



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE IL-2 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE
CÉLULAS DE LA LÍNEA DE MELANOMA B16F0”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

SÁNCHEZ CEPEDA MIRIAM NOEMI

Directora de Tesis:

M. en C. Rosalva Rangel Corona



México D.F.

Mayo 2014

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular, L-4 PB de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIE-Z) FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona.

Durante la realización del presente trabajo se conto con el apoyo financiero y el otorgamiento de una beca licenciatura del programa

PAPIME, DGAPA, UNAM

Proyecto-PE208910.

DEDICATORIA

A DIOS POR HABERME PERMITIDO ESTE LOGRO A PESAR DE LOS OBSTÁCULOS A LO LARGO DE ESTE TIEMPO, POR DARME LA FUERZA Y VALOR PARA SEGUIR ADELANTE.

A MIS PADRES LETY Y CÉSAR POR CREER EN MÍ Y SER MI APOYO INCONDICIONAL, LOS AMO CON TODO MI CORAZÓN, A MI ESPOSO ANDREE POR SU PACIENCIA, TIEMPO Y APOYO.

A MIS PROFESORAS ROSALVA Y TERE POR SU TIEMPO Y APOYO DEDICADOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

A MIS PEQUEÑOS Y AMADOS HIJOS ILÁN Y ARI, USTEDES LO SON TODO EN MI VIDA, LOS AMO CON TODO MI CORAZÓN.

AGRADECIMIENTOS:

A LA M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA POR SU DIRECCIÓN Y APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR SUS COMENTARIOS AL TRABAJO

M.C. RAUL ZAVALA CHAVERO

BIÓL. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA

M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO, ESPECIALMENTE ITZEL Y REYNA POR SU AMISTAD Y APOYO.

AL SEÑOR JOSÉ CHAVARRIA POR EL APOYO TÉCNICO PARA LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.

DE MANERA ESPECIAL A JANI AZUCENA OLVERA MALDONADO, POR SU APOYO TÉCNICO PARA LA TOMA Y EDICIÓN DE LAS FOTOGRAFÍAS PRESENTADAS EN ESTA TESIS.

A TODO EL PERSONAL DEL BIOTERIO POR EL MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES QUE SE UTILIZARON EN LOS EXPERIMENTOS.

ABREVIATURAS

IL-2: Interleucina 2

IFN- γ : Interferón gamma

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

NK: Células asesinas naturales (Natural Killers)

KHF: Factor auxiliador de células asesinas

IgM: Inmunoglobulinas M

IgD: Inmunoglobulinas D

TC6F :T cell growth factor

TMF: Factor mitogénico de timocitos

TNF β : Linfoxina

Células T: Células derivadas del timo

Células B: Células derivadas de la médula ósea

CaCU: Cáncer Cérvico Uterino

μ L: Microlitros

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

UI: Unidades Internacionales

ÍNDICE

Página

FIGURAS.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	27
MÉTODO Y MATERIALES	28
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIÓN.....	53
PERSPECTIVAS.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
GLOSARIO	58
ANEXO.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Formas clínicas de cáncer y tejido afectado.....	5
Figura 2. Ubicación del melanoma en diferentes capas de la piel.....	7
Figura 3. Clasificación de los melanomas según Breslow y Clark.	9
Figura 4. Estructura interna del Bazo. (Ross M. 2005).....	13
Figura 5. Acciones de las citocinas.....	18
Figura 6. Composición de los liposomas.....	23
Figura 7. Proliferación <i>in vitro</i> a 1, 3 5 y 7 días de la línea celular de melanoma B16F0 en ausencia y presencia de 10 y 100 UI/ml de IL-2 evaluada por la técnica de cristal violeta.	32
Figura 8. Masas tumorales inducidas en ratones C57 tratados con 10 UI/ml de IL-2 en forma libre.....	35
Figura 9. Masas tumorales inducidas en ratones C57 tratados con 10 UI/ml de IL-2 en forma libre.	35
Figura 10. Características de ratones del grupo ambiental (no inoculados y sin tratamiento de IL-2).	37
Figura 11. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 del grupo control positivo.....	38
Figura 12. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 en el grupo con tratamiento de 10 UI/ml de IL-2 libre.	39
Figura 13. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 en el grupo de ratones con tratamiento de 10 UI/ml de IL-2 encapsulada.....	40
Figura 14. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 en el grupo de ratones con tratamiento de 100 UI/ml libre.....	41
Figura 15. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 del grupo de ratones con tratamiento de 100 UI/ml de IL-2 encapsulada.....	42
Figura 16. Volumen tumoral de los ratones con tratamiento de IL-2 en forma libre y encapsulada en concentraciones de 10 y 100 UI/ml respectivamente.....	43
Figura 17. Supervivencia de los ratones tratados con IL-2 y control de los experimentos I y II después de varios meses pos-tratamiento.....	47

RESUMEN

El cáncer se distingue por el crecimiento celular descontrolado que progresa y se expande hasta la metástasis. Existen diferentes tipos de cáncer, entre ellos, el melanoma que consiste en una transformación maligna de los melanocitos, células que dan pigmentación a la piel; este tipo de cáncer es curable si se detecta a tiempo. En los últimos años se han administrado tratamientos con interferones e interleucinas, cuyo objetivo principal es, aumentar la respuesta inmunológica del paciente, proporcionándole una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad. Con base en lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue evaluar la proliferación de la línea celular de melanoma B16F0 en presencia de 10 y 100 UI/ml de IL-2 en forma libre *in vitro* mediante la técnica de cristal violeta y después *in vivo* en ratones de la cepa Black C57. Para ello se inocularon los ratones con la línea celular de melanoma B16F0 con el fin de desarrollar masas tumorales y posteriormente se administró la citocina a 10 y 100 UI/ml en forma libre y después encapsulada de acuerdo a la condición de cada grupo de ratones. Los resultados obtenidos muestran que al administrar IL-2 a 100 UI/ml se observa una disminución en el volumen tumoral, siendo mayor el efecto cuando la citocina se administró encapsulada. En el caso de la administración de 10 UI/ml de IL-2 observamos un aumento del volumen tumoral siendo más evidente en los ratones que recibieron 10 UI/ml de IL-2 encapsulada.

INTRODUCCIÓN

El cáncer se ha convertido en una de las enfermedades más temida. Aunque no sea la causa más frecuente de muerte, se sabe que es un suceso progresivo y fatal, para el cual no ha sido descubierta ninguna cura definitiva. Hay diferentes tipos de cánceres, pero todos comparten una característica común: el crecimiento celular descontrolado que progresa hacia la expansión generando metástasis. Entre estos cánceres se encuentra el melanoma (cáncer de la piel), que consiste en una transformación maligna de los melanocitos, encargados de la pigmentación a la piel. Este tipo de cáncer es curable si se detecta a tiempo. En los últimos años se han administrado tratamientos con diversas citocinas (Interferones e Interleucinas), que tienen como objetivo principal aumentar la respuesta inmunológica del paciente y así eliminar el crecimiento tumoral proporcionándole una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

MARCO TEÓRICO

CÁNCER

Una célula mantiene sus características morfológicas, químicas, bioquímicas y fisiológicas debido a la operación de múltiples vías de regulación sutiles y al mismo tiempo restringido. Cuando los mecanismos de homeostásis se alteran, la célula puede modificar alguna de sus características. Todas ellas están interrelacionadas de manera que la modificación en alguna de ellas repercute en las demás, aunque en grados muy variables. Básicamente esto es el cáncer, la alteración de la homeostasis celular con cambios estables y permanentes hacia la progenie de las células alteradas. Las alteraciones que pueden presentar las células cancerosas incluyen modificaciones en su forma, tamaño, apariencia presentando aberraciones en el número de cromosomas, cambios químicos y bioquímicos, una de cuyas consecuencias es la aparición de antígenos propios de las células cancerosas (Good R. 1990).

Las células cancerosas pueden acumular múltiples mutaciones en genes cruciales, permitiendo su replicación autónoma e invasión. A pesar de todo esto, una mutación en un gen particular es un evento relativamente raro, e incluso después de un daño químico deliberado, la frecuencia de mutación en un gen particular es de 10^{-6} , lo que implica, que solo una célula en un millón está mutada. La frecuencia de mutación en las células tallo humanas es de aproximadamente 10^{-10} por cada división celular, a pesar de esta probabilidad tan baja, y debido al gran número de divisiones celulares, es muy probable que todos los adultos presenten muchas células mutadas. Afortunadamente un suceso como el cáncer requiere al menos de cinco mutaciones de genes; c-myc, c-fos, c-sys y c-cyb (Valle A. y Weiss B. 2003).

Al ser muchos los factores que pueden inducir el desarrollo de cáncer, es entendible que todos los tipos celulares puedan sufrir, en algún momento de la vida la transformación neoplásica (Rojas E. 1996). Es por esto que existen alrededor de un centenar de formas clínicas de cáncer las cuales pueden agruparse según el tipo de tejido afectado: Leucemias, Linfomas, Sarcomas, Carcinomas y Adenomas (Figura 1).

TIPOS DE CANCER	TEJIDO QUE AFECTA
LEUCEMIAS	TEJIDO HEMATOPOYETICO EN MEDULA OSEA
LINFOMAS	GANFLIOS LINFATICOS
SARCOMAS	TEJIDOS DE SOSTEN: TEJIDO CONECTIVO, MÚSCULOS, VASOS SANGUÍNEOS Y LINFÁTICOS
CARCINOMAS	MELANOMA, EPITELIOS MUCOSOS, SISTEMA NERVIOSO, Y VICERAS (HIGADO, PÁNCREAS, ETC).
ADENOMAS	GLANDULAS

Figura 1. Formas clínicas de cáncer y tejido afectado, (Rojas E.1996).

MELANOMA

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos, los cuales son células que se derivan de la cresta neural y producen el pigmento melanina. A pesar de que la mayoría de los melanomas se originan en la piel, también podrían crecer en las superficies mucosas o en otros lugares a los cuales han emigrado las células de la cresta neural. El melanoma se presenta predominantemente en adultos y más de 50% de los casos surgen en áreas de la piel que son aparentemente normales. Entre los primeros signos en el nevo que indican cambios malignos están una coloración más oscura o variable, picazón, un aumento en el tamaño o el surgimiento de formaciones satélites. La ulceración o hemorragia son signos tardíos. El melanoma en mujeres se presenta con mayor frecuencia en las extremidades, y en hombres generalmente se presenta en el tronco, o en la cabeza y cuello, pero puede surgir en cualquier sitio de la superficie cutánea.

Ante cualquier lesión sospechosa se deberá hacer una biopsia, preferiblemente mediante una escisión local y esta debe examinar por un patólogo con experiencia para ver los microestadios. Las lesiones sospechosas nunca deben afeitarse ni cauterizarse. Los estudios que se han llevado a cabo muestran que es difícil hacer la distinción entre las lesiones pigmentadas benignas y los melanomas en estadio temprano y hasta los dermatólogos con experiencia pueden tener diferentes opiniones.

Se debe considerar una segunda revisión por un patólogo capacitado para de esta manera reducir la posibilidad de llegar a un mal diagnóstico en un paciente dado (Corona R.1996).

El pronóstico se ve afectado por factores clínicos e histológicos y por la localización anatómica de la lesión. Entre los factores que afectan el pronóstico tenemos: el espesor o grado de infiltración del melanoma, índice mitótico, presencia de infiltración tumoral de linfocitos, el número de nódulos linfáticos regionales implicados y ulceración o hemorragia en el sitio primario. Las lesiones satélites microscópicas de melanoma en estadio I pueden ser un factor histológico de pronóstico precario, pero esto resulta polémico. Las pacientes más jóvenes, y que presentan melanoma que se origina en las extremidades, generalmente tienen un mejor pronóstico. (Balch CM, Soong S, Ross MI, et al 2000).

El melanoma se origina de la transformación maligna de los melanocitos, las células que producen el color de la piel y dan el color oscuro a los lunares. Bajo condiciones normales, los lunares generalmente son benignos, son agrupaciones de células pigmentadas pero a veces un lunar puede convertirse en melanoma. Habitualmente los melanocitos están localizados en la epidermis, en la dermis o en el epitelio mucoso (Jiménez A. 1995 y Ulger A. et al 2005).

En las primeras etapas de su desarrollo, el crecimiento del melanoma tiene lugar de un modo superficial, por lo que cualquier lesión cutánea pigmentada que modifique su aspecto debe ser vigilada estrechamente para efectuar una biopsia en profundidad en un corto plazo y de ser necesario la extirpación del tumor en estadios precoces, siendo el modo más seguro de erradicar esta enfermedad (Moreno K. 2004).

Este cáncer se inicia como una pequeña mancha hiperpigmentada (que fácilmente se puede confundir con un nevo), crece de manera horizontal dentro de la epidermis inicialmente y en algún momento dicho crecimiento pasa a ser vertical, de manera tal que se forma una papula, la que al continuar su crecimiento constituye un nódulo y posteriormente un tumor (Figura 2), (Magaña M. et al. 2003).

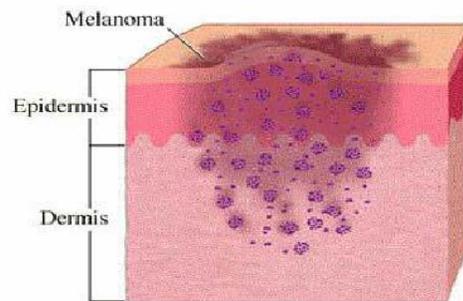


Figura 2. Ubicación de las diferentes capas de la piel. (www.cancer.org)

CLASIFICACIÓN DEL MELANOMA

Tradicionalmente se ha usado la clasificación anatomoclínica del melanoma propuesta por Wallace Clark, 1924-1998, Estados Unidos en cuatro tipos: Melanoma lentigo maligno, Melanoma de extensión superficial, Melanoma maligno “nodular” y Melanoma acral lentiginoso (Magaña M. et al. 2003).

Melanoma lentigo maligno. Supone un 5-10% del total de casos de melanoma, aparece casi siempre en individuos de más de 60 años, en la cara y sobre una piel con importante daño actínico. Tiene una fase inicial con crecimiento radial superficial muy prolongada (hasta 10 años o más), que ha recibido los nombres de melanosis de Dubreuilh y peca melanica de Hutchinson (Ferrándiz F. 1996).

Suele localizarse en zonas expuestas a la luz solar, principalmente en la cara (mejillas) y cuello; puede afectar mucosas por contigüidad. Reinicia como una lesión plana, de color café oscuro, que crece con lentitud hasta 7 cm en promedio, y muestra elevaciones oscuras, con hiperqueratosis y ulceración. Algunos autores lo llaman lentigo maligno cuando está confinado a epidermis (in situ) y melanoma lentigo maligno cuando invade dermis (Arenas R. 2005).

Melanoma de extensión superficial. Es el tipo clínico patológico de melanoma más frecuente (70% de los casos). Su presentación suele ser más precoz, con una incidencia máxima entre los 40 y los 60 años. Las localizaciones más habituales son el tronco y las piernas; en el tronco es más frecuente en los hombres y en las piernas en las mujeres.

Tiene una fase de crecimiento radial superficial, que puede durar meses o incluso años, pero es más corta que en el melanoma lentigo maligno. Aunque tiene similitud con la de este tipo de melanoma, en el de extensión superficial las lesiones iniciales suelen ser algo sobreelevadas y pueden mostrar hiperqueratosis y colores variados en su superficie. Los fenómenos de regresión son más intensos, con formación frecuente de lesiones arciformes, a veces concéntricas y áreas blanquecinas, eritematosas o violáceas. En la fase de invasión en profundidad se producen nódulos, ulceración que se conoce como hemorragia. La metástasis se originan por diseminación linfática y hemática; las primeras suelen ser más precoces (Ferrándiz F. 1996).

Melanoma maligno “nodular”. Es la forma más agresiva; representa 10 a 20% de los melanomas; sobreviene entre el quinto y sexto decenios de la vida; predomina en varones; se observa como una placa o tumoración semiesférica de aspecto “nodular”, de color café a azul oscuro, de superficie lisa, ulcerada o vegetante, que asienta con frecuencia en una piel normal (Arenas R. 2005).

La localización predominante es en el tronco. En la raza blanca un 10-15% de los melanomas son de este tipo. Es un tumor de muy alta agresividad, que origina metástasis linfáticas y hemáticas (Ferrándiz F. 1996).

Melanoma acral lentiginoso. Se observa más a menudo en personas de raza negra y en mestizos; es la forma más frecuente en México; afecta palmas, plantas o falanges distales; puede ser periungueal o subungueal, y acompañarse de paroniquia y distrofia ungueal; produce manchas irregulares de crecimiento radial, y en etapas avanzadas genera formas exofíticas (Arenas R. 2005).

La transformación a la fase invasora a menudo pasa inadvertida por las peculiares localizaciones del tumor y la mayor parte de las veces se detecta por ulceración y hemorragia, debido al diagnóstico tardío por parte de médicos sin experiencia en este campo (Ferrándiz F. 1996).

CLASIFICACIÓN DEL MELANOMA EN BASE A LA INVASIÓN

Existe otra clasificación de Clark que se usa para evaluar el nivel de invasión: nivel I, intraepidérmico; nivel II, hasta dermis papilar; nivel III dermis papilar completa; nivel IV hasta dermis reticular, y nivel V hasta tejido celular subcutáneo.

Según el espesor de la lesión, medida con un micrómetro adaptado al microscopio, Breslow los divide en cinco grupos: menores de 0.76 mm, de 0.76 a 1.49 mm, de 1.5 a 2.49 mm, de 2.50 a 3.99 mm y mayores de 4 mm (Figura 3), Esta clasificación se ha relacionado con supervivencia a cinco años (Orkin M. *et al* 1994).

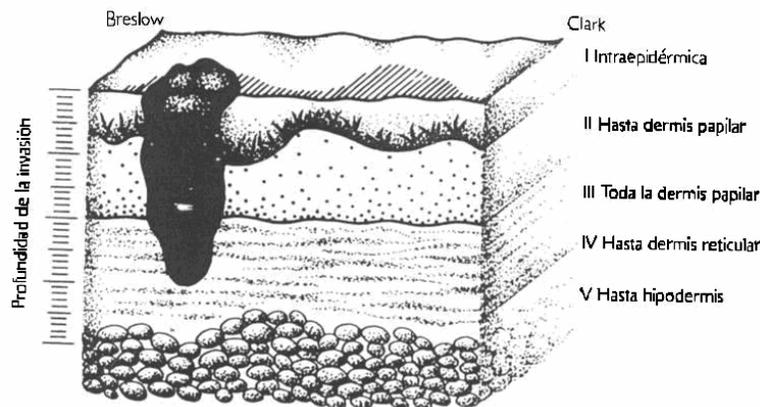


Figura 3. Clasificación de los melanomas según Breslow y Clark. (Arenas R. 2005)

TRATAMIENTO

Cirugía: El tratamiento electivo del melanoma es la extirpación quirúrgica y las posibilidades del paciente dependen, en gran medida, de que se realice en el estudio más precoz posible. El margen de recesión de la lesión es de 1-3 cm, la conveniencia de efectuar una extirpación profiláctica de los ganglios linfáticos regionales y la asociación de diversas pautas de quimioterapia e inmunoterapia ha sido objeto de considerables debates, sin haber llegado a demostrarse un claro aumento de la supervivencia con ninguna de ellas (Ferrándiz F. 1996).

Tratamientos sistémicos: Quimioterapia e inmunoterapia (interferón alfa y gamma a altas dosis e IL-2), son las únicas citocinas que han demostrado eficacia terapéutica en el tratamiento del melanoma (Pinar S. *et al* 2004).

Pese al desarrollo de modernas técnicas de cirugía y trasplantes, nuevas y efectivas drogas citotóxicas, que han permitido tratar con éxito algunas patologías

neoplásicas, frecuentemente algunas células cancerosas sobreviven a estas terapias y se diseminan en el organismo, haciendo necesario el desarrollo de nuevos tratamientos complementarios a los actuales. Uno de estos métodos es la manipulación del sistema inmunológico para combatir tumores, lo que se denomina inmunoterapia del cáncer. Se ha producido un creciente interés por utilizar al sistema inmunológico como herramienta en el tratamiento del cáncer. Citocinas como interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ) e interferón alfa (IFN- α) son comúnmente utilizadas como terapias adyuvantes en algunas neoplasias (López M. *et al* 2004).

Aunque muchos de estos agentes inmunoterapéuticos han mostrado su eficacia, todavía existen muchos aspectos por definir para lograr una estrategia terapéutica verdaderamente efectiva e inocua (Torrilla A. y Noris G. 2004).

SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmunológico tiene la capacidad de distinguir lo propio (como componentes inherentes al organismo) de lo extraño (invasores como bacterias, virus o parásitos) haciendo uso de diferentes mecanismos de defensa y reconocimiento celular. La necesidad de estos mecanismos inmunológicos conduce a la reacción de tipo celular y humoral.

El sistema inmunológico es importante en la medida que sus alteraciones funcionales son causa de numerosas enfermedades, en su estudio se relacionan tanto los aspectos anatómicos, como son los órganos y tejidos que lo constituyen, así como el estudio de una serie de células y moléculas liberadas en la respuesta del organismo ante la entrada de un antígeno (Báscones A. y González M. 2003).

Este sistema ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo. Para eliminar a un antígeno que haya establecido una infección (atravesando las barreras epiteliales de los vertebrados) lo primero que debe de hacer el sistema inmunológico es reconocerlo como tal y a continuación desarrollar una respuesta inmunológica adecuada para destruirlo (Regueiro G. *et al.*, 2002).

La respuesta inmunológica depende de cuatro tipos celulares principales: Macrófagos, Células NK, Linfocitos derivados del Timo (linfocitos T) y Linfocitos B. Estas interactúan entre sí, de manera directa ó por acción de interleucinas (Suites P. *et al.* 1994 y Ju. S. *et al.* 2007).

Hay dos niveles de defensa contra invasión por agentes externos: inmunidad innata e inmunidad adaptativa (conocida también como inmunidad adquirida).

INMUNIDAD INNATA

Llamada en ocasiones inmunidad natural, se presenta desde el nacimiento y se debe a elementos inespecíficos. Las superficies corporales, en especial la piel, forman la primera línea de defensa contra la penetración de microorganismos; cuando esto ocurre, los microorganismos invasores se enfrentan, al principio, con otros elementos del sistema inmunitario innato (Suites P. *et al.* 1994).

La inmunidad innata se basa en la activación tanto de una serie de moléculas preformadas, proteínas del complemento, así como de células, (fagocitos monocitos, macrófagos y neutrófilos) y mastocitos, que tienen receptores innatos para múltiples patógenos. Algunos mecanismos innatos no actúan inmediatamente, si no que inducen una respuesta a la infección, como son las células asesinas naturales (NK, del inglés Natural Killer Cells), ó ciertas moléculas como los interferones (especialistas en defendernos de los virus); entre otras citocinas y mediadores que producen inflamación (Regueiro G. *et al.*, 2002).

INMUNIDAD ADAPTATIVA

En la respuesta inmune adaptativa ó adquirida, el agente extraño ó inmunógeno desencadena una serie de sucesos que llevan a la activación de linfocitos, así como a la producción de anticuerpos y linfocitos efectores altamente específicos para el inmunógeno (Suites P. *et al.* 1994 y Ross. M, *et al.* 2005). Las características que definen la inmunidad adaptativa 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. El sistema inmunitario adaptativo es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de sustancias microbianas y no microbianas.

Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos (Abbas *et al* 2004).

SISTEMA LINFOIDE

Las células que forman parte del sistema inmunológico se organizan en órganos y tejidos, estas estructuras reciben el nombre de sistema linfoide. Los órganos del sistema linfoide son desde el punto de vista anatómico de dos tipos: a) órganos con capsula bien definida (como el caso del bazo, el timo, ganglios linfáticos y médula ósea) y b) acumulaciones difusas de tejido linfoide (se trata de tejido linfoide no encapsulado que se asocia a las mucosas). Desde un punto de vista funcional, los órganos y tejidos linfoides se dividen en primarios ó centrales (médula ósea y timo) y secundario ó periféricos (bazo, ganglios linfáticos) (Regueiro G. *et al.*, 2002).

BAZO

El bazo tiene aproximadamente el tamaño de un puño cerrado y es el órgano linfático de mayor tamaño (Figura 4). Está situado en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad abdominal y tiene una irrigación abundante (Ross. M., *et al.* 2005).

Cuando se produce una infección que no puede ser eliminada por los mecanismos innatos es necesaria una respuesta adaptativa que se genera contra un antígeno el cual es transportado al bazo por vía sanguínea ó a los ganglios por vía linfática y es allí donde es reconocido por linfocitos que están en circulación. La organización de dichos órganos permite las interacciones necesarias entre las distintas células del sistema inmunológico para que se pueda generar una respuesta adaptativa. En los órganos linfoides secundarios, se produce la activación y proliferación de los linfocitos (Regueiro *et al* 2002).

El bazo es un órgano linfoide secundario y efectúa algunas funciones no inmunitarias, como filtración de la sangre y conversión de hemoglobina a bilirrubina. El bazo tiene dos tipos de tejidos principales: pulpa blanca y pulpa roja, que se sostiene por una malla reticular densa de poro fino. La pulpa blanca contiene folículos linfoides centrales formados, en su mayor parte, con linfocitos B, rodeados por regiones de linfocitos T dependientes. La pulpa roja, eritroide, sirve como filtro para eritrocitos dañados o viejos, y como sitio de reserva para hematopoyesis extramedular (Suites P. et al. 1994).

Las funciones principales del bazo comprenden: Activación y proliferación de los linfocitos B y T, producción de anticuerpos contra antígenos presentes en la sangre circulante, eliminación de antígenos macromoleculares de la sangre, diferenciación de los plasmocitos, así como la secreción de anticuerpos, que ocurren en la pulpa blanca (Ross. M., et al. 2005).

En el bazo se encuentran todos los tipos celulares necesarios para generar respuestas inmunes celulares y humorales (linfocitos T, linfocitos B, células NK, macrófagos) además el entramado hístico necesario para su correcta interacción mutua (Regueiro G. et al., 2002).

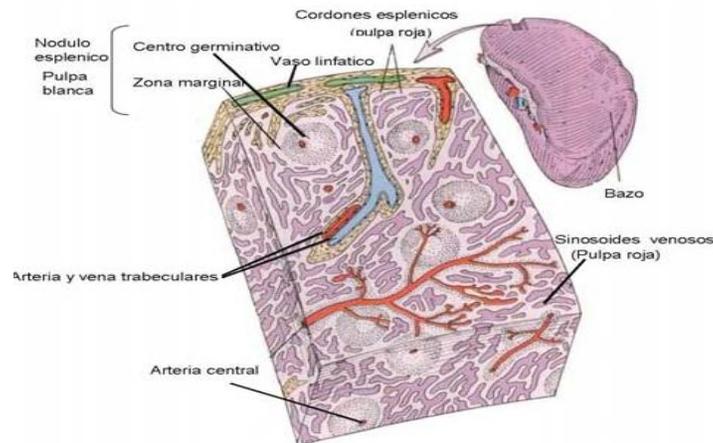


Figura 4. Estructura interna del Bazo. (Ross M. 2005)

LINFOCITOS

Las células responsables de la especificidad inmunitaria pertenecen a una clase de glóbulos blancos conocidos como linfocitos. Se encuentran en grandes cantidades en la sangre, en la linfa (el líquido incoloro de los vasos linfáticos que conectan los nódulos linfáticos del cuerpo) y en órganos linfoides especializados como el timo, los nódulos linfáticos, el bazo y el apéndice (Alberts B. *et al* 1994). Aunque morfológicamente todos los linfocitos son distinguibles entre sí, desde el punto de vista funcional se reconocen dos tipos básicos de linfocitos, los linfocitos T y los linfocitos B. En los humanos, dentro de los linfocitos T se incluyen dos subtipos: los linfocitos CD4⁺ y los linfocitos CD8⁺. El CD4⁺ correspondería a los linfocitos T cooperadores ó Th (del inglés helper) y los CD8⁺ ó linfocitos T citotóxicos ó Tc, de los linfocitos B no se han descrito subtipos (Rojas E. 1996 y Ross. M., *et al.* 2005).

LINFOCITOS B

Los linfocitos B se diferencian en órganos equivalentes a la médula ósea ó el tejido linfático asociado con el intestino. Estos linfocitos tienen una vida de duración variable y participan en la síntesis y secreción de los diversos anticuerpos circulantes, también llamados inmunoglobulinas, que son las inmunoproteínas asociadas con la inmunidad humoral. La cual está mediada por anticuerpos que actúan en forma directa sobre el agente invasor. Estas células constituyen entre el 20% y el 30% de los linfocitos circulantes, los linfocitos B expresan en su superficie las inmunoglobulinas M (IgM) y la inmunoglobulina D (IgD), así como las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (Ross M.H. *et al* 2005). Las inmunoglobulinas se ocupan de fijar al antígeno, activar a la célula y desencadenar la secreción de inmunoglobulina soluble al suero y tejidos (Suites D. *et al.* 1991).

LINFOCITOS T

Los linfocitos T son un linaje especial de linfocitos que surge de la maduración de células madre en el timo; de aquí su nombre. Los linfocitos T inician la respuesta inmunitaria, intervienen en reacciones efectoras específicas de antígeno y regulan la actividad de otros leucocitos por medio de la secreción de factores solubles (Suites D. *et al.* 1991).

Tienen una vida larga e intervienen en la inmunidad mediada por células y representan entre el 60% y el 80% de los linfocitos circulantes. Los linfocitos T expresan los marcadores CD2, CD3 y CD7; sin embargo, se sub clasifican según tengan ó no otros marcadores superficiales importantes: CD4 y CD8 (Ross M. *et al* 2005).

Los linfocitos CD4 o auxiliares (Th) se dividen en Th1 y Th2 según el tipo de citocinas que producen, los linfocitos Th1 secretan interferón gamma (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y en la hipersensibilidad retardada. Por su parte, los linfocitos Th2 producen interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13), cooperando con la respuesta inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B y del cambio de isotipo de los anticuerpos para la producción de inmunoglobulina E (IgE) e inmunoglobulinas g IgG1 (en ratón) o IgG4 (en humanos) promoviendo la diferenciación de eosinófilos y mastocitos (López M. 2003).

Los linfocitos T que expresan el marcador CD8 reciben el nombre de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Ross M.H. *et al* 2005). Ejercen su función efectora mediante la secreción de IL-2, interleucina 16 (IL-16), IFN- γ y TNF- α fundamentalmente (Aguzzi A. *et al* 2005).

El papel biológico de los linfocitos T en el conjunto de la respuesta inmune específica es central ya que en este tipo celular reside el control de los linfocitos B y de sus productos, las inmunoglobulinas. Los linfocitos T son células centrales en la función y regulación del sistema inmunológico. Además de tener funciones directas como la citotoxicidad ó citolisis, regulan el funcionamiento de su propio linaje y de otros linajes (linfocitos B, monocitos, etc.) mediante contactos celulares ó mediadores solubles denominados citocinas. (Regueiro G. *et al.*, 2002).

CÉLULAS NK

Las células NK (Natural Killer) son un subconjunto de leucocitos que surgen de un precursor en la médula ósea. Estas células se caracterizan por su propiedad de lisar células tumorales (referida como actividad NK) sin que exista presentación de antígeno por medio de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, sin afectar las células del huésped (Suites P. *et al.* 1994 y Ross. M, *et al.* 2005).

Estas células representan el 5% de los linfocitos, se distinguen morfológicamente por ser linfocitos granulares grandes (LGL) y tienen la propiedad de destruir células infectadas por virus, células alogénicas.

Las NK son capaces de mediar su acción, sin activación previa ni restricción aparente del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC), de forma diferente a como lo hacen los linfocitos T y B; por esta razón el nombre de asesina natural (Arango P. *et al.* 1999). Hoy en día sabemos que estas células no solamente son capaces de matar tumores si no que juegan un importante papel en la defensa frente a patógenos, especialmente virus e incluso en el rechazo de órganos trasplantados. Además de su función citotóxica las células NK tienen capacidad para producir diversas citocinas y por lo tanto también tienen una función reguladora (Regueiro G. *et al.*, 2002)

CITOCINAS

En los últimos 25 años se ha descubierto, caracterizado y purificado un grupo importante de mediadores peptídicos. Estos mediadores, denominados citocinas, funcionan como reguladores en alta y baja respuestas inmunitarias, inflamatorias y reparadoras a la lesión. Las citocinas producidas por linfocitos se designan linfocinas, en tanto que los péptidos sintetizados por monocitos o macrófagos se conocen como monocinas (Suites P. *et al.* 1994).

El término citocina se aplica a un gran número de moléculas diferentes, cuya función es transmitir señales entre células en el curso de una respuesta inmunitaria. Todas las citocinas son proteínas y algunas llevan adosados azúcares (glucoproteínas). Suelen actuar de forma autocrina (sobre la misma célula productora), ó paracrina (sobre células cercanas) ó endocrina.

Las citocinas se unen a receptores específicos de la membrana celular, desencadenando una cascada de respuestas implicadas en la inducción, ampliación ó inhibición de una serie de genes regulados por citocinas a nivel nuclear (Roitt I. *et al* 2000).

Son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Además de las células del sistema inmune, las citocinas son generadas por monolitos, linfocitos y otros tipos de células que actúan como mediadores intercelulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana.

Las citocinas inician la respuesta infamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica. Las citocinas median la proliferación y diferenciación de los linfocitos después especializadas en la respuesta inmunitaria adaptativa. Una de las respuestas más importantes de los linfocitos T al reconocimiento del antígeno, es la producción de citocinas y dentro de éstas la IL-2, la cual es un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por el antígeno y es responsable de la expansión clonal de las células T, tras el reconocimiento del antígeno.

INTERLEUCINA 2

La IL-2 ha sido utilizada sola o en combinación en la inmunoterapia adaptativa tanto en animales como en humanos para inducir regresión de tumores en estadios avanzados mostrando una respuesta antitumoral. Se ha determinado que el RIL-2 expresado en las células tumorales es funcional y que la respuesta que se obtenga después de la unión al receptor depende de la concentración de IL-2 usada, ya que a concentraciones menores de 10 UI/ml la IL-2 tiene un efecto proliferador, mientras que a concentraciones a partir de 100 UI/ml se observa un efecto inhibitor, aunque su administración en altas dosis, vía sistémica, perturba vías de regulación hematopoyética y puede generar una serie de efectos secundarios adversos, como son: síndrome de goteo capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio son muy alentadores, ya que representan un avance relevante que contribuye con datos muy importantes en

esta área del conocimiento; sin embargo, si lo que pretendemos es usar IL-2 como una alternativa terapéutica para los pacientes con melanoma, debemos de contar con una forma de administración que evite los graves efectos tóxicos producidos por IL-2 a altas dosis.

La Interleucina-2 (IL-2), inicialmente denominada factor de proliferación de la célula T (TCGf, del inglés, T cell growth factor), factor mitogénico de timocitos (TMF), factor auxiliador de células asesinas o factor co-estimulador (KHF) es la principal citocina responsable de la progresión de los linfocitos T (LT) desde la fase G1 a la "S" del ciclo celular. La IL-2 secretada es una glucoproteína de 14-17 kD codificada por un solo gen del cromosoma 4 en los seres humanos. También presenta un rango de punto isoelectrico (PI) de 4-5 que la caracterizan. El tamaño heterogéneo de la proteína madura se debe a la extensión variable de la glucosilación de un polipéptido de aproximadamente 130 aminoácidos. Aunque es una molécula glicosilada, los hidratos de carbono no son esenciales para ejercer sus efectos biológicos, dado que la IL-2 recombinante obtenida en células procarióticas es igualmente efectiva en la activación de los LT.

La IL-2 es producida por las células T CD4+, y en menor cantidad por las células T CD8+. La IL-2 actúa sobre la misma célula que la produce; es decir, funciona como un factor de proliferación autocrino. La IL-2 también actúa en los linfocitos T cercanos, incluidas las células CD4+ y CD8+, y por lo tanto también es un factor de proliferación paracrino. Durante las respuestas inmunitarias fisiológicas, la IL-2 no circula en la sangre para actuar a distancia, por lo que no se le considera factor de proliferación endocrino. Por este motivo, la IL-2 se denominó inicialmente factor de crecimiento de las células T. (Figura 3)

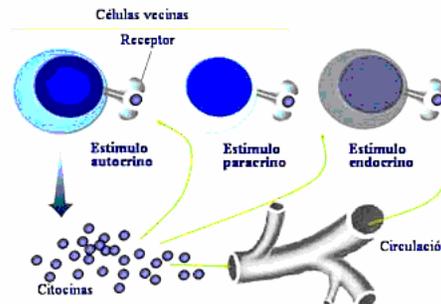


Figura 5. Acciones de las citocinas. (Tomado de Regueiro G.2002)

Las principales acciones de la IL-2 se ejercen sobre los linfocitos T, lo cual conduce a una expansión de la respuesta inmune cuya magnitud puede ser estimada por determinación de los niveles de IL-2. Sobre dichas células también posee actividad para inducir la síntesis de interferón gamma (IFN γ) y linfoxina (TNF β) y es capaz de programarlos hacia la apoptosis.

Representa al miembro más estudiado de la familia de las interleucinas. Es producida exclusivamente por los linfocitos T (específicamente las células T-helper) activándose en respuesta a un antígeno y mitógenos.

La IL-2 Humana es una cadena polipeptídica que contiene 133 aminoácidos. Es una glicoproteína, en donde el enlace O-glicosídico, esta enlazado a un residuo de treonina en la posición número tres. Los análisis de difracción de rayos X muestran que es una proteína de estructura globular que consiste de 4-hélices estrechas interrumpidas por curvas y bucles. Aparece desprovista de cualquier conformación y contiene un solo puente disulfuro que estabiliza a la cisteína en la posición 58 y 105.

La IL-2 también sirve como un factor de crecimiento para la activación de los linfocitos B, además mejora la producción y secreción de anticuerpos. De esta manera potencia eficazmente la respuesta inmune humoral.

Otra actividad importante que desempeña esta citocina es la de promover el crecimiento de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés), promoviendo su diferenciación formando los linfocitos asesinos activados (LAK por sus siglas en inglés), los cuales exhiben una mayor habilidad para eliminar células tumorales o células infectadas por virus.

Los experimentos realizados a principios de 1980 demostraron que los linfocitos incubados *in vitro* con IL-2, podrían matar a una amplia gama de líneas celulares tumorales, incluyendo el melanoma y células tumorales de colon. Los estudios clínicos se han enfocado en que esto es efectivo en los humanos, ya que se han tomado células LAK de la propia sangre de los pacientes y activada *in vitro* usando IL-2 reintroduciéndola en los pacientes, lo que promovió la regresión tumoral en el 10% de los pacientes que padecían melanoma o cáncer renal (Walsh G.2003).

RECEPTOR PARA IL-2

La acción de IL-2 es mediada por la unión no covalente de esta a su receptor (RIL-2). El receptor pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento hematopoyético, es de naturaleza multimérica ya que está compuesta por tres proteínas: la primera de 55 KD (p55), se presenta únicamente en células T activadas, y es por eso llamada antígeno Tac (para activación T). El Tac p55 o cadena α , une IL-2 con una baja afinidad Kd de aproximadamente 10⁻⁸M. La unión de IL-2 a células que expresan solamente p55 no genera respuesta biológica detectable. Se ha observado producción de la cadena α , después de la activación antigénica de los linfocitos T. La segunda proteína que lo forma es identificada como una proteína de 70 a 75 KD (p70 o p75) denominada cadena β , cuya afinidad de unión a IL-2 es aproximadamente 10⁻⁹ M. La tercer unidad es la cadena γ del receptor que es una proteína de 64 KD la cual en conjunto con p55 y p75 pueden unir IL-2 con alta afinidad con un KD de aproximadamente 10⁻¹¹ M. La expresión de diferentes combinaciones de estos tres componentes, genera varias formas del receptor para IL-2, cada una de ellas con diferentes afinidades de enlace.

La característica particular de la IL-2 es la existencia de al menos dos receptores; cada uno es capaz de unirse a la IL-2 con diferente afinidad. La cadena alfa, también conocida como proteína Tac, se une a la IL-2 con baja afinidad, mientras la cadena beta se une a la IL-2 con una afinidad intermedia. Parece que la combinación de las dos formas de cadena da origen a un receptor de alta afinidad responsable de la internalización de ligandos. Evidencias recientes sugieren que la cadena beta sola es responsable de la traducción de la señal de IL-2 presente a concentraciones de 10 a 100 UI/ml por encima de lo sugerido para la respuesta fisiológica.

La IL-2 se pliega en una proteína globular que contiene dos grupos de hélices- α paralelas en parejas, estando orientadas cada hoja en una leve angulación respecto de la otra. Esta estructura plegada en hélice- α es común a todas las citocinas que interaccionan con receptores que tiene la secuencia WSXWS, incluida la IL-3, la IL-4, IL-5, La IL-6, el GM-CSF y el G-CSF. Normalmente, se transcribe, sintetiza y secreta por las células T sólo tras la activación por los antígenos. La síntesis de la IL-2 suele ser transitoria, con un pico precoz de secreción que se produce aproximadamente 4 horas después de la activación; la

eliminación de la señal activadora conduce a una declinación de los valores de RNAm para IL-2, debido al cese de transcripción.

Las principales acciones de la IL-2 se ejercen sobre los linfocitos T, lo cual conduce a una expansión de la respuesta inmune cuya magnitud puede ser estimada por determinación de los niveles de IL-2. Sobre dichas células también posee actividad para inducir la síntesis de IFN γ y linfotoxina (TNF β) y es capaz de programarlos hacia la apoptosis.

LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas concéntricas compuestas por una o varias bicapas de lípidos anfipáticos, los cuales delimitan uno o varios compartimentos acuosos, también son definidos como, estructuras esféricas cerradas, formadas por uno o varios lípidos concéntricos que contienen una fase acuosa (Figura 6).

Debido a sus características, los liposomas se han utilizado como modelos experimentales en el estudio de algunas propiedades de la membrana celular, como: la permeabilidad, la fluidez, la organización molecular de los lípidos y de las proteínas membranales, así como la inmunogenicidad de partículas lipídicas asociadas a enfermedades auto inmunes (Bangham, 1968; Margolis, 1984, Baeza *et al.*, 2004).

Además, la interacción liposoma-célula es un modelo para estudiar procesos fisiológicos, como la fusión y la adhesión celular (Papahadjopoulos y Kimelberg, 1973; Papahadjopoulos *et al.*, 1990; Leckband *et al.*, 1993). Debido a la semejanza del arreglo lipídico entre el liposoma y la matriz membranal, así como a la manera espontánea en que se forman los liposomas en un medio acuoso, estas vesículas se han empleado como un modelo experimental de estructuras precelulares en los estudios sobre el origen de la vida, ya que al formarse aíslan microambientes de los alrededores y al mismo tiempo, constituyen una barrera con una permeabilidad altamente específica (Baeza *et al.*, 1987; 1990; 1992). Finalmente, la capacidad de los liposomas para atrapar moléculas biológicamente activas en su interior acuoso o en su bicapa lipídica, ha permitido que estas vesículas puedan utilizarse como vehículos para transportar fármacos, enzimas o

ácidos nucleícos a células en diferentes sistemas biológicos (Poste, 1980; Itani *et al.*, 1987; Mannino y Gould, 1988; Friedmann, 1989; Szelei y Duda, 1989; Keown *et al.*, 1990; Janoff, 1992, Ibáñez, *et al* 1996).

Cuando los liposomas se usan como transportadores de sustancias a la célula, es muy importante alcanzar un encapsulamiento óptimo, una adecuada protección a las sustancias que llevan y una selectividad contra las células a las que van dirigidos, por esta razón se ha estudiado mucho acerca de la composición y el tipo de lípidos que los forman.

Generalmente se usan liposomas unilamelares de 0.2 a 0.5 μm de diámetro, porque son muy estables e interaccionan mejor con las células, formados con lípidos anfipáticos que normalmente conforman las membranas celulares. Además, al aplicar los liposomas en animales, se pueden dirigir hacia un tipo específico de células, uniendo en su superficie anticuerpos, proteínas virales, glucolípidos o lectinas (Straubinger y Papahadjopoulos, 1983; Kaneda *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1992; Trubetskoy *et al.*, 1992). También se pueden formar con una composición lipídica semejante a la de las membranas de las células a las que se van a dirigir (Burkhanov *et al.*, 1985; Santiago, 1996).

Al interaccionar el liposoma con la célula, puede ocurrir la fusión de su bicapa lipídica de este con la membrana celular, o bien, las vesículas pueden ser introducidas a la célula por endocitosis. En cualquiera de estos dos procesos, los liposomas vacían su contenido en el citoplasma celular (Poste, 1980).

Los liposomas pueden clasificarse de acuerdo al número de vesículas que presenten, de esta manera se tienen:

1. **Vesículas multilaminares:** Su tamaño va de 500 a 5000 nm y está constituido por varias bicapas concéntricas.
2. **Vesículas largas unilaminares:** Tienen un tamaño de 200 a 800 nm.
3. **Vesículas pequeñas unilaminares:** Tienen un tamaño de 100 nm. Conformada por una sola bicapa.

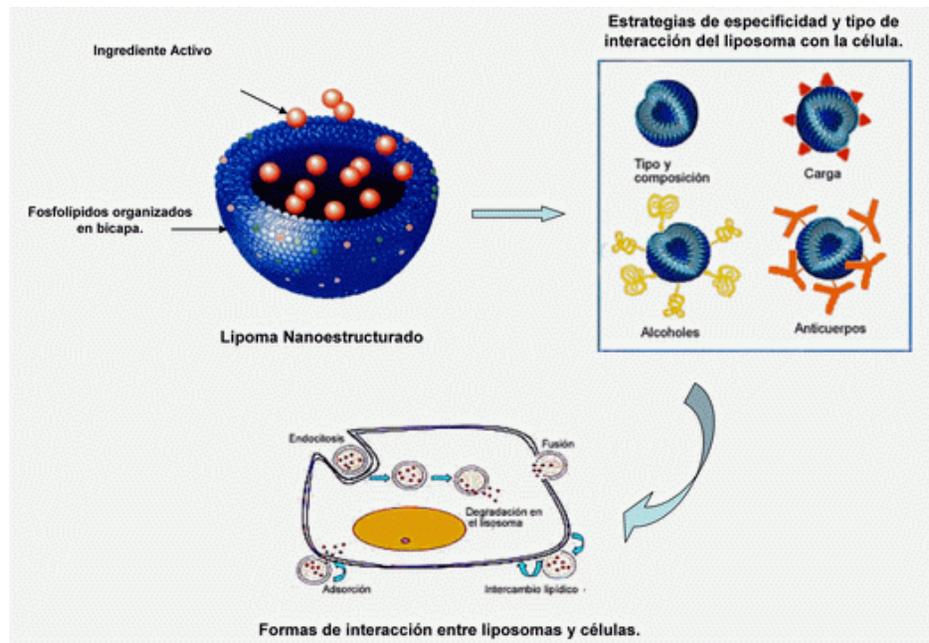


Figura 6. Composición de los liposomas

Entre las ventajas más importantes que ofrecen estos sistemas encontramos que:

- Son biocompatibles.
- Pueden contener fármacos hidrofílicos o fármacos hidrofóbicos.
- Protegen al fármaco de inactivación en condiciones extremas.
- Evitan reacciones no deseadas.
- Proveen la única posibilidad de liberar el fármaco dentro de la célula componentes internos.

El tamaño, la carga y las propiedades de su superficie pueden ser fácilmente cambiadas por la adición de una nueva mezcla de sustancias antes de su fabricación y/o variando los métodos de fabricación.

Lípidos que forman liposomas.

De los diversos grupos de lípidos presentes en las estructuras biológicas, solo los lípidos que constituyen la matriz de las membranas celulares pueden formar a los liposomas, estos son: los fosfolípidos, glicolípidos y colesterol. Un aspecto fundamental en la organización y en la función de la matriz lipídica membranal, es el carácter anfipático de sus lípidos. Una molécula anfipática es aquella que contiene una región hidrofóbica y una región hidrofílica (Gitler, 1969). Las regiones

hidrofóbicas son insolubles en agua y las hidrofílicas son solubles en ella. Los fosfolípidos y glicolípidos presentan una región polar en un extremo de su molécula, constituida por el grupo fosfato y/o una base nitrogenada, o por carbohidratos; y una región no-polar en el otro extremo, constituida por las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos y de esfingosina. La relación de tamaño de la región polar con respecto a la no-polar es de aproximadamente 1/3:2/3 respectivamente (Figura 2), lo cual les permite a estos lípidos asociarse entre sí y formar arreglos moleculares específicos; la bicapa lipídica es un ejemplo de estos agregados (Ibáñez, 1993).

La región hidrofílica del colesterol es su grupo hidroxilo y la parte hidrofóbica la constituye el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. En esta molécula, las regiones polar y no-polar también están orientadas hacia uno y otro extremo, pero la diferencia fundamental con respecto a los otros lípidos anfipáticos, es que su región polar es muy pequeña, por lo cual, el colesterol, por sí sólo, no forma bicapas lipídicas (Cullis y Hope, 1985).

JUSTIFICACIÓN

La incidencia de melanoma (cáncer de piel) en todo el mundo ha aumentado, afectando principalmente a personas con piel clara. Sin embargo, se desconocen los efectos genéticos y bioquímicos que transforman al melanocito, una célula que raramente prolifera en la piel adulta normal, es una célula capaz de replicarse dando lugar a un tumor muy invasivo y a menudo fatal (Puig L. 1997 y Ulger A. et al 2005).

El melanoma afecta principalmente la piel en un 90%, pero también puede localizarse en ojos en el 9% de los casos y con menor frecuencia en mucosas y llega a producir metástasis en cadenas ganglionares y órganos como hígado y pulmón. (Rosas *et al* 2003). Constituye el 3% de las neoplasias malignas cutáneas teniendo una mortalidad del 65% por cáncer. En México afecta extremidades inferiores casi 50%), pie (43%), cabeza (23%), tronco (13%), extremidades superiores (12%) y cuello (2%) y ocupa el tercer lugar entre los cánceres de piel, con 14.1 por ciento. Afecta a todas las razas, pero es más frecuente en caucásicos que en sujetos de raza negra, orientales o hindúes. Afecta ambos sexos; se registra de los 20 a los 60 años de edad y es excepcional en los niños (Arenas R. 2005).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que 100 UI/ml de IL-2 tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaCU). Sin embargo, se desconoce el efecto de IL-2 *in vitro* e *in vivo* sobre otro tipo de células neoplásicas como las de melanoma cultivado en presencia de altas y bajas concentraciones de IL-2. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluará la proliferación de células de la línea de melanoma B16F0 en presencia de IL-2 en forma libre. Asimismo, se analizó el efecto de la citocina en forma libre y después encapsulada en ratones con melanoma de la línea B16F0 en las mismas concentraciones.

HIPÓTESIS

Se sabe que 100 UI/ml de IL-2 tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de células de CaCU, mientras que 10 UI/ml incrementan su proliferación. Por tanto, si realizamos cultivos *in vitro* e *in vivo* de células B16F0 de melanoma en presencia de 10 y 100 UI/ml de IL-2 se obtendrá un efecto similar sobre su proliferación, al observado en CaCU.

OBJETIVO

Evaluar la proliferación *in vitro* e *in vivo* de células de melanoma B16F0 en presencia de 10 y 100 UI/ml de IL-2.

OBJETIVOS PARTICULARES

Cultivar la línea celular B16F0 de melanoma.

Realizar ensayos de proliferación *in vitro* de la línea celular B16F0 en presencia y ausencia de 10 y 100 UI/ml de IL 2 en forma libre.

Evaluar la proliferación de la línea celular por la técnica de cristal violeta.

Inducción de masas tumorales en ratones hembra de la cepa Black C57 con la línea de melanoma.

Administrar, como tratamiento 10 y 100 UI/ml de IL-2 libre a ratones con tumor inducido.

Administrar, como tratamiento 10 y 100 UI/ml de IL-2 encapsulada en liposomas a ratones con tumor inducido.

.

MÉTODOS

Cultivo de la línea celular B16F0

Se cultivó la línea celular B16F0 en medio de cultivo DMEN 10% de suero fetal bovino. A estas células se les adicionó 5 ml de Verseno y se dejó reposar por 10 minutos; una vez despegadas se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos, se formó un botón de células al cual se le adicionó 2 ml de medio DMEN al 10% de SFB desactivado y se resuspendieron las células, se toman 0.3 ml y se colocaron en un eppendorf, a éste se adicionó 0.3 ml de azul tripano para observar la viabilidad de las células y se procedió a contabilizar las células en la cámara de Neubauer. De acuerdo a la cantidad de células se realizó el cálculo correspondiente para obtener 1000 células en 200 μ L de medio por pozo.

MATERIAL

Material biológico:

Línea celular de melanoma B16F0.

Medio de cultivo celular DMEN con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Animales de experimentación: ratones hembra de la cepa Black C57.

Cultivo *in vitro*

Material no biológico y equipo.

- Agua desionizada
- Solución salina de Verseno
- Solución amortiguadora de fosfatos
- Glutaraldehído 1.1 %

- Azul Tripano 0.3 %
- Cristal Violeta 0.1 %
- Ácido acético glacial al 10 %
- Placas de 96 pozos fondo plano
- Micropipetas de 1000, 200, 100 y 20 ml
- Botellas para cultivo celular de 25 cm³
- Microscopio invertido
- Cámara de Neubauer
- Tubos eppendorf
- Centrífuga
- Tubos para centrifuga
- Campana de flujo laminar
- Incubadora (atmósfera de 5 % de CO₂, temperatura de 37° C y ambiente saturado de humedad relativa)
- Lector de placas

Material de Bioterio

- Jaulas con rejilla
- Agua y alimento estéril
- Estuche de disección
- Campana de flujo laminar

Experimento en ratones (*in vivo*)

- IL-2 recombinante libre
- IL-2 recombinante encapsulada

Evaluación de la proliferación celular

Se cultivan 1000 células por pozo en una placa de 96 pozos y se evaluó la cinética de proliferación a 24, 72, 120 y 168 horas, es decir; 1, 3, 5 y 7 días respectivamente. Se sembraron las células por triplicado para cada condición y se adicionó la IL-2 correspondiente a 10 y 100 UI/ml en el medio para los pozos problema. Una vez transcurrido el tiempo necesario las células se fijaron con glutaraldehído 1.1% por 20 minutos, se lavaron con agua desionizada y se dejó secar la placa a temperatura ambiente, este procedimiento se realizó cada 48 horas. Una vez cumplidas las 168 horas se añadieron 75 μ L de cristal violeta al 0.1% en cada pozo por 10 minutos con agitación, transcurrido este tiempo se lavó nuevamente con agua desionizada y se dejó secar a temperatura ambiente. Se adicionaron 100 μ L de ácido acético al 10% en cada pozo, posteriormente se mantuvieron por 20 minutos en agitación, para después leer la placa obtenida, a una absorbancia de 570 nm en un aparato de ELISA.

Tratamiento de ratones

Los ratones se clasifican por grupos de acuerdo al tratamiento que se les aplicará:

Grupo Ambientales: Sin inoculación de células y sin tratamiento.

Grupo Control: Inoculados con células, conformado por tres ratones.

Grupo IL-2 a 10 UI/ml: Inoculados con células y tratados con IL-2 a 10 UI/ml.

Grupo IL-2 a 100 UI/ml: Inoculados con células y tratados con IL-2 a 100 UI/ml.

Grupo IL-2 a 10 UI/ml encapsulada: Inoculados con células y tratados con IL-2 a 10 UI/ml en forma encapsulada.

Grupo IL-2 a 100 UI/ml encapsulada: Inoculados con células y tratados con IL-2 a 100 UI/ml en forma encapsulada.

Inoculación de células:

Se inocularon 3 millones de células B16F0 por ratón, vía intraperitoneal. Se utiliza la misma forma de inoculación para cada grupo de ratones.

Aplicación del tratamiento:

A los 30 días de haber realizado la inoculación se aplica vía intraperitoneal el tratamiento de IL-2 a 10 UI/ml o 100 UI/ml libre o encapsulada, según el caso, diariamente durante 5 días para los grupos problema.

Sacrificio de los animales:

Al finalizar la administración de ambos tratamientos se procedió a examinar exteriormente a los ratones en busca de crecimientos tumorales. Posteriormente se realizó la disección y exploración de ambos grupos experimentales, en busca de masas tumorales. Las masas tumorales encontradas fueron medidas con ayuda de un vernier.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN *IN VITRO*

Con el propósito de evaluar el efecto de IL-2 sobre la proliferación de la línea celular B16F0 se realizaron cultivos con 1000 células por pozo en presencia de 10 y 100 UI/ml de esta citocina, se utilizó como control células cultivadas en ausencia de IL-2. La proliferación se evaluó por la técnica de cristal violeta a 1, 3, 5 y 7 días. Los resultados de absorbancia muestran que las células en presencia de 10 UI/ml de IL-2 tienen una mayor proliferación que el control, mientras que las células cultivadas en presencia de 100 UI/ml disminuyen su proliferación sin ser muy diferente al control (Figura 7).

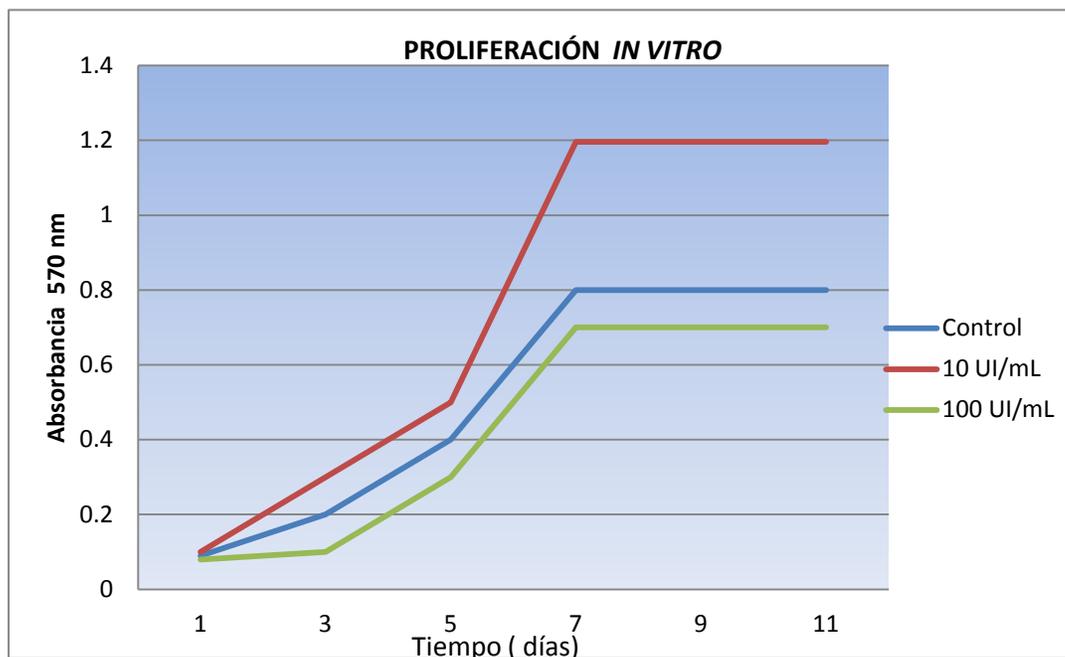


Figura 7. Proliferación *in vitro* a 1, 3 5 y 7 días de la línea celular de melanoma B16F0 en ausencia y presencia de 10 y 100 UI/ml de IL-2 evaluada por la técnica de cristal violeta.

Se observa una mayor proliferación en presencia de 10 UI/ml, mientras que con 100 UI/ml se observa una disminución.

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN *IN VIVO*

Después de observar que IL-2, *in vitro*, tiene un efecto diferencial sobre la proliferación de células de melanoma, similar a la ya reportado para células de carcinoma de cérvix, se decidió evaluar el efecto de esta citocina *in vivo* en tumores de melanoma inducidos en ratones de la cepa Black C57. Se realizaron dos experimentos independientes conformados por 12 ratones cada uno. Para ello, se inocularon 3×10^6 células de melanoma en ratones, posteriormente se administra IL-2 libre a 10 y 100 UI/ml, respectivamente, para cada grupo de ratones durante 5 días consecutivos.

Posteriormente se realizó un tercer experimento en condiciones similares añadiendo un quinto grupo en el cual se utilizará IL-2 encapsulada.

Efecto de 10 UI/ml de IL-2 libre en ratones con melanoma inducido.

En los dos experimentos realizados en los que se administró 10 UI/ml de IL-2 libre observamos en los ratones un aumento en el volumen tumoral.

Para el caso del experimento I en el que se usaron 4 ratones hembra de 4 semanas, y que recibieron IL-2 libre como tratamiento por 5 días. Una vez transcurridos los 5 días de tratamiento se sacrificaron dos ratones. En uno de los ratones se detectaron masas tumorales con la siguiente ubicación: 2 tumores de 1 mm, ubicados en el riñón izquierdo, 2 tumores de 2 mm localizados en el bazo y un tumor de 0.5 mm ubicado en el intestino, lo que representa un masa tumoral total de 17 mm para este grupo. Algunas de las características morfológicas observadas en estos ratones son: intestino grueso con hipertrofia, grasa excesiva en abdomen, útero de color blanco y bazo de color muy oscuro y grasoso (Tabla 1).

En el caso de los dos ratones faltantes estos se mantuvieron por varios meses más, para determinar el tiempo de sobrevida pos-tratamiento.

Experimento I				
Condición	No. de ratones	No. de tumores	Localización y medida	Volumen total
Ambiental	2	0	-	-
Control	3	1	-	-
IL-2 a 10 UI/ml	4	12	Hígado: 5 tumores (1 mm y 4 de 2 mm). Riñón: Un tumor de 1 mm. Útero: Un tumor de 0.5 mm. Bazo: 2 tumores de 2 mm. Intestino: Un tumor de 0.5 mm. Riñón izquierdo: 2 tumores de 1 mm	17 mm
IL-2 a 100 UI/ml	3	2	Útero: 1 tumor de 1 mm Ovario: 1 tumor de 1mm	2 mm
Experimento II				
Ambiental	2	0	-	-
Control	3	0	-	-
IL-2 a 10 UI/ml	4	11	Cerca del bazo: 2 tumores de 2 mm. Intestino grueso: Un tumor de 0.5 mm. Intestino delgado: Un tumor de 0.5 mm Útero: Un tumor de 0.5 mm. Hígado: 5 tumores (Uno de 1 mm y 4 de 2 mm) Riñón: Un tumor de 1 mm	15.5 mm
IL-2 a 100 UI/ml	3	0	-	-

Tabla 1. Masas tumorales localizadas en los grupos experimentales I y II a los cuales se les administró IL-2 en forma libre.

Para el caso del experimento II, también se usaron 4 ratones hembra de 10 semanas, de los cuales se sacrificaron dos al quinto día y otros dos se mantuvieron en el bioterio por varios meses más, dentro del ensayo de sobrevivencia pos-tratamiento.

En uno de los ratones se detectaron 7 masas tumorales con la siguiente localización: 5 tumores en hígado uno de 1 mm y cuatro de 2 mm (Figura 8), un tumor de 1 mm en riñón, uno de 0.5 mm en útero.



Figura 8. Masas tumorales inducidas en ratones C57 tratados con 10 UI/ml de IL-2 en forma libre. Las flechas indican la localización de 4 tumores en hígado. Evaluación a los 5 de tratamiento.

En el otro ratón se encontraron 4 tumores; uno en intestino delgado otro en intestino grueso, ambos de 0.5 mm y dos tumores más cerca del bazo de 2 mm cada uno. Lo que representa un volumen tumoral total de 15.5 mm para el experimento II. En cuanto a las características morfológicas de los ratones se observó el pulmón atrofiado y de color blanco, bazo de color normal, riñones con tonalidad pálida y mucha grasa en abdomen (Figura 9 y Tabla 1).

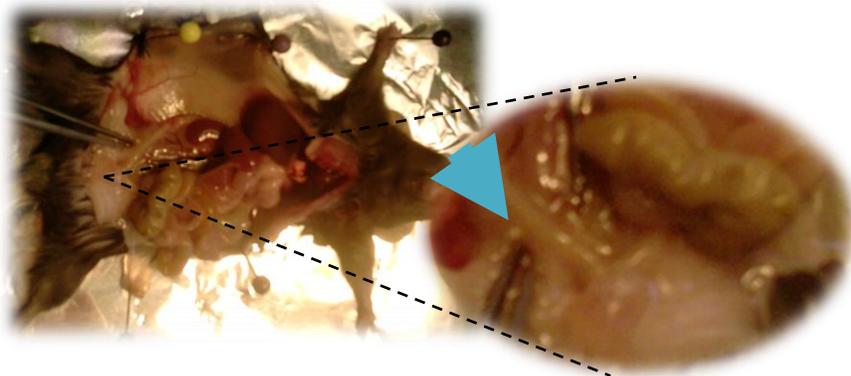


Figura 9. Masas tumorales inducidas en ratones C57 tratados con 10 UI/ml de IL-2 en forma libre. El acercamiento muestra la zona del útero donde se observa un tumor de 0.5 mm, también muestra el intestino con hipertrofia y mucha grasa en abdomen

Administración de 100 UI/ml de IL-2 libre en ratones con melanoma inducido.

En el experimento I, se trataron 3 ratones, de los cuales se sacrificaron dos al día 5 del tratamiento con IL-2 a 100 UI/ml, el otro ratón se dejó para el ensayo de sobrevivencia. En los dos ratones sacrificados se encontró una masa tumoral de 1 mm en cada ratón localizados en útero y ovario, respectivamente. Cabe mencionar que la mayoría de los órganos presentaban una tonalidad pálida, además de un exceso de grasa en abdomen, así como intestino inflamado y pulmones atrofiados (Cuadro1). En el caso del experimento II, se trataron 3 ratones, al igual que en el caso anterior, se sacrificaron dos de ellos y no se encontraron masas tumorales.

Después, de observar los resultados obtenidos en estos primeros dos experimentos, se decidió realizar un tercero, en el que se incluyera en el tratamiento IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos. Esto con el propósito de determinar cuál de las formas de administración de IL-2 es más eficiente en reducir las masas tumorales. Para este experimento se utilizaron 12 ratones y se separaron en grupos de dos para las siguientes condiciones: ambiental, control positivo a tumor, tratados con 10UI/ml de IL-2 libre y encapsulada y con 100 UI/ml de IL-2 libre y encapsulada (Tabla 2).

Experimento		Ambiental	Control	IL-2 (UI/ml)			
				10	100	10	100
				Libre		Encapsulada	
III	No. de ratones	2	2	2	2	2	2
	No. de tumores localizados al día 5 de tratamiento	0	1	1	1	1	1
	Volumen (cm ³)	0	7.42 8.18	7.42 11.49	6.8 8.37	11.49 13	6.88 7.23
	Carga tumoral promedio (cm ³)	0	7.8	9.45	7.58	12.24	7.05

Tabla 2. Cuadro comparativo de experimento 3 donde se muestra el número de ratones utilizados, el número de tumores localizados y el volumen tumoral para cada grupo experimental.

ADMINISTRACIÓN DE IL-2 LIBRE Y ENCAPSULADA EN RATONES CON MELANOMA INDUCIDO

De manera general observamos que el volumen de las masas tumorales, obtenidas en el experimento III, fue mucho mayor que en los experimentos I y II. En este último experimento, excepto el grupo ambiental, en todos los demás grupos se localizaron masas tumorales. Los resultados muestran para los miembros del grupo de ratones ambiental, ratones a los que no se inocularon células de melanoma ni se les administró tratamiento, que los órganos presentan características normales (Figura 10).



Figura 10. Características de ratones del grupo ambiental (no inoculados y sin tratamiento de IL-2.) La disección de la cavidad abdominal muestra órganos normales.

Grupo Control

En el grupo experimental control positivo a tumor (inoculadas con B16F0), se obtuvieron masas tumorales cerca de la pata derecha con un volumen de 7.42 cm³ y de 8.18 cm³ para cada ratón, con un promedio de 7.8 cm³. Un dato a destacar es que un ratón presentó hemorragia interna debido a que el tumor se reventó internamente. La pata derecha se incluía en el tumor, además se observó el hígado y bazo atrofiados y el útero muy irrigado (Figura 11).

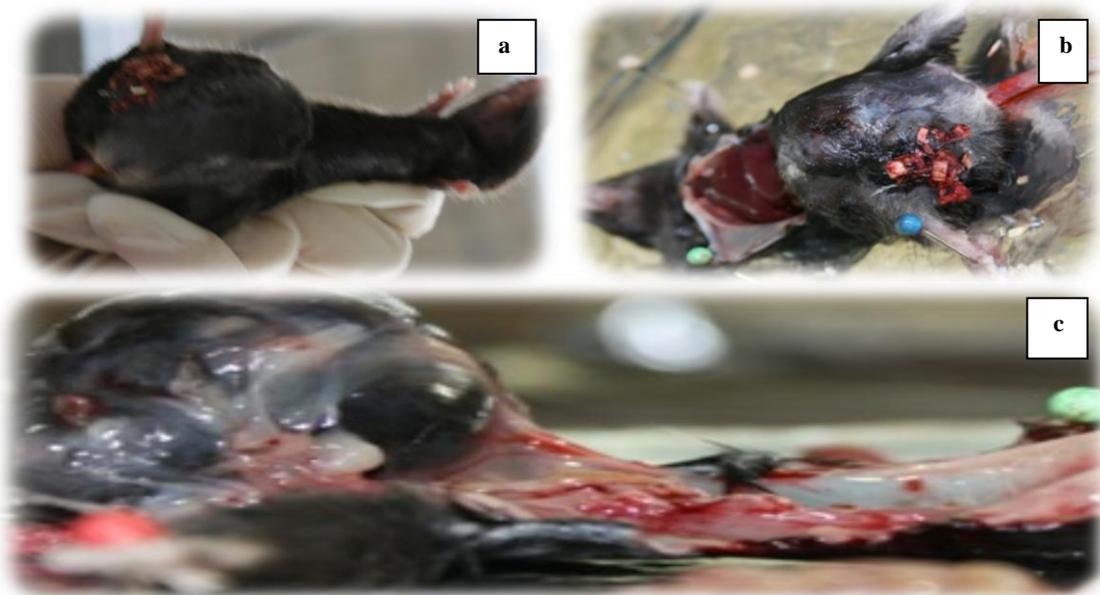


Figura 11. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 del grupo control positivo. Cabe destacar el crecimiento atípico de las masas tumorales: a) Vista de la masa tumoral desde la parte exterior del ratón; b) Crecimiento tumoral con un ligero sangrado; c) Acercamiento del crecimiento tumoral.

Administración de 10 UI/ml de IL-2 libre o encapsulada en ratones con melanoma inducido

Los ratones del grupo que recibieron 10 UI/ml de IL-2 presentaron la mayor masa tumoral, mostrando un mayor efecto cuando la IL-2 se administró encapsulada.

Ratones tratados con IL-2 a 10 UI/ml libre

Los ratones de este grupo presentaron un volumen en masa tumoral de 7.42 y 11.49 cm³ para cada ratón, con un promedio de 9.45 cm³. Los tumores fueron ubicados en el costado derecho del vientre. Uno de los ratones presentó piel muy delgada en el área donde se encontraba el tumor, además se observó el útero invadido por el tumor irrigado a vasos sanguíneos. También se observó un color rojo muy intenso en el hígado.

El segundo ratón presentó los órganos internos desplazados por el tumor, principalmente el útero debido al gran volumen de la masa tumoral. Además se observó un pelaje parduzco y opaco (Figura 12).

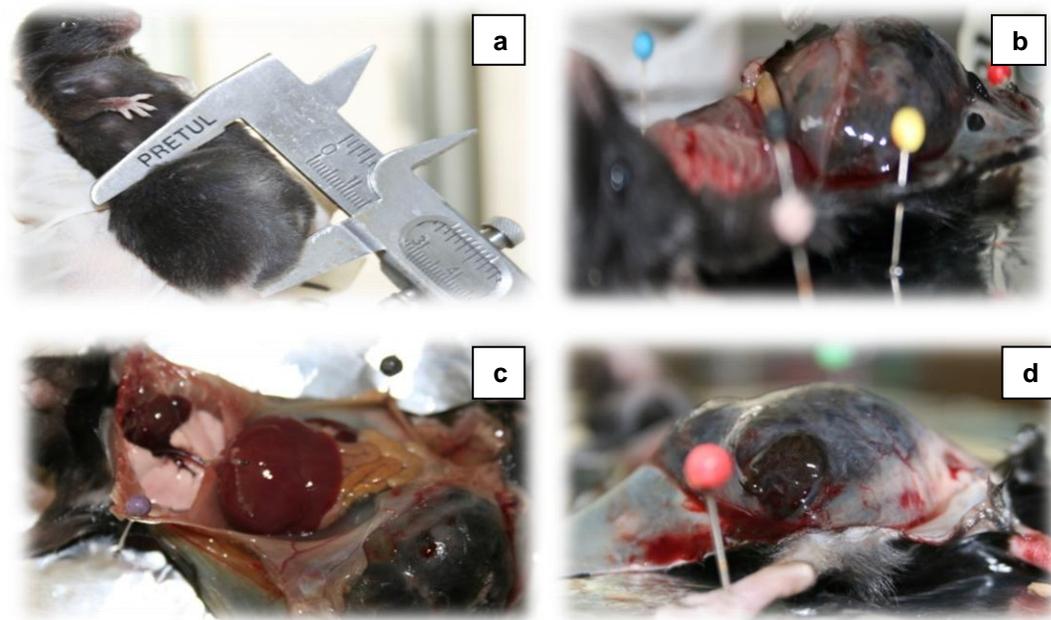


Figura 12. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 en el grupo con tratamiento de 10 UI/ml de IL-2 libre. Medidas de las masas tumorales localizadas: a) Ubicación de la masas tumoral antes de la disección; b) Disección de la cavidad abdominal donde se observa una masa tumoral de 11.49 cm³ de color negro; c) Hígado muy grande; d) Masa tumoral localizada en la pata derecha.

Ratones tratados con IL-2 a 10 UI/ml encapsulada

Este grupo presentó el mayor volumen tumoral con 11.49 y 13 cm³ para cada ratón con un promedio de 12.24 cm³. Los tumores fueron localizados cerca de la pata derecha (Figura 13). Uno de los ratones presentó un pelaje pardo y opaco, además se observaron pequeños puntos negros en casi una cuarta parte del pulmón. Este animal se encontró bajo de peso.

El segundo ratón de este grupo presentó piel muy delgada, también se observó el intestino muy grasoso y un bazo muy grande y de color obscuro.

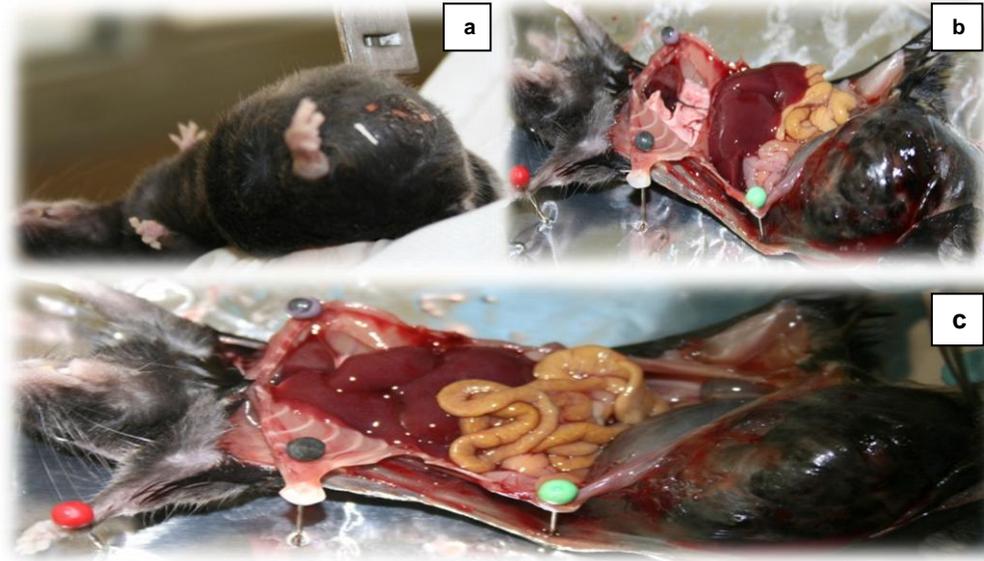


Figura 13. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 en el grupo de ratones con tratamiento de 10 UI/ml de IL-2 encapsulada: a) Medida de la masa tumoral; b) Disección de la cavidad abdominal donde se observa una masa tumoral localizada en la pata derecha; c) Se observan los intestinos de tamaño normal y masa tumoral muy grasosa.

ADMINISTRACIÓN DE 100 UI/ML DE IL-2 LIBRE Y ENCAPSULADA EN RATONES CON MELANOMA INDUCIDO

Ratones tratados con IL-2 a 100 UI/ml libre

Estos ratones presentaron masas tumorales de 6.8 y 8.37 cm³ para cada ratón con un promedio de 7.58 cm³. Los tumores fueron localizados cerca de la pata derecha. Uno de los ratones presentó poca grasa y piel delgada, además se observó un hígado muy grande, presentó el intestino muy inflamado y la masa tumoral muy irrigada, el hueso de la pata derecha quedó completamente incluido en el tumor.

El otro ratón también presentó inflamación en la pata derecha, un hígado muy grande, piel delgada principalmente en el área del tumor, intestino muy grasoso y el útero invadido por el tumor. Todos los órganos de la parte baja del abdomen fueron desplazados hacia el lado izquierdo debido a la masa tumoral de gran tamaño.

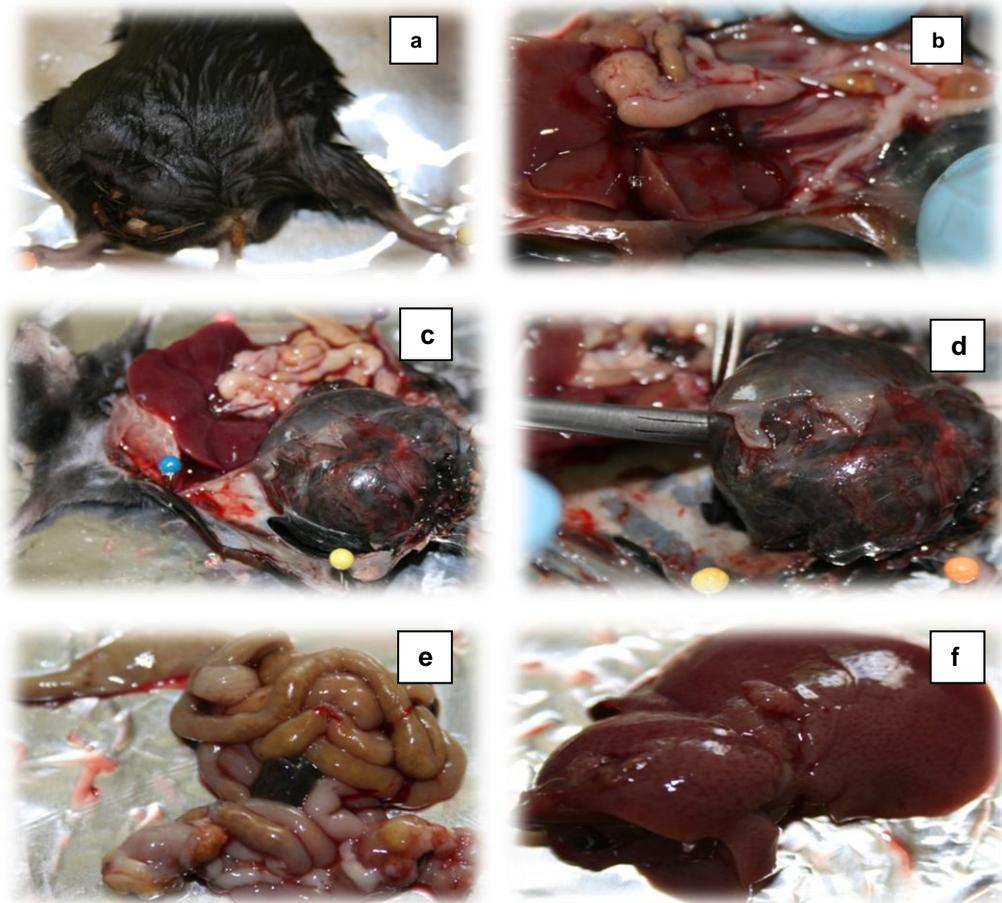


Figura 14. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 en el grupo de ratones con tratamiento de 100 UI/ml de IL-2 libre. a) Pata derecha del ratón inflamada; b) Disección de la cavidad abdominal; c) Acercamiento masa tumoral; d) Aislamiento de la masa tumoral para medición; e) Intestino grueso muy inflamado; f) Hígado muy grande.

Ratones tratados con IL-2 a 100 UI/ml encapsulada

Estos ratones presentaron masas tumorales de 6.88 y 7.23 cm³ para cada ratón con un promedio de 7.05 cm³. Los tumores fueron localizados cerca de la pata derecha. Estos ratones presentaron mucha grasa en la zona abdominal, así como útero en estado normal y órganos con coloración pálida.



Figura 15. Masas tumorales inducidas en ratones Black C57 del grupo de ratones con tratamiento de 100 UI/ml de IL-2 encapsulada. a) Masa tumoral localizada en pata derecha del ratón; b) Masa tumoral.

Para obtener el volumen tumoral de los ratones tratados con diferentes concentraciones de IL-2 se sacrificaron los ratones después del quinto día de tratamiento y las masas tumorales obtenidas se midieron para realizar el cálculo del volumen tumoral.

El efecto biológico de IL-2 en el crecimiento y disminución de las masas tumorales fue más visible en los crecimientos tumorales de mayor tamaño, por lo que los datos más representativos fueron del experimento III, los cuales se tomaron como referencia para evaluar el volumen tumoral así como el porcentaje de aumento y disminución de las masas tumorales en cada grupo experimental.

Con el propósito de comparar el efecto de IL-2 sobre las masas tumorales se graficaron los datos reportados para cada grupo experimental, en el cual se puede observar una disminución del volumen tumoral, cuando se administró la citocina a 100 UI/ml, siendo mayor el efecto en forma encapsulada. Para los grupos que recibieron tratamiento con 10 UI/ml se observa el efecto contrario, es decir, se incrementó el volumen tumoral, siendo mayor el efecto cuando la citocina se administró en forma encapsulada (Figura 16).

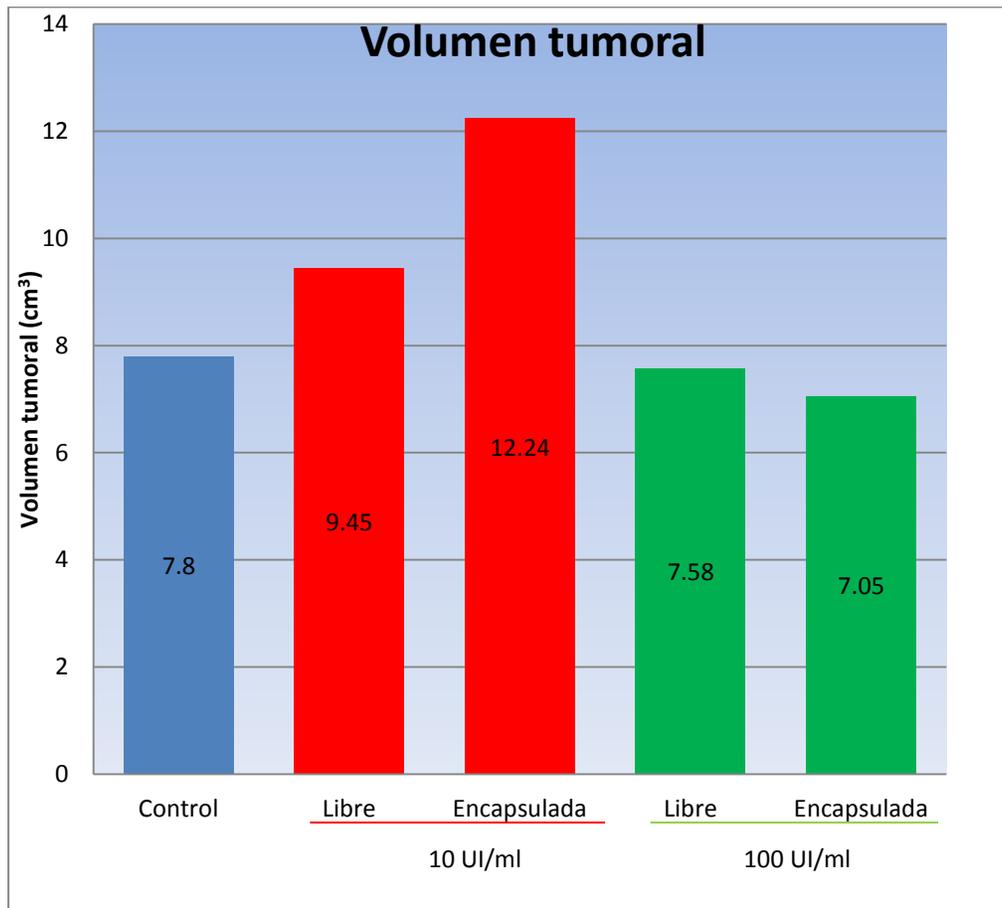


Figura 16. Volumen tumoral de los ratones con tratamiento de IL-2 en forma libre y encapsulada en concentraciones de 10 y 100 UI/ml respectivamente.

Con el propósito de tener una mejor apreciación del volumen tumoral para cada condición grupo de ratones se obtuvo el porcentaje de volumen tumoral.

En general se observa una disminución del volumen tumoral cuando los ratones fueron tratados con 100 UI /ml de IL-2, siendo mayor el efecto cuando la citocina se administró encapsulada. En particular observamos que con 100 UI/ml de IL-2 libre tenemos una reducción del 2.57% del volumen tumoral, sin embargo con la IL-2 encapsulada la reducción es del 9.62%. En el caso de la administración de 10 UI/ml de IL-2 observamos un aumento del volumen tumoral siendo más evidente en los ratones que recibieron 10 UI/ml de IL-2 encapsulada. De manera particular se observa un aumento del 21.15% en el volumen tumoral con 10 UI/ml de IL-2 libre, mientras que para la misma concentración de ésta citocina encapsulada en liposomas el obtuvimos un significativo aumento de hasta 56.92% (Cuadro 3).

Volumen tumoral y porcentaje

Tratamiento	Volumen tumoral (cm ³)	% de Volumen tumoral
Control	7.8	100
IL-2 a 10 UI/ml libre	9.45	121.15
IL-2 a 10 UI/mL encapsulada	12.24	156.92
IL-2 a 100 UI/mL libre	7.6	97.43
IL-2 a 100 UI/mL encapsulada	7.05	90.38

Tabla 3. Volumen tumoral y porcentaje

Con el propósito de destacar tanto el aumento del porcentaje del volumen tumoral, cuando las células fueron cultivadas en presencia de 10 UI/ml de IL-2, como su disminución al ser cultivadas en presencia de 100 UI/ml, se elabora una tabla en la cual se incluyen estos datos. Destacando el 57% de aumento del volumen con 10 UI/ml. Cabe mencionar que la disminución no fue tan marcada (Cuadro 4).

Porcentaje en Aumento y Disminución de Volumen Tumoral

Tratamiento	% en Aumento de Volumen Tumoral	% en Disminución de Volumen Tumoral
Control	-	-
IL-2 a 10 UI/ml libre	21.15	
IL-2 a 10 UI/ml encapsulada	56.92	
IL-2 a 100 UI/ml libre		2.57
IL-2 a 100 UI/ml encapsulada		9.62

Tabla 4. Porcentaje en aumento y disminución de volumen tumoral.

Ensayo de sobrevivencia de ratones pos-tratamiento

Con la intención de establecer el tiempo de sobrevivencia de los ratones después de que han recibido tratamiento con 10 y 100 UI/ml de IL-2 libre. En dos de los experimentos se incluyeron 5 ratones que además de recibir la inoculación de células tumorales, después de 20 días se les administró 5 días con IL-2. Dichos ratones se conservaron vivos hasta por 8 meses, post-tratamiento. Los ratones se mantuvieron en el bioterio bajo condiciones ambientales de esterilidad, periodos de día y noche controlados y libre demanda de alimento y agua.

Transcurridos los 6 meses, post-tratamiento, para los ratones del experimento I, se sacrificó a los ratones para evaluar su condición general y el efecto después de estos meses. En el ratón control todos los órganos se encontraron en condiciones normales.

Se sacrificaron dos ratones que fueron tratados con 10 UI/ml, en ambos se observó exceso de grasa en el abdomen y alopecia en algunas partes del cuerpo.

En el ratón tratado con 100 UI/ml se observaron órganos en estado normal. En ninguno de los ratones se encontraron masas tumorales.

Para el caso del experimento II, se aumentó el tiempo de evaluación del efecto post-tratamiento de IL-2 hasta los 8 meses. Al finalizar este tiempo los ratones fueron sacrificados y analizados. Las observaciones mostraron que el ratón control se encontraba en estado normal y que los ratones tratados con 10 UI/ml, los órganos también mostraron condiciones normales con presencia de mucha grasa en abdomen, pelaje normal y útero muy grueso en uno de ellos.

En el ratón tratado con 100 UI/ml de IL-2 se encontraron los órganos en estado normal. Es necesario destacar que al igual que en los ratones del experimento I en ninguno de los cuatro ratones sacrificados se encontraron masas tumorales. En resumen los ratones de la evaluación de sobrevivencia post-tratamiento no presentaron masas tumorales ni daños significativos en sus órganos como efecto del tratamiento con IL-2 después de 8 meses de sobrevivencia (Figura 17).

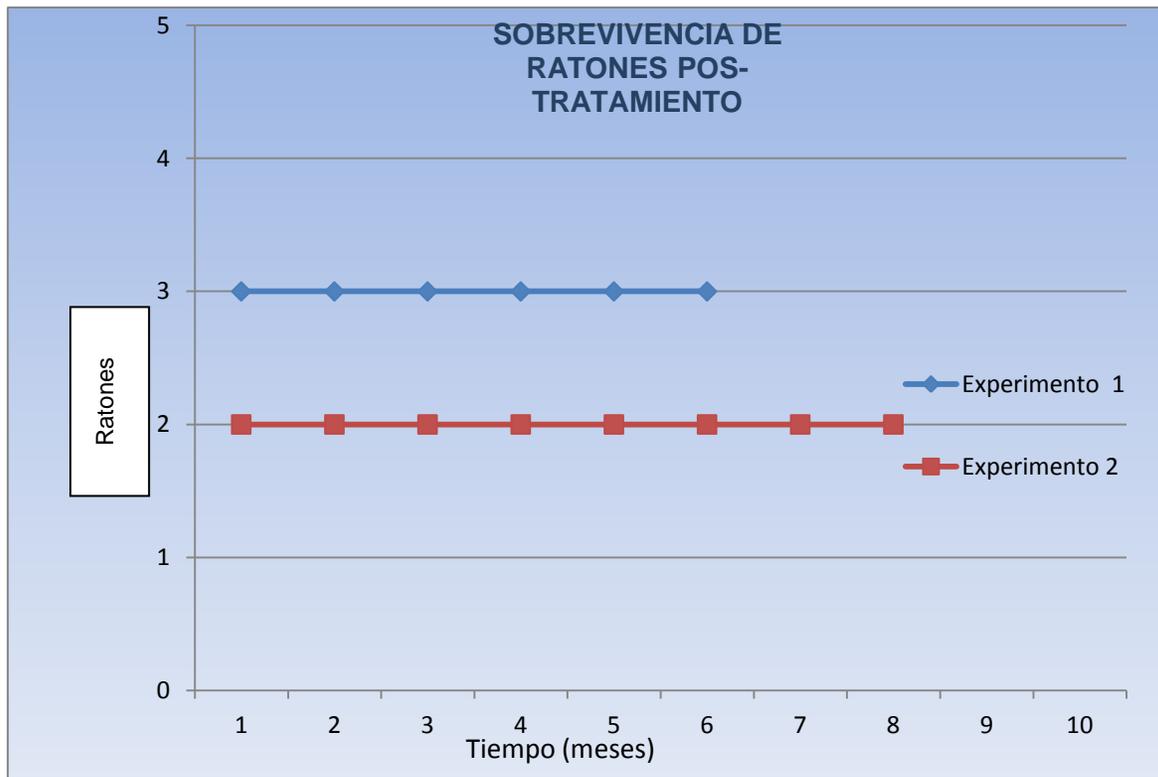


Figura 17. Sobrevivencia de los ratones tratados con IL-2 y control de los experimentos I y II después de varios meses pos-tratamiento.

DISCUSIÓN

Se sabe que interleucina 2 (IL-2) es producida por un subtipo de linfocitos T auxiliares denominados Th1 y en menor cantidad por linfocitos T citotóxicos, esta citocina ha cobrado gran interés ya que se usa como una alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cánceres (Hernández J. *et al* 2005). Pruebas clínicas han demostrado que la administración *in vivo* de células activadas para matar, (LAK; del inglés lymphokine activated Killer cells) acompañadas de la administración de IL-2 vía sistémica producen regresión de masas tumorales en pacientes con cáncer renal y melanoma en fase terminal observándose remisión completa y duradera en 3% de los pacientes (Rangel C. *et al* 1999).

Este trabajo se basó en investigaciones previas del Laboratorio de Oncología Celular, en las cuales se demuestra que las células de Carcinoma Cérvico Uterino (CaCU) expresan el receptor para IL-2, el cual está conformado por las 3 subunidades polipeptídicas que tienen una alta afinidad por la IL-2 al igual que los linfocitos T. También, hemos informado que concentraciones de 10 UI/ml de IL-2, favorecen la proliferación de las células de la línea de CaCU INBL y que concentraciones de 100 UI/ml de IL-2 detienen su proliferación a diferencia de lo que sucede con leucocitos de sangre periférica en donde una concentración de 100 UI/ml promueven la proliferación y diferenciación de linfocitos T, que se sabe ejercen un efecto citotóxico sobre células tumorales *in vitro*.

Sin embargo, aunque la IL-2 es muy útil en inmunoterapias; su aplicación, ha reportado un uso limitado cuando se utilizan dosis altas, pues genera alteraciones fisiológicas que causan efectos secundarios que suelen ser muy adversos, tales como: a) perturbación en vías de regulación hematopoyética, b) síndrome de goteo-capilar, c) fiebre, d) dolores de cabeza, e) edema, f) oliguria e g) hipotensión que la hacen tener un empleo restringido. Por esta razón, actualmente se buscan nuevas vías de administración de esta citocina para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Al respecto en el Laboratorio de Oncología Celular, nuestro grupo de trabajo ha utilizado IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos como tratamiento de ratones con tumores inducidos de CaCU, obteniendo hasta un 80% de reducción de las masas tumorales, detectando, al mismo tiempo, una disminución de los efectos secundarios de IL-2.

Estos resultados nos hacen pensar que el uso de IL-2 encapsulada puede ser una vía de administración adecuada de la citocina para pacientes con cáncer (Ayala A. *et al* 2005). Para ello es necesario confirmar el efecto de IL-2 encapsulada en

otro modelo de tumor como el melanoma, que se sabe, puede ser eliminado eficientemente al estimular el sistema inmunológico (Thejass P., Kuttan G., 2007).

Para ello en este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* e *in vivo* de IL-2 sobre la proliferación de células B16F0. Un experimento previo, en el que se adicionaron 10 UI/ml de IL-2, *in vitro*, a células de melanoma, muestra un incremento de la masa tumoral tal y como se ha reportado para CaCU. Los resultados *in vitro* del presente trabajo experimental confirman que 10 UI/ml de IL-2 induce la proliferación de células de la línea celular B16F0 de melanoma, mientras que, a la concentración de 100 UI/ml, se observó un efecto inhibitor. El efecto diferencial de IL-2 sobre la proliferación de las células de melanoma es muy semejante al ya reportados para las líneas de CaCU CALO e INBL, sugiriendo que aquellos tumores que expresen el receptor para IL-2 (RIL-2) pueden ser inducidos a proliferar en presencia de bajas dosis de IL-2.

Por otra parte, ya que el efecto *in vitro* de IL-2 en células de melanoma es muy semejante al ya reportado para CaCU, esperaríamos que en un experimento *in vivo* se observe un efecto similar, sobre la reducción de masas tumorales de melanoma, al ya reportado para CaCU. Es decir, que los datos *in vitro*, permitirían predecir el posible efecto de IL-2 en diferentes sistemas celulares en un modelo *in vivo de tumores que expresen IL-2R*. Y de esta manera predecir su respuesta ante la administración de IL-2 y al mismo tiempo determinar la dosis de IL-2 más adecuada para regular la proliferación de las células neoplásicas e inducir, al mismo tiempo, una respuesta inmunológica de rechazo tumoral. La aplicación de estos resultados nos permitiría desarrollar una estrategia inmunoterapéutica donde se aproveche el efecto dual de IL2.

Los resultados, *in vitro*, muestran una disminución del crecimiento de las células de melanoma cuando son cultivadas en presencia de 100 UI/ml de IL-2, sin embargo, no es de la misma magnitud que la reportada para CaCU. No obstante, el porcentaje de aumento en la proliferación *in vitro* en presencia de 10 UI/ml de IL-2 es semejante al reportado en CaCU. En base a las evidencias arriba mencionadas proponemos la hipótesis de que las células tumorales que expresen el IL-2R tienen la misma respuesta dosis dependiente a IL-2.

Estos resultados sugieren que antes de administrar una terapia antitumoral a base de IL-2 es necesario evaluar la presencia del receptor para esta citocina en las células tumorales a ser tratadas. Si se confirma la presencia del receptor para IL-2 como en CaCU y melanoma, es conveniente demostrar *in vitro*, la dependencia de las células tumorales por IL-2. Por esta razón, se debe evaluar

previamente el efecto de IL-2 *in vitro* en las células tumorales antes de pensar en la administración de IL-2 como alternativa terapéutica, esto en base al efecto dual que presenta IL-2 en células de melanoma y CaCU.

Por otro lado, el modelo *in vivo* de inducción y tratamiento de melanoma también es útil para confirmar los resultados del modelo *in vitro* y al mismo tiempo confirma que su uso es recomendado para evaluar el efecto de agentes antineoplásicos.

Al respecto se sabe que el 80% de los modelos experimentales, *in vivo*, utilizan ratones para evaluar el efecto de agentes antineoplásicos, dirigidos a los humanos, debido a que poseen grandes ventajas como son un ciclo de vida corto, una gran capacidad de reproducción y adaptación, su fácil manejo y los amplios conocimientos que se tienen acerca de su fisiología y anatomía. Además, en algunas cepas desarrollan tumores espontáneamente (Vagge *et al.*, 1994) o inducidos por la inyección de células tumorales, o por la administración de alguna droga cancerígena (Gillies *et al.*, 1998; Colchlovius *et al.*, 1999) o implantados subcutáneamente a partir de cultivos semisólidos o biopsias (Lo Russo *et al.*, 1990; Dubinet *et al.*, 1993). Por esta razón los resultados obtenidos de un modelo *in vivo* es muy importante para poder sugerir un posible uso terapéutico.

Al respecto en este trabajo se utilizó la cepa Black C57 como modelo experimental autólogo, induciendo tumores vía intraperitoneal con la línea celular B16F0 de melanoma. Una vez inducidos los tumores de B16F0 en la cepa Black C57, la siguiente fase fue evaluar *in vivo*, si IL-2, conserva el efecto antitumoral observado en los ensayos *in vitro*, evaluando su aplicación en forma libre y encapsulada. En los experimentos I y II *in vivo* no se observa la presencia de tumores en los ratones a los que se administró 100 UI/ml de IL-2, lo mismo ocurrió en los ratones del control positivo, esto lo atribuimos al hecho de que los ratones utilizados en este experimento sólo tenían 3 semanas de edad y quizá su sistema inmunológico todavía se encuentra en maduración y por tanto elimina eficientemente las células tumorales inoculadas. Sin embargo, en el caso en que los ratones recibieron 10 UI/ml de IL-2 el número de tumores inducidos por la inoculación de células B16F0 fue muy evidente además de localizarse en diferentes órganos del ratón. Este hecho es muy relevante, ya que mostramos que 10 UI/ml de IL-2 es suficiente para que las células inoculadas promuevan la formación de tumores hasta del 15% en promedio. Es decir que una pequeña cantidad de citocina puede sustentar la proliferación de las células de melanoma como un mecanismo de evasión del sistema inmunológico del ratón.

En el caso del modelo experimental III *in vivo*, en el que se utilizaron ratones de 24 semanas de edad se obtuvieron resultados muy diferentes a los de los experimentos I y II. En este caso se obtiene un control con crecimiento tumoral el cual se reduce en un 58% al administrar 100 UI/ml de IL-2. La inducción a la proliferación con 10UI/ml se mantiene. Y en su conjunto los datos obtenidos al utilizar ratones de mayor edad es muy semejante al reportado en CaCU. Además este modelo de ratón adulto proporciona datos de un efecto sobre la regulación de la proliferación de las células de melanoma muy similar al reportado *in vitro*.

Para los ratones tratados con 100 UI/ml se observó un efecto de inhibición, siendo que al administrar la citocina en forma libre se obtuvo una disminución de 2.57% y de hasta un 9.62% cuando se administró en forma encapsulada.

Los resultados hasta ahora proporcionados sobre el efecto de IL-2 sobre la proliferación de células de carcinoma de cérvix y melanoma pueden ser más generalizados de lo que se piensa, particularmente cuando las células tumorales expresen el receptor para IL-2.

Otra aportación importante es el hecho de que IL-2 encapsulada es más eficiente tanto para inhibir como inducir la proliferación de las células de la línea de melanoma B16F0. Y dado que en nuestro equipo de trabajo ha demostrado que IL-2 encapsulada además de reducir las masas de CaCU es capaz de disminuir los efectos secundarios que esta ocasiona. Pensamos que el uso de IL-2 encapsulada en liposomas catiónicos, sería una buena estrategia para este tipo de cáncer.

La diferencia en la respuesta a las diferentes concentraciones de IL-2 entre los experimentos realizados indican que los ratones que desarrollaron masas tumorales de mayor volumen como los utilizados en el experimento III se puede atribuir su edad ya que estos tenían entre 6 y 7 meses de edad a diferencia de los ratones utilizados en los experimentos I y II que tenían entre 3 y 4 semanas. Es evidente que el éxito para el establecimiento de crecimientos tumorales de tamaño considerable se presentará en ratones longevos a diferencia de los jóvenes por lo que para evaluar el efecto antitumoral de 100 UI/ml de IL-2 será necesario utilizar ratones de 6 meses en los que el sistema inmunológico se vea mermada por no tener "estímulo" (gama de antígenos) que le permitió fortalecer su defensa inmunológica tal y como sucede en los ratones de 3 semanas.

La contribución más relevante de este trabajo es el proporcionar información sobre el efecto de 10 UI/ml de IL-2 sobre los tumores que expresen el receptor para IL-2, ya que los datos proporcionados en el modelo de melanoma, motivo de este estudio, y en el modelo de CaCU reportado previamente, muestran que esta concentración de citocina induce un crecimiento tumoral considerable desde 56%

en melanoma y hasta el 100% en CaCu, esto quiere decir que es necesario establecer un método diagnóstico de la presencia del RIL-2 en células tumorales antes de pensar en la administración de IL-2 como agente antitumoral ya que se corre el riesgo de tener un efecto contrario al esperado, es decir promover el crecimiento tumoral en vez de eliminar la masa tumoral o activar el sistema inmunológico.

Finalmente mencionaré que otra de las contribuciones de mi trabajo fue determinar el tiempo de sobrevida de los ratones sin mostrar re-aparición de crecimiento tumoral, post-tratamiento, así como evaluar el estado general de los mismos. El tiempo evaluado de sobrevida post-tratamiento con 100UI/ml por 5 días consecutivos, fue de hasta 8 meses, lo cual es un dato de gran relevancia ya que muestra que IL-2 eliminó eficientemente las células de melanoma que se introdujeron en los ratones. Estos datos sugieren que el período de sobrevida puede prolongarse, por lo cual recomiendo se evalúe sobrevivencia post-tratamiento a 12 meses. Esto con el propósito de establecer el tiempo real de acción antitumoral de IL-2 sin presencia de crecimiento tumoral y sin efectos secundarios en los ratones. Los datos mostrados en este trabajo nos permiten pensar en utilizar IL-2 como una alternativa terapéutica para el melanoma.

CONCLUSIONES

-IL-2 tiene un efecto proliferador cuando es administrada a 10 UI/ml, siendo más eficiente cuando se encapsula.

-Cuando IL-2 se administra a 100 UI/ml se observa un efecto de menor proliferación.

-La sobrevivencia de los ratones que se mantuvieron pos-tratamiento refleja que IL-2 permite ser utilizada sin tener efectos significativos como efecto del tratamiento.

PERSPECTIVAS

Aplicación de la investigación

La transferencia de un hallazgo obtenido en un modelo experimental en el laboratorio a un posible tratamiento en humanos es un gran paso, en el que hay que considerar aspectos éticos muy importantes y es un proceso largo que requiere considerar dosis, vías de administración, tolerancia al compuesto, toxicidad inmediata y a largo plazo, genotoxicidad, aspectos farmacológicos como la farmacocinética del compuesto, diseño de un protocolo de estudio clínico experimental y la interacción con una empresa farmacéutica interesada en el producto, así como mecanismos de transferencia.

-Se debe investigar la vía de administración en humanos, ya que en el modelo experimental se usaba la vía intraperitoneal que no sería recomendable en humanos.

-Probar si la vía propuesta asegura la presencia del compuesto en el órgano blanco.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A., Lichtman A. (2004). Inmunología Celular y Molecular. Elsevier.México. pp: 563.

Aguzzi A., Heikenwalder M., Prions, (2005) Cytokines, and Chemokines: a meeting in lymphoid organs. Immunity. pp: 145-54.

Arenas Roberto. (2005). Atlas Dermatología “Diagnostico y Tratamiento”. Tercera Edición. Mac Graw Hill. México. pp: 600-604.

Balch CM, Soong S, Ross MI, et al.: (2000). Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Intergroup Melanoma Surgical Trial. Ann Surg Oncol pp: 87-97. [\[PUBMED Abstract\]](#)

Báscones A. y González M. (2003). Mecanismos Inmunológicos de las enfermedades periodontales y perimplantarias. Avances en Periodoncia. pp:121-138.

Corona R, Mele A, Amini M, et al.(1996): Interobserver variability on the histopathologic diagnosis of cutaneous melanoma and other pigmented skin lesions. J Clin Oncol.. [\[PUBMED Abstract\]](#)

Escamilla B. Evelin. (2007). Determinación por RT-PCR de la regulación de IL-4, IL-10, IFN-gamma y TNF-alfa en células de bazo de ratones con melanoma, tratados con IL-2 encapsulada [Tesis de Licenciatura]. México, D.F: FES Zaragoza, UNAM.

Ferrandiz Foraster. (1996). Dermatología Clínica. Segunda Edición. El Sevier Science. México. pp: 361-364.

Good Roberto y Wesley Alexander. (1990). Principios De Inmunología Clínica. Reverte. México. pp: 247-257.

Jiménez Arnau (1995).Interleucina 10, supresor natural de la respuesta inflamatoria cutánea. Actualidad Dermatológica. pp: 397-407.

Jiménez Arnau.(1995).Melanoma Maligno: marcadores de metástasis circulantes. Actualidad Dermatológica. pp: 149-159.

Kelland L.R. (2003): Values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. European J. of cancer.

Magaña M., Cazarín J., Pérez R. (2003). Dermatología. Primera Edición. Medica Panamericana. México. pp: 314-320.

Moreno Koch.(2004). Melanoma. Oncología.pp: 1-4.

Orkin M. Maibach H. y Dahl M. (1994).Dermatologia. Primera Edición. Manual Moderno. México. pp :639-641.

Pinar S., Sáez B., Clavo V. y Lara J. (2004).Tumores Cutáneos Malignos. Biocancer. 2004.pp: 1-14.

Puig Lluís.(1997). Oncogenes y Genes Supresores Tumorales En El Melanoma Maligno Cutáneo. Actualidad Dermatológica. pp: 705-713.

Rangel-Corona R, Corona Ortega T, Ortiz I, Ramírez M, Bañuelos H, Tenorio O et al.(2010). Cationic liposomes bearing IL-2 on their external surface induced mice leucocytes to kill human cervical cancer cells *in vitro* and significantly reduced tumor burden immunodepressed mice. J, of drug targeting. pp: 1-7.

Rangel-Corona R, Corona Ortega T, Soto-Cruz I, Arcos T, Torres-Guarneros, Weiss Steider B, et al.(2010). Evidence that cervical cancer secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. J. of the International Cytokine Society. pp: 273-277.

Regueiro G.R., López L.C., Martínez N.E., González R.S. (2002). Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune. 3ra. Edición. Panamericana. México. pp: 1-4.

Roitt I, Brostoff J., Male D. (2000). Inmunología. Elsevier. México. pp: 423.

Roldan Pérez. (2006). Caracterización de liposomas aniónicos y neutros por resonancia magnética nuclear P. Facultad de estudios superiores Zaragoza.

Rojas Espinosa Oscar. (1996). Inmunología. Primera edición. Panamericana. México. pp:228.

Rosas S., Baca T., Muñoz F. y Muñoz G.(2003).Estudio Clínico, Epidemiológico e Histopatológico De Melanoma Maligno. CIMEL. pp: 23-27.

Ross M., Kaye J., Pawlina W. (2005). Histología Texto Y Atlas A Color Con Biología Celular Y Molecular. Panamericana. México. pp: 864.

Slingluff CI Jr, Flaherty K, Rosenberg SA, et al.(2011).Cutaneous melanoma. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA: Cancer: Principles and Practice of Oncology. 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, pp 1643-91.

Suites Daniel. (1991). Inmunología Humana y Básica. Primera Edición. El Manual Moderno. México. pp: 418.

Torrilla A. y Noris G. Inmunoterapia En Melanoma. Oncología. 2004: pp: 102-107.

Ülger AF., Sen E., Ereku S. y Gönüllü O.(2005). Melanoma pulmonar maligno. Notas Clinicas.pp:102-104

Valle Mendiola A. y Weiss Steider B. (2003).Origen Molecular Del Cáncer. Vertientes.pp: 3-8

Walsh G. (2003).Biopharmaceuticals Biochemistry and Biotechnology. 2nd Ed.Great Britain: Wiley.

GLOSARIO

Nevo. La palabra **nevus** o **nevo** (del latín *naevus*, lunar) alude a una proliferación de distintos tipos de células en la piel. Así, puede haber nevus sebáceos, apocrinos (de las glándulas apócrinas de la piel), etcétera. Los más característicos son los nevus melanocíticos, que son proliferaciones de células pigmentadas llamadas "células névicas".

Melanocito. Célula responsable de fabricar la melanina, el pigmento que da el color moreno a la piel.

Arciforme. En forma de arco

Pápula. Una pápula es un tipo de lesión en piel, menor de 1 cm. de diámetro, circunscrita, elevada, de bordes bien definidos, de contenido sólido.

ANEXO

Solución Fisiológica de Verseno

DEMEN 10% SFB

H₂O Bidestilada

PBS

Liposomas catiónicos

Azul tripano

Desactivación del suero fetal bovino

Se toma una botella de suero fetal bovino (Gibco. U.S.A) y se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para que éste quede en estado líquido, posteriormente se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular en el suero y que interfieren al inhibir la proliferación celular en los cultivos. En seguida es transvasado en frascos más pequeños para su mejor manejo.

Solución fisiológica de Verseno

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

- Tris base 3.04 gramos
- 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 de fosfatos (PBS)

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

- Cloruro de sodio 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.

Suero fetal bovino (SFB)

La botella de suero fetal bovino (SFB) se descongela a temperatura ambiente.

Liposomas catiónicos

Fosfatidilcolina (PC) y Espermidin- Colesterol (ESP-CHol). (Roldan P. 2006).

Azul tripano

Se emplea para pruebas de viabilidad y conreo celular, se realiza una dilución del colorante azul tripano (Sigma, Chem, USA) al 0.3 % en PBS y se filtra con papel Whatman #2.