecto proliferativo de dicha citocina empleando Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) los cuales, además de expresar el receptor para esta citocina también, dependen de IL-2 para su activación, crecimiento, proliferación y diferenciación, tal como, ocurre con las líneas celulares CTLL-2 y HT-2 (Atzpodien y Ulrich, 1994). El haber observado que los LSP pueden mantenerse en cultivo por varios días en presencia de la IL-2 obtenida del mcC<sub>63</sub>, nos permite contar con un buen control positivo en el cual, al compararla con la IL-2 recombinante humana (100 UI/mL), se demostró que la IL-2 obtenida del cmcC<sub>63</sub> es más eficiente al generar una mayor actividad biológica.

De acuerdo a lo anterior, se puede decir que la actividad de la IL-2 proveniente del cmcC<sub>63</sub> tiene un alto rendimiento, al haber obtenido 9 349.5 UI/mL, del cual 46.8 UI/mL (5 µL del extracto) presenta una mayor actividad biológica que 100UI/mL de IL-2 recombinante. A partir de este análisis se llegó a la conclusión de que para obtener la misma actividad biológica de 100 UI/mL de IL-2 recombinante se necesitan tomar 4.6 µL del extracto del cmcC<sub>63</sub> que equivale a 43 UI/mL. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que esta misma cantidad de IL-2 es suficiente para inhibir la proliferación de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL.

Las diferencias en la actividad biológica, encontradas entre la IL-2 humana natural y la IL-2 recombinante se puede atribuir al hecho de que, la IL-2 proveniente de la línea celular C<sub>63</sub> esta glicosilada, tal como una proteína glicosilada en el propio organismo, mientras que las proteínas recombinantes no presentan esta característica, lo que puede generar cambios en sus propiedades químicas incluyendo estabilidad, actividad biológica, solubilidad intracelular, antigenicidad, etc (Liu, 1992). Por tanto, las ventajas que proporciona una proteína glicosilada obtenida de una fuente natural, como lo es la línea celular C<sub>63</sub>, son mayores ya que, permite incrementar la estabilidad de la proteína manteniendo hasta en un 75% su actividad biológica, comparada con las proteínas no glicosiladas (Baek y Vijayalakshmi, 1997, Rosenberg, et al, 1984). Además de tener un sistema de producción ilimitada en un corto plazo, permitiendo así continuar con nuestros estudios biológicos generando un menor costo, evitando los procesos de desnaturalización y degradación inherentes al manejo de los recombinantes por aumentos de Temperatura, cambios de pH, fuerzas iónicas etc. A la vez nos aseguramos de su buena actividad biológica en comparación con la IL-2 recombinante humana comercial que no ejercen una actividad biológica adecuada (Khanna, et al, 1997). Lo cual nos es favorable para nosotros ya que como hemos mencionado anteriormente, la IL-2 juega un papel muy importante en la inhibición de la proliferación de las líneas celulares del CaCu CALO e INBL que lleva a la muerte por apoptosis (Alvarado, 1997; Rangel, et al, 2010, Del Rio Ortiz 2011). Por lo cual al contar con una fuente de IL-2 tan activa nos permitirá realizar múltiples ensayos de regresión tumoral y proseguir con nuestros estudios biológicos relacionados al CaCu.

## CONCLUSIONES

- ❖ La IL-2 obtenida de la línea celular C<sub>63</sub> es una fuente de IL-2 con mayor actividad biológica que la IL-2 recombinante de la marca RD.
  
- ❖ La Técnica de liofilización, diálisis y concentración fueron apropiadas para la extracción de IL-2 a partir del medio condicionado, lo cual nos permitió reducir el contenido de humedad, purificar y concentrar nuestra proteína lo mejor posible para proporcionar una mejor estabilidad.
  
- ❖ Los Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) son una buena alternativa para evaluar la actividad biológica de IL-2 obtenida del cmcC63



## PERSPECTIVAS

Para ampliar los resultados obtenidos en el presente trabajo, sería interesante continuar con las siguientes propuestas:

- ✓ Realizar estímulos con la línea celular C<sub>63</sub> para ver si existe una mayor producción de IL-2 al cuantificar la citocina de forma soluble al ser comparada con un control positivo.
  
- ✓ Realizar un Western blot para identificar y detectar la IL-2 presente en el extracto mediante el uso de anticuerpos específicos empleando un marcador de peso molecular.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- ❖ Abbas Abul K. y Lichtman Andrew H (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. 5ª ed. McGraw-Hill. España. Pág. 112-115, 563.
- ❖ Alvarado, M. J. A. (1997). Presencia de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor para la interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de cáncer cervicouterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. Fes-Zaragoza. UNAM. México, D.F
- ❖ Anderson P y Sorenson M. (1994). Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clin Pharmacokinet.*, 27 (1):19-31.
- ❖ Arie Beldegrun, Cho-Lea Tso, Tsuneaki Sakaat William H. McBride, Jean B. deKernion\* (1993). Human Renal Carcinoma Line Transfected With Interleukin-2 and/or Interferon  $\alpha$  Gene(s): Implications for Live Cancer Vaccines. *Journal of the National Cancer Institute* 3 (85)
- ❖ Atkinson M, Brusko T. (2009). Influence of membrane CD25 Stability on Lymphocyte Activity: Implications for Immunoregulation. *Plosone* 4 (11)
- ❖ Atzpodien J, Ulrich Z. (1994). Soluble Interleukin-2 receptors Abrogate IL-2 Induced Activation of Peripheral Mononuclear Cells. *Cytokine* 6:4 pp. 358-364
- ❖ Arzt E, Steizer U, Renner M, Lange O, Muller A, Stalla GK. (1992). Interleukin 2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. *J Clin Invest* 90(5):1944-51.
- ❖ Baek, W.O., Vijayalakshmi, M.A. (1997). Effect of chemical glycosylation of RNase A on the protein stability and surface histidines accessibility in immobilized metal ion affinity electrophoresis (IMAGE) system. *Biochim Biophys Acta* 1336(3):394–402.

- ❖ Bermúdez M, Peralta Z y Madrid M. (2005). Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud pública Mexico* 47 (6): 1-18.
- ❖ Biron Ch. A., Gazzinelli R.T. (1995). Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr Opin Immunol* 7:485-496
- ❖ Boni LT, Batenjany MM, Neville ME, Guo Y, Xu L, Wu F, Mason JT, Robb RJ, Popescu MC. (2001). Interleukin-2-induced small unilamellar vesicle coalescence. *Science* 1514(1):127-38
- ❖ Brisson J, Morin C, Fortier M. (1994). Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol* 140: 700-10.
- ❖ Castellsague X, Bosch F, Muñoz N. (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research* 89:191-9.
- ❖ Conventry J. Week C. Heckford E. Sykes J. (1996). Of IL-2 Cytokine Expression Despite IL-2 Messenger RNA Transcription in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary Human Breast Carcinoma. *Immunology* 156: 3486-3492.
- ❖ Damjanovich S, Gyorgy V, Waldmann. (2004). IL-2 and IL-15 receptor  $\alpha$ -subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cell. *PNAS* Vol. 101:30.
- ❖ Disaia, Philip J. Creasman William T. (2002). *Oncología ginecológica clínica*. Elsevier Science, Madrid, España.
- ❖ Eisenbarth GS, Kaye WA, Adri MN, Soeldner JS, Rabinowe SL, Kaldany A, Kahn CR, Bistrrian B, Srikanta S, Ganda OP. (1986). Acquired defect in interleukin-2 production in patients with type I diabetes mellitus. *J Medical*. 9:315 pp.920-924.

- 
- ❖ Foa, R., Guarini, A., Gansbacher B. (1992). IL-2 treatment for cancer: from biology to gene therapy *British J. Cancer*. 66: 992-998.
  - ❖ Frias G y Zentella D. (2005). Caracterización de la adhesión de células metastásicas humanas a cultivos endoteliales humanos activados por factores derivados de células tumorales. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A, C. Oaxaca.*
  - ❖ Ganser, A., Seipett, G., Lindemann, A., Ottman, O. G., Falk, S., Eder, M., Herrmann, F., Becher, R., Hoffken, K., Buchner, T. (1990). Effects of recombinant human interleukin-3 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 76: 455-462.
  - ❖ Garside P., Mowart AM. (1995). Polarization of Th-cells responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence? *Immunol Today* 16(5): 220-223.
  - ❖ Giuseppe Nistico and Giovambattista De Sarro. (1991). Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain? *Dept of Biology*. 14(4):146-50.
  - ❖ Gonzáles B. y Grañena A. (1996). Interleucina 2: un paso adelante en el tratamiento del cáncer. *Medicina Clinica* 107 (15): 578-580.
  - ❖ Hans Doms, Kristen W, and Abul K. Abbas. (2007). Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R $\alpha$ -expressing cells. *J Exp Med*. 204(3): 547–557.
  - ❖ Hassueneh R. M., Negarkatti S. P., Negarkatti M. (1997). Evidence for the Participation of the Interleukin-2 (IL-2) and IL-4 in the Regulation of Autonomous Growth and Tumorigenesis of Transformed Cells of Lymphoid Origin. *Blood* 89: 610-620.

- ❖ INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. En Base de datos de defunciones 2005.
- ❖ INEGI. En base de datos: Defunciones generales de mujeres por principales causas de mortalidad 2008.
- ❖ Janeway, Charles; Paul Travers, Mark Walport, and Mark Shlomchik. (2001). Immunobiology; Fifth Edition. New York and London: Garland Science. ISBN 0-8153-4101-6.
- ❖ Janeway CA, Jr. (2005). Immunobiology. 6ta ed. Edición. Garland Science. ISBN 0-443-07310-4.
- ❖ Jane chen\*, Nikki j. Holbrookt, Kenneth f. Mitchell\*, Carol a. Vallone\*, and Yuan Lin\* (1985). A viral long terminal repeat in the interleukin 2 gene of a cell line that constitutively produces interleukin 2. *Biochemistry* (82) 7284-7288.
- ❖ Joling P., Bianchi A.I.J., Kappe A.L., Zwart R.J. (1994). Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pig from 1 to 40 weeks of age. *Vet Immunol immunopathol* 40: 105-117.
- ❖ Kagi D., Ledermann B., Burki K., Zinkernagel R.M., Hengartner Hans. (1995). Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: mechanisms and significance. *Immunol. Rev.* 146:95.
- ❖ Khanna, C., Anderson, P. M., Hasz, D.E., Katsanis, E., Klausner, J. S. (1997). Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. *Cancer* 79(7):1409-1421.
- ❖ Kaufmann, S.H.E. (1996).  $\gamma/\delta$  and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2272-2279.

- ❖ Liu, D.T. (1992). Glycoprotein pharmaceuticals: scientific and regulatory considerations, and the US Orphan Drug Act. *Trends Biotechnol.* 10:114–120.
- ❖ Lorincz A, Temple G, Kurman R, Jenson A, Lancaster W. (1987). Oncogenic association of specific human papilloma virus types with cervical neoplasia. *J Int Cancer Inst* 79:671-7.
- ❖ Maas, R. A., Dullens, H.F.J., Otter, W.D. (1993). Interleukin-2 in cancer treatment disappointing or Still promising A review. *Cancer Immunol. Immunother* 36:141-148.
- ❖ Madaisy Cueto. M<sup>a</sup> Jesus Dorta. Matias Llabrés. (2002). Desnaturalización y degradación de proteínas mediante calorimetría de barrido diferencial. *Tecnología farmacéutica* 61. España.
- ❖ Maino V., Picker L.J. (1998). Identification of functional subsets by flow cytometry; intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry.* 34:207-215.
- ❖ McMillan DN, Kernohan NM, Flett ME, Eremin O. (1995). Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localisation in human solid tumor cells in situ and in vitro: evidence for a direct role in the regulation of tumor cell proliferation. *Int. J Cancer* 60: 776.
- ❖ Meager A. (1991). *Cytokines*. Ed. Prentice Hall, pp109-120.
- ❖ Mire S y Thorpe, R. (1998). *Cytokines*. Academic Press Great Britain, pp19-33.
- ❖ Mitsuyasu T. Reier A. (1998). Use interleukin-2 in Immunotherapy of Human Immunodeficiency Virus Infection. *BioDrugs* 10(3):215-225.

- ❖ O'Garra A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-283.
- ❖ O'Hara AM y Shanahan F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports* 7:688-694.
- ❖ Pistoia V. (1997). Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 18:343-350.
- ❖ Raju K, Rabinovich BA, Radvanyi LG, Spaner D, Miller RG. (2001). A central role for IL-2 in fate determination of mature T cells--I: role in determining the Th1/Th2 profile in primary T cell cultures. *Immunol.* 13(12):1453-9.
- ❖ Rangel Corona, L. Rodríguez Cruz, G. Flores, C. Gómez Ruiz, I. Soto Cruz, J.F. Mendoza Rincón AND B Weiss Steider. (1998). Differential expression of the two components of the Interleukin2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors* (3) pp1239-43.
- ❖ Rangel Corona Capitulo Interleucina 2 / Soto C, Cáceres C, Mendoza R y Weiss S. (1999). Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares. Edt Plaza y Valdez editores México.
- ❖ Rangel-Corona, M.A. Hernández-Jiménez, T Corona-Ortega, M.A. Ibáñez-Hernández, I. Baeza-Rodríguez and B. Weiss-Steider. (2004). Interleukin-2 interaction with liposomes of different formulations (Neutral and Cationics) *Immunology* 309-312.
- ❖ Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto Cruz I, Lopez Labra A, Weiss-Steider B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine.* 50(3):273-7.

- 
- ❖ Regueiro, J. R. Y Lopez, L. C. (1996). *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune* Editorial Medica Panamericana. España pp.178.
  - ❖ Roitt I, Brostoff J., Male D. (1997). *Essential Immunology* (ninth edition ed). Blackwell Science.
  - ❖ Roitt I, Brostoff J., Male D. (2000). *Inmunologia*. Elsevier. Mexico, pp:423.
  - ❖ Roitt I., Brostoff J., Male D. (2001). *Immunology*. Ed. Roitt, Brostoff, Male; Mosby Cop; (Edinburgh, Reino Unido).
  - ❖ Romagnani S. (1992). Induction of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 responses: a key role for the natural immune response? *Immunol Today* 13:379-381.
  - ❖ Romagnani S. (1996). Understanding the role of Th1/Th2 cell in infection. *Trends Microbiol* 4:470-473.
  - ❖ Romagnani S. (1997). Paradigm. The Th1/Th2 *Immunol Today* 18:263-266.
  - ❖ Rosenberg SA, Grimm EA, McGrogan M. (1984). Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science*. 223(4643):1412-4.
  - ❖ Ross M., Kaye J., Pawlina W. (2005). *Histología Texto Y Atlas A Color Con Biología Celular y Molecular*. Panamericana. Mexico. pp: 864.
  - ❖ Sánchez H, Huerta P, Rivera T, Rosales P (2005). Infección por VPH y cáncer cervicouterino. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 52: 222-223.
  - ❖ Schaafsma R, Falkenburg F, Landegent E, Willemze R and Fibbe W. (1991). In vivo production of interleukin-5, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Macrophage colony-stimulating Factor, and Interleukin-6 During Intravenous Administration of High-Dose Interleukin-2 in Cancer Patients. *Blood* 78(8):1981-87.



- ❖ Scott P. (1993). Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets. *Curr Opin Immunol* 5:391-397.
- ❖ Smith. (1993). Lowest dose interleukin-2 immunotherapy. *Blood* 81: 1414-1423.
- ❖ Suites Daniel. (1991). *Inmunologia Humana y Basica*. Primera Edicion. El manual Moderno. Mexico. pp:418.
- ❖ Stock J., Coderre J., DeVito W., Baker S. (1998). Effects of human lymphocyte conditioned medium on MG-63 human osteosarcoma cell function. *Cytokine* 10(8):603-612.
- ❖ Terres, G. y Coffman R.L. (1998). The role of IL-4 and IL-10 cytokines in controlling an anti-tumor response in vivo. *Inter. Immunol* 10 (6): 823-832.
- ❖ Thèze J. Alzari PM y Bertoglio J. (1996). Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 17:481.
- ❖ Tirado G, Mohar B, Lopez C, Garcia C, Franco M y Borges P. (2005.) Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud publica de Mexico* 47(5):342-350.
- ❖ Trinchieri G. (1993). Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol Today* 14: 335-338.
- ❖ Ulka Vaishampayan. (2003). Review of Current and Future Treatment Options in Renal Cancer. *Cancer* (3):201-210.
- ❖ Vaishampayan U. (2003). A Review of Current and Future Treatment Options in Renal Cancer. *Cancer*; 2(3):201-210.

- ❖ VanderSpek C. Sutherland J. Ciardelli and Murphy R. (1996). Interleukin-2 Receptor Binding Domain Mutations. *Biological Chemistry* 271(2):1245-1249.
- ❖ Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. (1998). Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Immunology* 95(7):3810-5.
- ❖ Warren J. L., Tim A. D. (1985). Localization of the gene encoding the human interleukin-2 receptor on chromosome 10. *Science* 224: 1431-1433.
- ❖ Warrens, A. N. y Lechler, R.I. (1992). Key molecular events in the induction and expression of the immune response: The molecular biology of immunosuppression. Editor. Angus W. Thomson. Editorial John Wiley and Sons England pp.1-36.
- ❖ Warren HS, Kinnear BF, Kastelein RL, Lanier LL. (1996). Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells. *J Immunol.* 156(9):3254-9.
- ❖ Weiss S y Valle M. (2003). *Molecular Origin of Cancer. Vertientes*, 6:3-7.
- ❖ Xinquan Wang. (2005). Structure of the Quaternary Complex of Interleukin-2 with Its  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  Receptors. *Science* 310, 1159.
- ❖ Zaino RJ, Ward S, Delgado G. (1992). Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 69(7): 1750-1758.
- ❖ Zuckermann F.A., Husmann R.J. (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T-cell. *Immunology* 85:500-512.

**APÉNDICE****PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES****Desactivación de suero fetal bovino (SFB)**

La botella de suero fetal bovino (SFB), (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente y posteriormente se coloca en un baño maría a 56 °C durante 30 min con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular como son las proteínas del complemento, así como inactivar otras para mayor eficacia en la nutrición celular, posteriormente se prepara en alícuotas de 50 mL para mejor manipulación, conservándose a una temperatura de 4 °C.

**Solución de Verseno**

Se emplea para despegar células adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizaron los siguientes reactivos.

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

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

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

## Solución fisiológica de fosfatos (PBS)

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

Cloruro de <b>sodio</b>	8.0 gramos
Fosfato de sodio monobásico	2.88 gramos
Fosfato de potasio	0.4 gramos
Cloruro de potasio	0.20 gramos

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

## Criopreservación

Con el fin de tener células productoras de IL-2 disponibles para subsecuentes experimentos. Se utilizo la técnica de criopreservación que consiste en utilizar las células en fase exponencial sin llegar a su saturación, siendo estas removidas de su superficie, dejándolas con 5 mL de verseno en la incubadora de CO<sub>2</sub> durante un lapso de 5 min, posteriormente se decantaron las células a un tubo Falcón para centrifugar a 1500 rpm, una vez obtenido el botón celular se contaron las células en cámara Neubauer para obtener 1 millón por cada 900 uL de SFB y 100 uL de dimetil sulfoxido (DMSO) (sigma Chemical Co.U.S.A) donde se colocaron en un vial de 1 mL (Cooke Laboratory Products, U.S.A.). Los viales se congelaron inicialmente a -70 °C para posteriormente ser introducidas en nitrógeno líquido a -180 °C para su preservación indefinida.

Dimetil Sulfoxido. Es el solvente orgánico que se utiliza para criopreservar las células en una proporción 1:10 con suero fetal bovino.

### Verificación de la viabilidad celular

Se realizó una dilución 1:1 de la suspensión de LSP con solución de azul de tripano, homogenizando la mezcla por agitación suave, enseguida se colocó en la cámara de Neubauer 10  $\mu\text{L}$  de la dilución y se observó en un microscopio óptico. Se cuantificaron las células viables difractantes y las no viables de color azul y opaco. Una vez contabilizados los cuatro cuadrantes se determinó el número de células de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\# \text{ de células/mL} = \frac{\text{promedio de células en los cuadrantes} \times \text{vol. de la cámara}}{(10000 \text{ mm}^3) \times \text{dilución de azul de tripano}}$$

Finalmente se colocaron  $1 \times 10^6$  células en los pozos de placa de Elisa por triplicado y se activaron con 100 UI/mL de Interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2)(Sigma USA) el cual se empleó como control positivo, mientras que para el extracto de IL-2 obtenida del medio condicionado de la línea celular C<sub>63</sub> se emplearon diluciones 1:2 y se activaron los LSP partiendo de un volumen inicial de 20  $\mu\text{L}$  hasta 0.0625  $\mu\text{L}$ . Después de 5 días de cultivo se determinó la proliferación celular por medio de la técnica cristal violeta usando el lector de placas para Elisa (BIO-TEK, Instruments, Inc.USA).

Azul tripano. Es un colorante que se incorpora en el citoplasma celular cuando la célula se encuentra dañada en su membrana, se utiliza comúnmente para determinar la viabilidad celular.