

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



**FAGOCITOSIS DE CELULAS TUMORALES L5178Y
POR MACROFAGOS ALVEOLARES DE RATONES
BALB/C INMUNIZADOS CON YODURO DE
POTASIO, UREA Y VITAMINA E**

T E S I S
QUE PARA OPTAR EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
LEONOR DIAZ MORA

CIUDAD UNIVERSITARIA

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.1 I N T R O D U C C I O N

I.1 ANTECEDENTES INMUNOLOGICOS DE LA NEOPLASIA

I.2 ANTECEDENTES DEL LINFOMA L5178Y

I.3 ANTECEDENTES DE LAS SUBSTANCIAS EMPLEADAS PARA MODIFICAR LOS ANTIGENOS DE LAS CELULAS L5178Y
HIPOTESIS

II. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

II.1 RATONES

II.2 OBTENCION DE LAS CELULAS L5178Y DE LOS DONADORES Y
TRASPLANTE

II.3 MODIFICACION DE LA ANTIGENICIDAD DE LAS CELULAS TUMORALES CON DIVERSOS REACTIVOS

II.4 PROCEDIMIENTO DE INMUNIZACION

II.5 PRUEBA DE FAGOCITOSIS

II.6 ELABORACION DE PREPARACIONES

II.7 PRUEBA IN VITRO PARA DETERMINAR EL INDICE FAGOCITARIO

II.8 EVALUACION DEL INDICE FAGOCITARIO

III. R E S U L T A D O S

III.1 DESCRIPCION DEL EXPERIMENTO

III.2 PRUEBA ESTADISTICA DE DIFERENCIA DE PROPORCIONES

III.3 POR QUE SE ESCOGIO LA PRUEBA ESTADISTICA DE DIFERENCIA DE PROPORCIONES

IV. D I S C U S I O N

V. R E S U M E N

VI. B I B L I O G R A F I A

A P E N D I C E

I INTRODUCCION

Por muchos años, los investigadores han buscado la posibilidad de que, las células neoplásicas sean susceptibles a la acción inmune. Al presente, se realizan amplias investigaciones en inmunología de cáncer con la esperanza de que, al aumentar el conocimiento sobre éste campo, se descubrirán nuevos aspectos que serán útiles al tratamiento del cáncer¹.

Las enfermedades neoplásicas o tumorales, ocupan el sexto lugar como causa de mortalidad en México² (1975); dentro de éstas, ocupan un lugar muy alto las leucemias y las neoplasias³.

Los tratamientos quirúrgicos y de radioterapia tan útiles para el tratamiento del cáncer, son limitados en su eficiencia.

Los conceptos sobre antigenicidad asociada al tumor y capacidad del organismo para llevar a cabo una respuesta inmune efectiva, son fundamentales en la "teoría de la vigilancia inmunológica" según la cual, en el individuo surgen constantemente células neoplásicas pero, como son consideradas "extrañas", se eliminan por el sistema inmune.

Según la hipótesis de Burnett⁴ postulada en 1967, para que el sistema inmune sea capaz de eliminar cualquier célula maligna que pueda surgir, es necesario que éste intacto. La hipótesis se encuentra fuertemente apoyada por los casos en que, los ancianos presentan inmunidad deficiente o inadecuada. Hay varias causas por las que el tumor puede desarrollarse debido a que, el sistema inmune es muy complejo y puede fallar en formas muy variadas teniendo como consecuencia

que, las células tumorales burlarán la vigilancia, apareciendo por ello el cáncer. Hamilton⁵, menciona varias causas que pueden explicar ésta situación: 1) Si los tumores surgen en sitios anatómicamente protegidos, por ejemplo, cuando se implantan pedacitos de plástico, entre la piel y la dermis de los animales, se rodearán rápidamente en una capa de tejido conectivo constituido de todos sus componentes que, evitará que los antígenos del sarcoma que se forma en éste sitio estimule una respuesta efectiva oportuna por parte del huésped mismo que, surgirá cuando el tumor sea demasiado grande para ser afectado. 2) Si se desarrolla tolerancia al tumor durante el curso del crecimiento de un sarcoma inducido químicamente. En éstos casos, sólo después de que se extrajo el tumor, los infocitos del bazo serán citotóxicos a las células tumorales. 3) Si el crecimiento es muy rápido, alcanzará en breve tiempo un desarrollo tal que, no lo afecte ninguna respuesta inmune. 4) Si hay anticuerpos de facilitación. 5) Cuando hay actividad inmunosupresora.

Recientes Investigaciones han puesto de manifiesto la presencia de células supresoras que evitan la reacción inmunológica contra el tumor; sin embargo aún existen fuertes contradicciones de, si tales células supresoras son de la línea tímica (T) o las que equivalen a un camino periférico de diferenciación (referidas como células B) o bien, si son macrófagos. En algunos casos la transición normal final de las células B, requiere de la cooperación final de las células T y de macrófagos, ;de manera similar, bajo ciertas condiciones, las células B pueden ser inhibidas por células T supresoras y macrófagos. Asimismo, se discute que las células T supresoras pueden envolver al tumor enmascarándolo. Las células T supresoras pueden regular la producción de todas las clases de Inmunoglobulinas (Ig), una sólo clase de ellas, un sólo alotipo d un idiotipo de Ig. Las células supresoras pueden actuar en la vía aferente o eferente de la respuesta inmune⁶.

Recientes reportes, han puesto de manifiesto la presencia de células supresoras que no corresponden a las células T; en huespedes.⁶ Los investigadores que comparten ésta idea concluyen que las células supresoras son células B (Gorcynski)⁷, por un lado y por otro discuten que son macrófagos (Kirchner)⁸.

Los procedimientos de inmunoterapia, pretenden erradicar o limitar el crecimiento neoplásico mediante la introducción de la respuesta inmune necesaria cuando falla la respuesta inmune natural de rechazo contra éste crecimiento celular anormal.

Es interesante mencionar qué las células malignas se consideran extrañas por el sistema inmune y que poseen antígenos neoplasia específicos (ANE) que, en los tejidos normales no se presentan. Aprovechando ésta circunstancia, los tratamientos de inmunoterapia, aumentan la inmunogenicidad de los ANE mediante modificaciones químicas de su molécula, es decir; se pretende que, dichos antígenos sean "reconocibles" por el sistema inmune de manera que, tenga lugar una respuesta inmune por reacción cruzada de rechazo que, afecte a las células malignas intactas.

El objetivo de éste trabajo fué estudiar el índice fagocitario de células L5178Y in vitro por macrófagos alveolares de ratones inmunizados con células L5178Y modificadas con urea, con vitamina E y con yoduro de potasio.

I.1 ANTECEDENTES INMUNOLOGICOS DE LA NEOPLASIA:

Tratando de explicar el origen de las enfermedades neoplásicas, Conheim⁵, hace casi un siglo, supuso que, las células neoplásicas se originaban por la proliferación de células embrionarias que quedaron en reposo en los tejidos normales. La idea despertó gran interés entre los investigadores de su época porque establecía relación entre el desarrollo embrionario y la neoplasia.

A principios de siglo, Schöne⁵, informó que, los ratones inmunizados con antígenos fetales de la misma especie, adquirían la capacidad de rechazar trasplantes neoplásicos, mismos que, aplicados a ratones no inmunizados, resultaban letales.

Desde 1930, se han hecho investigaciones estableciendo que, en las células tumorales hay antígenos semejantes a los que se encuentran en las células embrionarias y fetales. En la investigación básica del cáncer resulta de gran valor el estudio de tales antígenos.

Foley⁹ y Prenh¹⁰, demostraron que, las células de los tumores trasplantables portan ANE en animales singénicos y que la inmunización contra ellos podía utilizarse para reducir el crecimiento tumoral inducido en forma experimental.

Los ANE fueron reconocidos posteriormente en neoplasias experimentales y humanas^{11,12}; las células fetales de hamster, según demostraron Coggin y asociados¹², poseen

el mismo antígeno que las células tumorales de la línea - SV⁴⁰.

Las células malignas presentan membrana y glicocálix portadoras de ANE^{9,13,14}. Constantemente las células neoplásicas liberan glicoproteínas y glicopéptidos a los líquidos extracelulares. Hay cierta similitud con las células fetales y embrionarias de dos a seis meses las cuales poseen también membrana y glicocálix que, igualmente liberan glicoproteínas con un determinante antigénico; éstos antígenos no se llaman ANE sino, antígenos carcinoembrionarios u oncofetales (ACE o AOF). Los ACE, al igual que los ANE, también pasan a los líquidos extracelulares 15, 16, 17. Los ANE, los ACE, y los AOF, son considerados antígenos tumorales.

En algunos casos, la expresión anormal de los genes es la causante de los cambios antigénicos en las células tumorales. La anormalidad ocurre al mismo tiempo que la transformación maligna y se acompaña de una regresión hacia el estado embrionario o fetal^{18,19}. De aquí que se considere a las células neoplásicas semejantes a las embrionarias o fetales, porque persisten en el organismo adulto durante todo el embarazo sin ser rechazadas.^{11,20,21}

Se ha observado que, la naturaleza química de los ANE, puede variar de un individuo a otro, lo que, es condicionado por el portador del tumor^{13,22}. Esto se ha observado cuando se emplea una misma sustancia carcinógena para inducir la aparición de neoplasias en varios animales de la misma cepa; el resultado es que, se originan tumores, cuyos ANE son diferentes en cada animal y, los anticuerpos contra éste antígeno casi no dan reacción cruzada entre ellos²³.

En cambio, si la neoplasia se induce por virus oncogénicos, las células tumorales si presentarán ANE comunes entre los diferentes animales portadores del tumor, existiendo una amplia reactividad cruzada de los anticuerpos ----

anti- ANE^{14,22,24}.

Cuando las neoplasias son espontáneas y no es posible determinar una etiología química o viral, también existe reacción cruzada^{22,24,25,5}.

La respuesta inmune, según estudios de casos clínicos de neoplasias ya establecidas, resulta ineficaz para llevar a cabo el rechazo del tumor; se ha demostrado la existencia de un mecanismo paradójico, el mecanismo de "facilitación inmunológica", mediado por anticuerpos y que facilita el crecimiento tumoral^{26,27} (figura 1).

La inmunoterapia de cáncer requiere que, el organismo abandone el estado de "facilitación inmunológica" y desarrolle una respuesta inmune de rechazo hacia el tumor. Para ello, se hace necesario conocer las relaciones inmunológicas que existen entre las células tumorales y el portador de la neoplasia (figura 2).

Los ANE, ACE o AOF, tienen la propiedad de inducir la formación de los anticuerpos de facilitación hacia ellos²¹ de forma que, se enmascaren los antígenos de histocompatibilidad normales^{28,29,30}. Tal fenómeno, favorece la supervivencia y transplantabilidad de los tumores.

Las glicoproteínas y los glicopéptidos del glicocálix que son liberados a los líquidos extracelulares, se unen a los sitios de reconocimiento y combinación antigénica de las inmunoglobulinas y los linfocitos de modo que, se presenta una inhibición aferente de la respuesta inmune de rechazo. Así, en el momento en que el linfocito se aproxima a la célula tumoral, es bloqueado en su sitio de combinación y, por lo mismo, se anula su efecto citotóxico contra la célula maligna. Además las inmunoglobulinas forman complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) que son solubles con las glicoproteínas tumorales. Como consecuen

cia, es bloqueada la posibilidad de combinación del anticuerpo con la célula neoplásica y, así mismo, el posible efecto citipático subsecuente.

Los mecanismo inmunológicos que tienen lugar en un organismo portador de tumor y los que pone en juego la célula neoplásica son semejante a aquellos que ocurren durante el embarazo entre el organismo materno adulto y las células embrionarias o fetales.

I.2 ANTECEDENTES DEL LINFOMA:

El tumor L5178Y se originó en 1956 en forma espontánea, como un linfoma de origen tímico en un ratón DBA/2; ésto, ocurrió en el laboratorio del Dr. Low Fisher, quien lo estableció después como cultivo in vitro²⁷. Estas células neoplásicas se inocularon con éxito en la cavidad peritoneal de ratones singénicos y, desde entonces, se ha mantenido por trasplante seriado intraperitonealmente; éste tumor crece en forma de suspensión celular en el líquido ascítico que el organismo del ratón produce. Por cortesía del Dr. Stevens, se obtuvo en México este tumor, procedente de la Universidad de Utah, EE.UU., siendo el Sr. Lonngi del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, de la Sección de Biología Celular del Departamento de Investigación Científica quien lo importó a México. En éste laboratorio fué mantenido durante tres años al término de los cuales, fué cedido al Laboratorio de Inmunología del Departamento mencionado. En la Sección de Biología Celular, se mantuvo en ratones singénicos DBA/2 y, se observó que el tumor L5178Y es perfectamente trasplantable a ratones BALB/ que son compatibles en el locus H-2^d; en ambas cepas, la velocidad de crecimiento del tumor es similar.

El desarrollo del tumor es causado en forma invariable por la transferencia de 8×10^7 células L5178Y a ratones adultos y susceptibles, por vía intraperitoneal. Diez días posteriores al trasplante, los ratones susceptibles mueren conteniendo 2.4×10^7 células malignas en 1 ml. del líquido ascítico y, formándose un total de 8 a 10 ml. de éste.

I.3 ANTECEDENTES DE LAS SUBSTANCIAS EMPLEADAS PARA MODIFICAR LOS ANTIGENOS DE LAS CELULAS L5178Y:

VITAMINA E.- Las vitaminas que pertenecen a la serie soluble en lípidos, como la A, D, E y K son derivados de polímeros isoprenoides cíclicos en forma parcial - 32

Probablemente, por su solubilidad en lípidos, actúan sobre las membranas celulares de forma que, afectan la permeabilidad y el transporte. Dados los grupos químicos que contienen, se califican como agentes redox (A, E y K); como coenzimas o activadores de enzimas (D, K y A); y, como inhibidores de enzimas (E) ³².

En especial para la vitamina E, se siguen descubriendo aspectos biológicos interesantes, por ejemplo, Jaffe en 1946, demostró que ésta vitamina es un factor importante en la dieta que, afecta a la respuesta carcinógena pues ésta se reduce cuando después de una inyección de metilcolantreno, agregó aceite de trigo conteniendo alfa tocoferol o vitamina E a la dieta de los animales (ratas) ³². Por tal circunstancia, la supervivencia se ve aumentada. ³².

Harber y Wissler, demostraron que la vitamina E tiene cierto efecto sobre el cancer de ratones ³³ y; Har -

man demostró que dicha vitamina tiene cierto efecto inhibitorio sobre el cáncer inducido en animales con benzantra-ceno³⁴.

López de la Rosa y Gómez Estrada³², observaron - que, la inmunización de ratones con células L5178Y modifi cadas con vitamina E, prolongó la supervivencia de los in dividuos después del reto 28.9± 1.88. Probablemente ésta sobrevida, se debe a que, la inmunización activa con célu las modificadas con vitamina E pudiera aumentar la respues ta inmune celular.

UREA. A una concentración de 200mM, la urea simu - la la acción proteolítica que tiene la tripsina sobre la célula neoplásica³⁴ modificando la estructura química de la membrana. Se espera que, la inmunización con células - L5178Y modificadas con éste reactivo, aumente el índice -- fagocitario in vitro de los macrófagos alveolares contra las células neoplásicas.

YODURO DE POTASIO. El yoduro de potasio a una -- concentración de 0.4 M, solubiliza y desnuda el glicocálix de las amibas³⁵. Los trabajos de microscopía electrónica hechos con células L5178Y tratadas con yoduro de potasio, han demostrado que, éstas no pierden el glicocálix después de una exposición de una hora a yoduro de potasio 0.4 M, sin embargo; las células aumental número de prolongaciones citoplásmicas.

En un trabajo hecho por Gómez Estrada y López de la Rosa³⁶, se demostró que la inmunización activa de rato nes con células malignas tratadas con yoduro de potasio, se produjo una supervivencia promedio de 34.10± 10.02. --

Cuando se emplearon los linfocitos de los bazo de los ratones upervivientes para efectuar la transferencia pasiva de inmunidad, el lote de ratones receptores de ellos sobrevivió un promedio de 34 días, lo que nos lleva a pensar que, ésta inmunización influye sobre aspectos celulares de la respuesta inmune.

HIPOTESIS

Las células neoplásicas, son células débilmente antigénicas por lo que, la respuesta inmune para rechazar a las células malignas es ineficaz. Por diversos mecanismos, las células tumorales escapan a la vigilancia inmunológica haciéndose inevitable la progresión del tumor.

Se puede aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales con diversos reactivos; en ésta tesis se prueban algunos de ellos; vitamina E, urea y yoduro de potasio (KI).

Las modificaciones químicas con yoduro de potasio, con urea y con vitamina E de las células L5178Y, deben por un lado, producir una respuesta inmune energética y, dirigir su respuesta, tanto a los ANE modificados como a los originales y así, lograr el rechazo inmunológico del tumor.

Se postula como hipótesis de trabajo que, una vez modificadas las células L5178Y con reactivos que podrían hacerlas inmunogénicas: vitamina E, urea y KI, e inmunizando a ratones receptores en forma activa, los macrófagos alveolares de éstos animales actuarán in vitro fagocitando a las células L5178Y.

FIGURA 1. La célula tumoral libera a los líquidos extracelulares parte de las glicoproteínas antigénicas (ANE) constituyentes del glicocálix. Los ANE liberados se unen ya sea a los anticuerpos de rechazo (Ac.R.) o a los anticuerpos de facilitación (AcF) formando complejos solubles. Los ANE solubles se unen también a los sitios de reconocimiento de los linfocitos y los anulan en su capacidad de enlazarse y desarrollar efecto citotóxico contra las células malignas.

**MECANISMOS DE INHIBICION DE LA INMUNIDAD HUMORAL Y
CELULAR HACIA CELULAS NEOPLASICAS.**

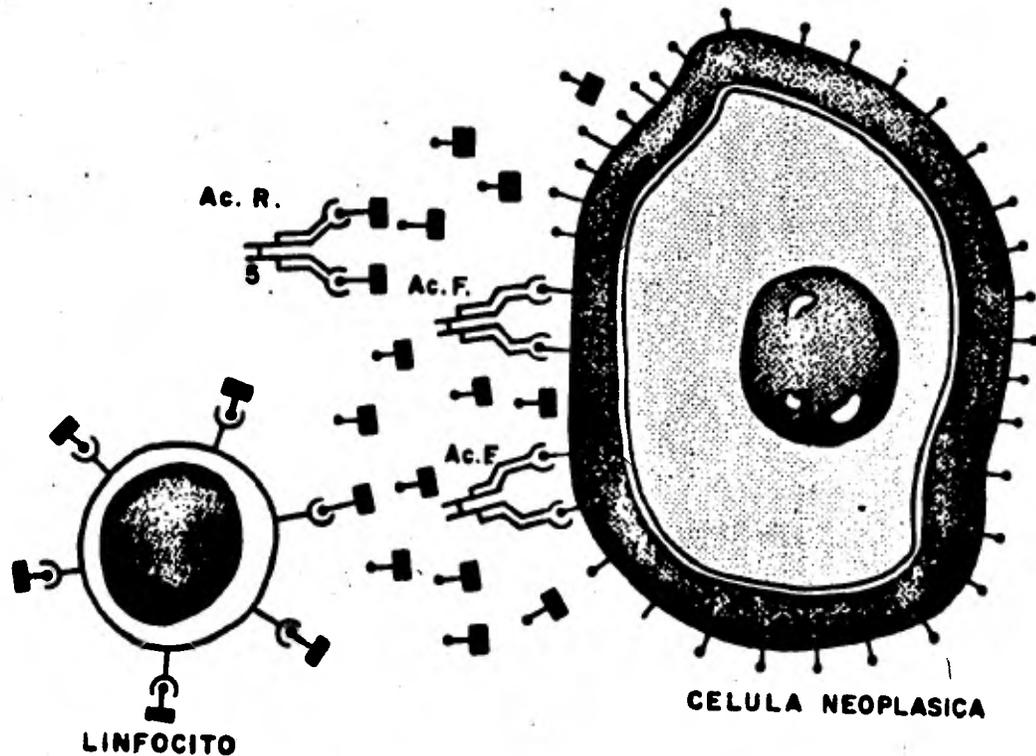
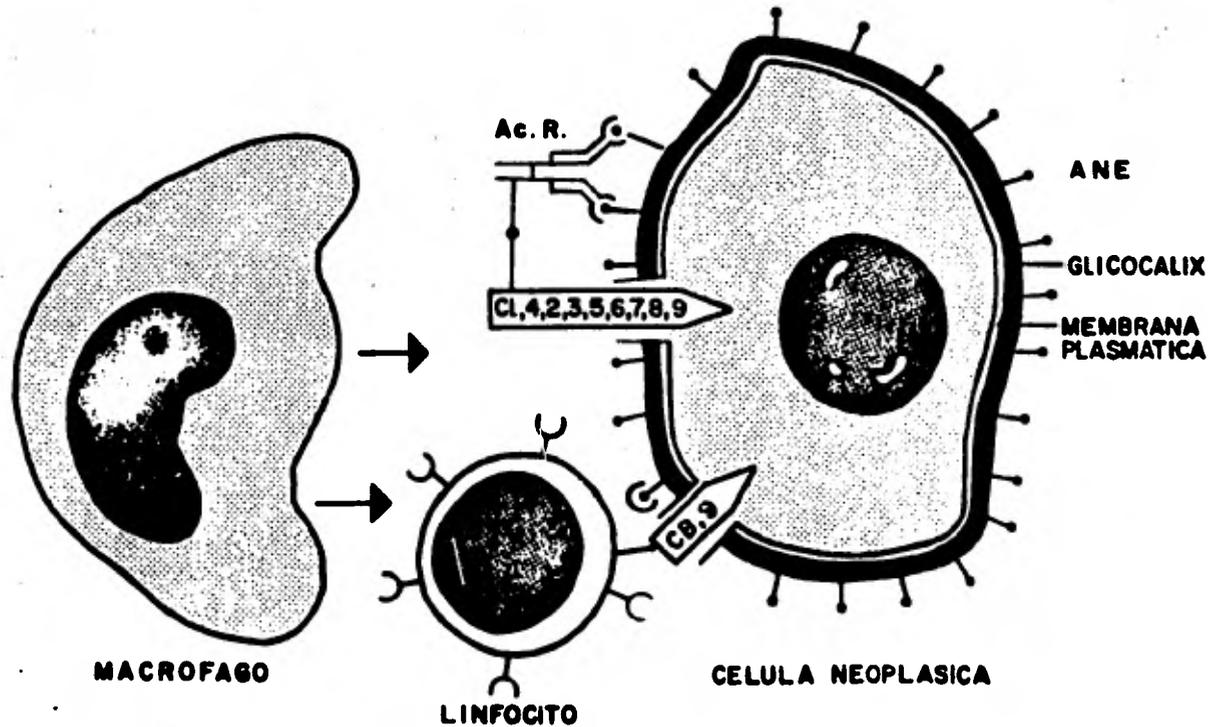


FIGURA 2. Mecanismo de inmunidad humoral y celular hacia las células malignas. El organismo produce anticuerpos con capacidad de combinarse con los ANE sobre la superficie de la célula tumoral y activar el sistema de complemento C1, 4, 2, 3, 6, 7, 8, 9, el cual produce la lesión de la membrana que mata a la célula neoplásica. Por otra parte el linfocito se combina con los ANE de la superficie celular a través de sus sitios de reconocimiento antigénico y libera en contacto directo los componentes C8 y C9 del complemento que son citotóxicos por ruptura de la membrana celular.

INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR CONTRA CELULAS NEOPLASICAS.



II MATERIALES Y METODOS

II.1 RATONES

Se emplearon 70 ratones hembras de la cepa Balb/c; 20 para cada tratamiento y 10 para el grupo testigo. Estos animales tenían dos meses de edad y un peso promedio de 23 g.

II.2 OBTENCION DE LAS CELULAS L5178Y DE LOS DONADORES Y TRASPLANTE.

Cada semana se trasplantan intraperitonealmente 8×10^7 células L5178Y suspendidas en líquido ascítico a cada uno de dos ratones del lote de mantenimiento. A partir de esto, se dejaron transcurrir 8 días para que se desarrollara el tumor.

Transcurrido ese tiempo, los ratones fueron sacrificados por descerebración y, se les colocó sobre el dorso en una placa de corcho, fijando las extremidades con alfileres. A continuación se limpió el abdomen con etanol al 96%. Se hizo una incisión en la piel sobre la línea ventral de esternon a pubis. Se separó la piel y se fijó el flanco del animal de manera que, se formó una cavidad para retener el líquido de ascitis. Se hizo una perforación de la pared abdominal del mismo flanco a donde se fijó la piel, cuidando de no romper los vasos san -

guíneos de grueso calibre; por la perforación salió el líquido ascítico que, quedó retenido en la cavidad previamente formada de donde se recogió con una jeringa sin aguja de la que, a su vez, se pasó a un tubo de ensayo esterilizado. Se centrifugó a temperatura ambiente (20 a 22°C) a 800 g/5min. Al paquete celular resultante se le agregó 10 ml. de medio de cultivo Mc Coy (Grand Island Biological Co.). De ésta concentración, se hizo una dilución 1:100 y se llevó a cabo un conteo en un hemocitómetro bajo el microscopio óptico. En función de los resultados obtenidos, se calculó el volumen de la suspensión celular original en la cuál estuvieron contenidos 8×10^7 células malignas para el trasplante de nuevos receptores.

Como receptores, se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c, de dos a cuatro meses de edad. Se desinfectó el abdomen de éstos animales con etanol al 96% que es viricida y con una jeringa de aguja delgada para insulina se inyectó el volumen del medio en el cuál estuviesen contenidas 8×10^7 células malignas.

II. 3 MODIFICACION DE LA ANTIGENICIDAD DE LAS CELULAS TUMORALES CON DIVERSOS REACTIVOS.

- a) Vitamina E
- b) Urea
- c) Yoduro de potasio

a) VITAMINA E.³² Para el tratamiento de las células con vitamina E, se agregó una lambda de la misma (Ephynel de Roche) a 200×10^6 células tumorales en medio de cultivo y se agitó. Se incubaron a 37°C durante cuatro horas, agitando cada hora. Se quitó el medio de cul-

tivo con solución salina y se congelaron a -70°C en el C.M.N. hasta el momento de utilizarlas.

b) UREA³⁶. Para llevar a cabo el tratamiento de las células con urea, se cultivaron 8×10^6 células malignas en medio de cultivo, adicionado de urea 22mM. El cultivo se realizó en botellas T para cultivo de tejidos de $5 \times 7 \times 1$ cm. a 37°C . Los cultivos se realizaron cada 24 horas. Se observó alta proliferación celular. A los cuatro días de iniciados los cultivos se lavaron las células con medio Mc Coy. Se estandarizó en número de células a 160×10^6 / ml. en medio de cultivo esterilizado. Se fijaron con glutaraldehído. Se mantuvieron congeladas a -70°C hasta el momento de emplearlas.

c) YODURO DE POTASIO³⁶. Se obtuvieron células malignas del ratón donador pasándose a un tubo de ensayo con heparina y una tercera parte de medio Mc Coy. Se centrifugaron 3 veces a 800 rpm/5 min; se lavó el paquete celular y se resuspendió en solución NaCl 0.15 M. A continuación se hicieron diluciones 1:10 y 1:100 con un conteo de células L5178Y en un hemocitómetro, se formaron alícuotas con 5×10^6 células malignas. Se agregaron 20 ml. de KI 0.40 M a una de las dos alícuotas y se le incubó a 37°C /1 hora con agitación continua. Posteriormente se centrifugó 3 veces a 800 rpm/5 min. y se lavó y resuspendió el paquete celular en solución de NaCl 0.15M. Se pasó a tubos de ensayo esterilizados y etiquetados, se congelaron a -70°C hasta el momento de usarlas para la inmunización.

II. 4 PROCEDIMIENTO DE INMUNIZACION

Se llevó a cabo inmunización activa, que consiste en la introducción de un antígeno en un animal; dicho antígeno desencadena una respuesta celular y humoral. Se emplearon para tal fin los antígenos representados por las células malignas L5178Y tratadas con los diferentes reactivos.

Se formó un grupo de 10 ratones para cada uno de los tres tratamientos (vitamina E, urea y KI) se les inmunizó cuatro veces, una vez por semana con 4×10^6 células tumorales modificadas con los reactivos y suspendidas en NaCl al 0.15 M. Cada ratón recibió 16×10^6 células tumorales modificadas y muertas. Como testigo de éstos grupos, se emplearon 10 ratones que recibieron cada semana 4×10^6 células malignas no fijadas y muertas.

II. 5 PRUEBA DE FAGOCITOSIS

Se sacrificó a cada uno de los ratones, se extrajo de ellos el árbol respiratorio completo el cual, se lavó en medio de cultivo. Se cortó en fragmentos muy finos para que se liberaran los macrófagos. Con una pipeta Pasteur se trasladó el medio con los macrófagos a cubre objetos previamente adheridos a tapones de hule. Se incubaron en una estufa a 37°C durante 45 minutos en un medio húmedo.

Transcurrido ese tiempo se sacaron de la estufa, se lavaron con medio de cultivo, se añadieron 4×10^6 células tumorales vivas y, se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Se sacaron de la estufa, se lavaron

con medio de cultivo y se dejaron secar al aire.

II. 6 ELABORACIONES DE PREPARACIONES

Los cultivos de macrófagos y células malignas se tiñeron con reactivo de Wri^gth durante seis minutos. Se retiró el reactivo y se contrastó con agua corriente. Se lavaron con agua destilada y se les dió un cambio largo de xilol. Se montaron en portaobjetos con resina.

II. 7 PRUEBA IN VITRO PARA DETERMINAR EL INDICE FAGOCITARIO

Se hizo una selección de preparaciones y se midió el índice fagocitario con 8 preparaciones correspondientes a 8 ratones para el grupo testigo; 12 para el grupo inmunizado con células L5178Y tratadas con vitamina E, 9 para el grupo inmunizado con células malignas tratadas con urea y 18 para los animales inmunizados con células tumorales tratadas con KI.

II. 8 EVALUACION DEL INDICE FAGOCITARIO

Se enfocó cada preparación a 100 aumentos en un microscopio Karl Zeiss. Se contaron 100 macrófagos por cada laminilla que, correspondía a su vez a un ratón; de los 100 macrófagos se anotó el número de ellos que se encontraba fagocitando. Se sacó un promedio de los porcentajes para cada tratamiento y para el grupo testigo. Se obtuvieron cuatro valores con los que, se trabajó esta dísticamente.



FIGURA 3 Ratón que recibió diez días antes 8×10^7 células L5178Y por vía IP. Se observa el crecimiento tumoral debido a la presencia de 8 a 10 ml de líquido ascítico en la cavidad intraperitoneal.

III. RESULTADOS

III.1 DESCRIPCION DEL EXPERIMENTO

Con el fin de eliminar posibilidades de incluir características especiales así como errores experimentales que pudieran desviar los resultados, se eliminaron - dos índices fagocitarios extremos en cada uno de los grupos.

En la tabla I se presentan los promedios de los índices fagocitarios obtenidos después de cada una de - las inmunizaciones practicadas (células tratadas con vitamina E, urea y yoduro de potasio). Tales índices re - presentan la proporción de éxitos (macrófagos fagocitan - do) de cada grupo experimental multiplicada por 100. Pa - ra saber si existe diferencia entre el grupo testigo y - cada uno de los grupos experimentales se empleó la prue - ba de proporciones (ápendice).

Los valores de χ^2 de esa prueba se presentan en la tabla II; estos nos indican, con ayuda de una compara - ción, si la diferencia entre poblaciones es significati - va. Puede allí observarse el resultado de la prueba, es decir, si la diferencia entre cada uno de los grupos tra - tados y el grupo testigo se considera significativa.

A continuación se describen los resultados:

Grupo testigo

El grupo testigo se formó por 8 ratones, es de - cir, por 8 preparaciones en cada una de las cuales se -

contaron 100 macrófagos. De estas se consideraron 6 puesto que, como se señaló al principio, se eliminaron los - dos índices fagocitarios extremos. Los datos necesarios para la aplicación de la prueba son entonces los siguientes:

6 ratones; 6 preparaciones; 600 macrófagos observados
227 éxitos (macrófagos fagocitantes); $x_1 = 227$

$$n_1 = 600$$

$$p_1' = 227/600 = 0.3783$$

Tratamiento con vitamina E

Con las mismas especificaciones tenemos, para el grupo de ratones inmunizados con células malignas tratadas con vitamina E, los siguientes datos:

10 ratones; 10 preparaciones; 1000 macrófagos
317 éxitos; $x_2 = 317$

$$n_2 = 1000$$

$$p_2' = 317/1000 = 0.3170$$

Tratamiento con urea

Para el grupo de ratones inmunizados con células malignas tratadas con urea:

7 ratones; 7 preparaciones; 700 macrófagos
393 éxitos; $x_3 = 393$

$$n_3 = 700$$

$$p_3' = 393/700 = 0.5614$$

Tratamiento con yoduro de potasio

Para el grupo inmunizado con células malignas -
tratadas con KI, los datos son los siguientes:

16 ratones; 16 preparaciones; 1600 macrófagos

572 éxitos; $x_4 = 572$

$n_4 = 1600$

$p'_4 = 572/1600 = 0.3575$

III.2 PRUEBA ESTADISTICA DE DIFERENCIA DE PROPORCIONES

Para saber si existe diferencia entre los trata-
mientos i y j , establecemos las siguientes hipótesis:

$$H_0 : p_i = p_j \text{ (no hay diferencia)}$$

$$H_1 : p_i \neq p_j$$

En el apéndice se muestra que para probar H_0
hasta comprobar, sobre esa suposición, que el valor de

$$Z(p'_i - p'_j) = \frac{p'_i - p'_j}{\sqrt{\frac{pq}{n_i} + \frac{pq}{n_j}}} \quad (1)$$

que obedece a una distribución normal estándar, cae en un
intervalo de confianza $(-Z_\alpha, Z_\alpha)$ con un nivel de significa-
ción de α por ciento. En caso de no caer en ese interva-

lo, dicha hipótesis debe rechazarse.

En (1) el valor de p es desconocido y puede aproximarse con la muestra de las poblaciones con la siguiente ecuación:

$$p = \frac{x_i + x_j}{n_i + n_j} \quad (2)$$

Realizaremos la prueba para un nivel de significación de 5 por ciento. Los valores críticos de Z que definen entonces el intervalo de confianza son $(-1.96, 1.96)$.

a) ¿Hay diferencia entre testigo y tratamiento con vitamina E?

testigo	tratamiento con vitamina E
$n_1 = 600$	$n_2 = 1000$
$p_1' = 227/600 = 0.3783$	$p_2' = 317/1000 = 0.317$

Hipótesis:

$$H_0 : p_1 = p_2$$

$$H_1 : p_1 \neq p_2$$

De (2), tenemos:

$$p = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2} = \frac{227 + 317}{1000 + 600} = 0.34$$

$$q = (1 - p) = (1 - 0.34) = 0.66$$

Sustituyendo los valores correspondientes en la ecuación (1):

$$\begin{aligned} Z(p'_1 - p'_2) &= \frac{p'_1 - p'_2}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_2}}} = \frac{0.3783 - 0.3170}{\sqrt{\frac{(0.34)(0.66)}{600} + \frac{(0.34)(0.66)}{1000}}} \\ &= 2.5059 > 1.96 \end{aligned}$$

Entonces, para 5 por ciento de significación, se rechaza H_0 , lo cual implica que sí hay diferencia, esto es, $p_1 \neq p_2$; y como la variable probada en este caso es $(p_1 - p_2)$ y $Z > 1.96$, se concluye que $p_1 > p_2$.

b) ¿Hay diferencia entre testigo y tratamiento con urea?

testigo	tratamiento con urea
$n_1 = 600$	$n_3 = 700$
$p'_1 = 0.3783$	$p'_3 = 393/700 = 0.5614$

Hipótesis:

$$H_0 : p_1 = p_3$$

$$H_1 : p_1 \neq p_3$$

De (2), tenemos:

$$p = \frac{x_1 + x_3}{n_1 + n_3} = \frac{227 + 393}{600 + 700} = 0.4769$$

$$q = (1 - p) = (1 - 0.4769) = 0.5231$$

Sustituyendo los valores correspondientes en la ecuación (1):

$$\begin{aligned} Z(p'_1 - p'_3) &= \frac{p'_1 - p'_3}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_3}}} = \frac{0.3783 - 0.5614}{\sqrt{\frac{(0.4769)(0.5231)}{600} + \frac{(0.4769)(0.5231)}{700}}} \\ &= -6.589 < -1.96 \end{aligned}$$

Para 5 por ciento de significancia, se rechaza H_0 y, en virtud de que $(p_1 - p_3)$ tiene valor negativo, se concluye que $p_3 > p_1$.

c) ¿Hay diferencia entre testigo y tratamiento con yoduro de potasio?

testigo	tratamiento con yoduro de potasio
$n_1 = 600$	$n_4 = 1600$
$p'_1 = 0.3783$	$p'_4 = 572/1600 = 0.3575$

Hipótesis:

$$H_0 : p_1 = p_4$$

$$H_1 : p_1 \neq p_4$$

De (2), tenemos:

$$p = \frac{x_1 + x_4}{n_1 + n_4} = \frac{227 + 572}{600 + 1600} = 0.3631$$

$$q = (1 - p) = (1 - 0.3631) = 0.6369$$

Sustituyendo los valores correspondientes en la ecuación (1):

$$\begin{aligned} Z(p'_1 - p'_4) &= \frac{p'_1 - p'_4}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_4}}} = \frac{(0.3783) - (0.3575)}{\sqrt{\frac{(0.3631)(0.6369)}{600} + \frac{(0.3631)(0.6369)}{1600}}} \\ &= 0.90356 \quad (-1.96 < 0.9035 < 1.96) \end{aligned}$$

En este caso se acepta H_0 , es decir, no hay diferencia entre el grupo testigo y el grupo tratado con yoduro de potasio:

$$(p_1 = p_4).$$

III.3 ¿POR QUE SE ESCOGIO LA PRUEBA ESTADISTICA DE DIFERENCIA DE PROPORCIONES?

Son varios los ratones que integran cada uno de los grupos experimentales; ello ha tenido por fin lograr una representación adecuada de cada una de sus correspondientes poblaciones, ya que uno solo de los ratones podría tener características particulares que lo hicieran diferen-

te de los demás de su grupo.

El número de macrófagos observados en cada ratón se considera igualmente representativo de su población.

Las poblaciones representadas por el grupo testigo y los exprerimentales (diferentes tratamientos), son poblaciones binomiales e independientes, ya que los posi - bles resultados de la observación de cada macrófago son - dos: 1) fagocita (éxito); y 2) no fagocita (fracaso), y - los resultados de la observación de cada grupo experimental son independientes entre sí (ver apéndice).

La proporción de éxitos (macrófagos fagocitando) de cada grupo experimental es el parámetro que debemos comparar, ya que se desea emitir un juicio sobre la diferen - cia de tratamientos con base en su valor. Nos paoyamos pa - ra ello, en la función de diferencia de proporciones des - crita en el apéndice; tal función ofrece la ventaja de que la prueba de una hipótesis acerca de la igualdad de las - proporciones es suficiente para emitir un juicio preciso - sobre la relación que guardan proporciones de cada par de poblaciones observadas; cuando la hipótesis resulta falsa, es fácil saber cuál de las proporciones es mayor.

Para probar que las proporciones p_1 y p_2 son igua - les ($p_1 = p_2$) hasta comprobar que:

$$z = \frac{p_1' - p_2'}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_2}}}$$

que es una variable aleatoria con distribución normal estándar, tiene un valor que cae en un intervalo de confianza $(-Z_\alpha, Z_\alpha)$ con un nivel de significación de α por ciento. En caso contrario se rechaza.

TABLA I. INDICES FAGOCITARIOS OBTENIDOS DESPUES DE LAS
INMUNIZACIONES PRACTICADAS

Grupo testigo	T R A T A M I E N T O		
	Vitamina E	Urea	K1
37.83	31.70	56.14	35.75

TABLA II. RESULTADOS DE LA PRUEBA ESTADISTICA PARA LAS RELACIONES ENTRE LOS INDICES FAGOCITARIOS DEL GRUPO - TESTIGO Y CADA UNO DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.

	T R A T A M I E N T O		
	Vitamina E	Urea	KI
Valor de	2.5059	-6.589	0.9035
Z	$(2.5059 > 1.96)$	$(-6.589 < -1.96)$	$(-1.96 < 0.9035 < 1.96)$

IV. D I S C U S I O N

El sistema inmune, a través de mecanismos de vigilancia inmunológica es capaz de una respuesta inmune, cuando se establece en el organismo una clona de células malignas o cuando se desarrolla un tumor canceroso^{12,13,21,5,4,37}.

Los macrófagos tienen un papel muy importante en la respuesta inmune celular, existen evidencias de su actividad en la iniciación de la respuesta de hipersensibilidad retardada^{38,39}. Dichas evidencias son, entre otras:

1) Durante el crecimiento tumoral de animales con tumor, las clonas de macrófagos tuvieron un aumento significativo en comparación con los testigos.⁴⁰

2) Cuando las macromoléculas se encuentran unidas a la superficie de los macrófagos, hubo un aumento demostrado de inmunogenicidad⁴¹.

3) Durante el crecimiento de los tumores singénicos, la actividad fagocítica de las células del sistema reticuloendotelial aumenta^{42,43,39}.

4) Cuando se quita el exceso de antígenos del complejo Ag-Ac de la circulación, intervienen los macrófagos para obtener el balance entre los dos tipos de inmunidad, la humoral y la celular⁴⁴.

A pesar de ello, puede ser inhibida la respuesta inmune cuando, en el organismo se producen anticuerpos de fagocitación que protegen a la célula maligna de tres formas:

1) Hay enmascaramiento de los antígenos de histocompatibilidad normales^{28,29,30}.

2) Parte de las glicoproteínas son liberadas a los líquidos extracelulares de manera que, se unen con los sitios de reconocimiento y combinación antigénica de las inmunoglobulinas y linfocitos. y

3) Por último, las inmunoglobulinas, forman complejos antígeno-anticuerpo solubles con las glicoproteínas tumorales, bloqueando la posibilidad de combinación del anticuerpo con la célula tumoral, evitando el posible efecto citopático subsecuente.

Por otro lado, las células malignas liberan ANE a los líquidos extracelulares^{23,46,47} que, bloquean a distancia el efecto citocídico de los linfocitos y de los macrófagos contra las células de cancer⁴⁷. Los ANE, ocupan algunos sitios de reconocimiento antigénico de los linfocitos y así mismo, los sitios de combinación de los Acs circulantes⁴⁸. Así, se inactiva la respuesta inmune celular y humoral iniciadas por la presencia del tumor.

Por ello, los mecanismos inmunes puestos en juego, son activados por el tumor o son de facilitación y favorecen el crecimiento tumoral.

Los determinantes antigénicos de los ANE, pueden inducir una respuesta de facilitación⁴⁹. Cuando por el contrario, la respuesta inmune del organismo hacia los ANE es de rechazo, está mediada de forma principal por inmunidad celular y, algunas veces por fijación de complemento^{4,37}.

Las glicoproteínas que constituyen a los ANE son de alta solubilidad, electronegativas y resisten --tes a la degradación por enzimas^{49,17,50}. Por estas características tienen una mayor solubilidad y desprendimiento de las células neoplásicas y por ellas también se puede explicar su comportamiento inhibitorio de los mecanismos inmunológicos de rechazo^{45,47}.

Parece ser que, existe una serie de factores en combinación que da lugar a la permanencia de los neopla-

sias: en el organismo. Cabe mencionar la semejanza con el mecanismo que permite que permanezcan los tejidos embrionarios y fetales en el seno materno³⁷. Aunada a la transformación maligna de las células, ocurre una regresión antigénica hacia el estado embrionario o fetal⁵¹, la permanencia de las células malignas en el organismo se debe a que, dichas células se toleran en forma similar a como se toleran las células del producto en la madre embarazada^{45,52}.

Por ésta difícil situación, se hace más complicado encontrar procedimientos útiles de inmunoterapia y de prevención contra las neoplasias.

La inmunoterapia de cáncer tiene objetivos tales como, disminuir la producción de anticuerpos de facilitación; reducir el bloqueo de los ANE circulantes - sobre las células efectoras de la respuesta inmune contra los de cáncer; disminuir el bloqueo de los ANE sobre los Acs de rechazo; disminuir la cantidad de ANE liberados por las células neoplásicas; aumentar la capacidad de fijación de complemento de los Ac de facilitación.

Mediante un procedimiento adecuado de inmunización activa del portador del tumor contra las células tumorales, podría ser posible disminuir la síntesis de Aca de facilitación; así, posiblemente se obtenga un incremento en la respuesta celular contra el tumor.

En especial, ha sido reportada la activación de los macrófagos contra la neoplasia por varios autores, - por ejemplo, Gorer⁵³, en 1956 reportó una importante función de macrófago en el rechazo del tumor. Bennett, et al⁵⁴, Rabino vitch, et al⁵⁵, y Chambers, et al⁵⁶ demostraron que, en huéspedes inmunizados, los macrófagos - pueden eliminar células malignas por medio de la fagocitosis. Por otro lado, Granger y Wieser en 1964⁵⁷ y en

1966⁵⁸ propusieron que la acción de los macrófagos se logra por un estrecho contacto a través de la membrana. - Evans y Alexander⁴³, demostraron la existencia de una interacción inmunológica específica seguida de una reacción letal no específica en la destrucción de células malignas.

Durante la fagocitosis, la acción de los macrófagos es el movimiento de su membrana en la que, aumentan las prominencias y el número de vesículas pinocíticas⁵⁹. El empleo de la microscopía electrónica demostró que, en algunos linfomas trasplantables, los macrófagos tienen fagosomas llenos de células tumorales en diferentes estados de digestión⁴³ y, se vió aumentada la actividad lisosomal⁶⁰. Chambers V.C. y Wieser R.S.⁵⁹ en 1969, observaron en el microscopio electrónico que, durante las primeras tres horas hay numerosos contactos entre los macrófagos inmunes y las células malignas L. Las membranas celulares de las células malignas quedan intactas, y no se vieron cambios degenerativos obvios. De cualquier modo, las protuberancias finas de las extensiones citoplasmáticas de las células L dentro de las invaginaciones de la superficie de los macrófagos sugiere que, éstas protuberancias pueden ser adelgazadas a distancia y englobadas por los macrófagos.

La destrucción de células de un linfoma ascítico de ratones DBA/2 por macrófagos peritoneales in vitro, - fué reportada por Weaver en 1958⁶¹. Granger, et al^{57,58} obtuvieron la destrucción in vitro de células blanco por macrófagos de ratones inmunizados.

Evans y Alexander^{62,43}, Black, et al⁶³ y Granger y Wieser⁵⁷ demostraron que, los macrófagos de animales inmunizados con células L5178Y radiados, son capaces de inhibir en forma específica a la autoduplicación in vitro de las células malignas.

Se han observado aumentos en la actividad fagocítica. Torikai, et al⁶⁴ en 1980, observaron que, una proteína designada como LB, aumenta en el suero de los ratones tratados con OK 432 (pcibanil) presentandose un mayor efecto sobre las células tumorales muertas. La proteína aumenta el efecto de los macrófagos haciéndolos más capaces de fagocitar células aunque no selectivamente tumorales.

La actividad citolítica de los macrófagos fué aumentada por la adición de muramil dipéptidico para un ensayo citotóxico; un ensayo similar se observó con un lipopolisacárido bacterial. (Taniyama, et al)⁶⁵. Esta última sustancia, fué probada en otros ensayos por el mismo autor⁶⁶, donde observó que la actividad citolítica de los macrófagos es aumentada contra las líneas tumorales. Además de utilizar polisacáridos bacteriales y poli I;C indicando que la activación de los macrófagos por éstos estimulantes no requiere la participación de otros tipos celulares. El tratamiento por interferón también aumentó la muerte de las células tumorales por líneas celulares de macrófagos.

Boraschi, et al⁶⁷, observaron un aumento en la capacidad tumoricidal en ratones tratados in vitro con sobrenadantes ricos en linfocinas y lipopolisacáridos endotóxicos bacteriales.

Los sobrenadantes de células de exudado peritoneal de ratón, tratados con NaIO_4 , contienen potente actividad del factor activador de macrófagos, (Weinberg, et al)⁶⁸.

Marino, et al⁶⁹, Adams, et al⁷⁶ y Sharma, et al⁷¹ observaron un aumento en la actividad in vitro de los macrófagos por adición de BCG. Marino, et al,⁶⁹ observaron que la citólisis fué selectiva en la interacción entre los macrófagos tratados con BCG y las células blanco neoplásicas con dirección a la lisis significativa. La unión es -

pontánea de las células blanco EL-4 ó P815 a los macrófagos peritoneales activados con BCG, probablemente es una medida inicial y necesaria en la destrucción citolítica de éstas células blanco⁶⁹. Una fracción parcialmente purificada de los sobrenadantes de cultivos de macrófagos de cobayo infectado con BCG, fué citotóxico a células malignas y no normales.⁸²

Los macrófagos de los ratones normales tratados con células esplénicas, células hepáticas o peritoneales de ratón con tumor, incrementaron la fagocitosis y hubo depresión en las respuestas quimiostáticas⁷².

Parece ser que, las diferentes líneas celulares de los macrófagos, representan diferentes niveles de activación y/o diferenciación. El estudio de los macrófagos puede ser útil para el desarrollo de éstos procesos así - como, para el análisis de los mecanismo de citólisis mediada por macrófagos⁶⁶.

El objetivo de éste trabajo fué estudiar el índice fagocitario de células L5178Y in vitro por macrófagos alveolares de ratones inmunizados con células malignas modificadas con Vitamina E, urea y yoduro de potasio.

Se postuló como hipótesis que, una vez modifica-das las células L5178Y con reactivos que podrían hacerlas inmunogénicas: vitamina E, urea y yoduro de potasio, e inmunizando con ellas a ratones receptores en forma activa, los macrófagos alveolares de éstos animales a actuarían - in vitro fagocitando a las células malignas.

Se observó que, los macrófagos fagocitaron a cé-lulas L5178Y tratados con urea, y se presentó un aumento significativo del índice fagocitario con relación al del grupo testigo; los macrófagos que fagocitaron con células L5178Y modificadas con KI, no presentaron diferencia sig-nificativa con el grupo testigo y, finalmente, los macró-fagos correspondientes al tratamiento con vitamina E, mostraron una disminución significativa del índice fagocita-rio.

El aumento significativo en el índice fagocitario de las células tumorales modificadas con urea podría deberse a que como indicó Weston J.A. et al⁷³ este reactivo a una concentración de 200 mM tiene una acción proteolítica sobre las células neoplásicas semejante a la ejercida por la tripsina. Las células L5178Y desprovistas de algunas proteínas del glicocálix podrían ser más fácilmente fagocitadas por los macrófagos alveolares in vitro.

En relación con el tratamiento de las células tumorales con KI, Gómez Estrada, et al³⁶ encontraron que la supervivencia de ratones inmunizados con estas células fue de 34.10 ± 10.02 y que los ratones a los que se aplicó transferencia pasiva de inmunidad (mediante linfocitos provenientes del bazo de ratones supervivientes a la inmunización activa con células tratadas con KI), sobrevivió un promedio de 34 días. Nosotros propusimos en la introducción de este trabajo, que debido a estas evidencias, la inmunización activa influye sobre la respuesta inmune celular. Sin embargo al examinar el índice fagocitario de las células tratadas con KI que no presentó diferencia significativa con el grupo testigo, consideramos que no es a nivel de los macrófagos en donde reside la explicación a la supervivencia sino es probablemente a nivel de linfocitos T en donde se presenta una modificación importante que explique la supervivencia de los animales inmunizados con células modificadas con este reactivo.

El índice fagocitario de células L5178Y modificadas con vitamina E tuvo una disminución significativa con respecto al testigo por lo que resultaría interesante hacer repeticiones de este experimento in vitro y además cultivos de linfocitos con células malignas tratadas con vitamina E para investigar si son los linfocitos T los que atacan a las células L5178T y de esta manera se presenta una respuesta inmune celular in vitro.

V. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fué estudiar el índice fagocitario de células L5178Y in vitro por macrófagos alveolares de ratones inmunizados con células malignas modificadas con Yoduro de Potasio, Urea y Vitamina E.

Se efectuaron cultivos de macrófagos y de ratones inmunizados con células malignas modificadas con diferentes reactivos y se estimó el índice fagocitario de éstos macrófagos contra células tumorales intactas.

Los índices fagocitarios fueron significativos en el caso del tratamiento con urea; en el caso del tratamiento con KI se mantuvo igual al del testigo y con respecto a las células tratadas con vitamina E, el índice fagocitario disminuyó.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. GORDON, B.L. 1975, "Lo esencial de la inmunología", Méx. El Manual Moderno, 2da. ed.
2. "Anuario Estadístico de la Secretaría de Industria y Comercio," 1969.
3. ALEXANDER, P. "Foetal "antigens" in cancer", NATURE 235: 137, 1972.
4. BURNET, F.M., "Immunological recognition of self", SCIENCE 133: 307, 1961
5. HAMILTON, F.S. "Immunity to malignant diseases in man", - BRIT. MED. J. 2: 467, 1969
6. BRODER, MULL Y WALDMANN, "Supressor Cells in Cancer", J. NATL CANCER INST 61 (1): 5-11, 1978
7. GORCZYNSKY, R.M. "Immunity to murine sarcoma virus induced tumors II. Supression of T-cell mediated immunity by - cells from progressor animals. " J. IMMUNOL 112: 1826 - 1838, 1974
8. KIRCHNER H. CHUSED T.M.? HERBERMAN R.B., Et Al! "Eviden - ce of suppressor cell activity in spleens of mice bea - ring primary tumors induced by Moloney sarcoma virus". J. EXP. MED. 139:1473-1487, 1974
9. FOLEY, E.J. "Antigenic properties of methylcholantrene - induced tumors in mice of the strain or origin. CANCER RES 13: 835, 1953.
10. PREHN, R.T., "Specific immunity to methylcholantrene in - duced sarcomas", J. NAT. CANCER INST. 18: 769, 1957
11. KIRBY, D.P.S., BILLINGTON, W.D., JAMES, D.A., "trans - plantation of eggs to the kidney and uterus of immuni - sed mice", TRASPLANTATION 4: 713, 1966.
12. COGGIN, J.H., AMBROSE, K.R., ANDERSON, N.G., "Fetal an - tigen capable of inducing transplantaion immunity - against SV 40 hamster tumor cells." J. IMMUNOL 105:525, 1970.

13. OLD, L.J., BOYCE, E.A., "Immunology of experimental tumor"; ANN, REV. MED. 15: 167, 1964
14. KLEIN, G., "Experimental studies in human tumor immunology", FED. PROC., 28: 1739, 1969
15. ABELEV, G.I. "Production of embryonal serum alpha globulin by hepatomas. Review experimental and clinical data", CANCER RES 28: 1344, 1968
16. GOLD, P. FREEDMAN, S.O. "Specific carcinoembryonic antigenic of the human digestive system", J. EXP. MED. 22: 467, 1965.
17. LAURENCE, B.J., MUNROE, N.A. "Foetal antigens and their role in the diagnosis and clinical managements of human neoplasias: a review", BR. J. CANCER., 26: 335, 1972.
18. PETERSON, G., FREEMAN, G. "Evidence sugges ting a relationship between polyoma virus induced trasplantation - antigen and normal embrionic antigen", CANCER RES 28: - 1965, 1968,
19. AMBROSE, K.R., ANDERSON, N.G., COGGIN, J.H. "Interrup - tion of SV 40 oncogenesis with human foetal antigen", - NATURE 233: 194, 1971
20. BARDAWILL, W.A., TOY, B.L., "The natural history of cho riocharcinoma, Problems of immunity and espontaneous re gression", ANN. N.Y. ACAD. SCI 80: 197, 1959
21. RALPH, M. WINN, M.D., "Fetomaternal callular relations - in the human basal plate: an ultrastructural study of the placenta", ANN. J. OBST. GYNOCOL 97: 832, 1967
22. HAUGHTON, G.A., AMOS, D.B., "Immunology of carcinogene - sis" CANCER RES 28:1839, 1968
23. PREHN, R.I. "Cancer antigens in tumors induced by chemi - cals", FED. PROC., 24: 1018, 1965.
24. KLEIN, G., "Tumor antegens", ANN. REV. MIVROBIOL. 20: 233, 1966.
25. SMITH, R.T., "Tumor specific immune mechanisms", NEW - ENG J. MED. 278: 1207, 1968
26. KALISS, N., KANDUSCH, A.A. "Acceptance of tumor homo - grafts by mice injection with antiserum. I activity of serum fractions", PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 9: 118, 1956
27. HUTCHINS, P., "Mecanism and functions of immunological enhancement", SURG. GYNECOL. OBST. 126:1331, 1968
28. CURRIE, G.A., BAGSHAW, K., "The masking of antegens in trophoblast and cancer cell", LANCET 1:708, 1967

29. INBAR, M., SACHS, L., "Structural differences insites of the surface membrane of normal and transformed cells" NATURE 233: 710, 1969.
30. WALLACH, D.F.H., "Cellular membranes and tumor behavior. A new hypothesis". PROC. NAT. ACAD. SCI. 76: 673,1968
31. FISHER, G.A. "Studies of the culture of leukemia cells in vitro", ANN NY ACAD. SCI. 76: 673, 1957
32. LOPEZ DE LA ROSA Y GOMEZ ESTRADA, "Efecto de la vitamina"E"en la supervivencia de ratones Balb/c retados con células L5178Y. 19
33. HARBER, S.L., WISSLER, R.W., "Effect of Vitamin E on - Carcinogenicity of Methylcholantrene", PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. III: 744, 1962
34. HARMAN, D., "Dibenzanthracene induced cancer", CLIN RES 17: 125, 1969
35. TREVIÑO, G.M.N., CASTAÑEDA, M. MAGDALENO, V.M., FERIA, V.A., "Eritografía y leucofagia por trofozoitos de E. histolytica con cubierta exterior o sin ella" ARCH. - INV. MED. SUPPL. I 5: 49, 1973
36. GOMEZ ESTRADA, LOPEZ DE LA ROSA, et al. "I nmunogenicidad de las células L5178Y modificadas con diferentes - reactivos", ARCH.INV. MED. 8: 2, 1977
37. KEAST, D., "Immunosurveillance and cancer" LANCET 2: 710, 1970
38. FELDMAN, M. PALMER, J., "The requirement for macrophages in the secondary immune response to antigens of - smalls and large size", IMMUNOLOGY 21: 685, 1971
39. OLD, Ll, J. et al. "The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia", CAN. RES. 21: 1281, 1961.
40. EVANS, R. " Phagocytosis of murine limphoma cells by - macrophages", IMMUNOLOGY 20: 75, 1971
41. CRUCHAUD, A. UNANUE, E.R. "Fate and immunogenety of an tigenes endocitosed by macrophages: A study using fo - reign red cells and IgC", J. IMMUNOL 107: 1329, 1971
42. BLAMEY, R. W. "Experiments in tumour immunology", BRIT J. SURG 55: 769, 1968
43. ALEXANDER, P., EVANS, R. "Mechanism of immunologically specific killing of tumoral cells by macrophages, NATU- RE 236: 168, 1972
44. UNANUE, E.R. CEROTTINI, J.CH., "The immunogenicity of antigen bond to the plasma membrane of macrophages", J. EXP. MED. 131: 711, 1970

45. HELLSTROM, I., BRAUN, J. "Abrogation of cellular immunity to antigenically foering mouse embryonic cells by a serum facto. " NATURE 224: 914. 1969
46. THOMSON, D.M. KRUYEY, J., FREEDMAN, S.A., GOLD, P. "The - radioimmunoasay of circulating carcynoembryonic antigenic in the human digestive system. PROC. NAT. ACAC. SCI. 64: 161. 1969.
47. CURRIE, G.A., BASHAM, C. "Serum mediated in inhibition of the immunological reactions of the patient to his on tu - mour. A posible role of circulating antigen" BR. J. CAN 26: 427. 1972
48. Mc SWEEN, Z.J., WARNER, N.L., BANKHURST, A.D. MCKAY, J. R. "Carcynoembrionic antigen in Whole serum" BR. J. - CAN 26: 356. 1972
49. MARSHALL, W.E. PORATH, J. "The structure of glycoproteins. I. The nature and number of oligosacharides side - chains of alpha I acid glycoprotein, celulo plasmin and - alpha 2 globulin and metha globulin and metha globulin of human serum. " J. BIOL CHEM. 240: 209. 1965
50. ROSENBERG, S.A., EINSTEIN, A.B. "Sialic acids on the plas - ma membrane of cultures human lymphoid cells. Chemical aspects and biosynthesis," J. CELL BIOL 53: 466. 1972
51. STONEHILL, E.J. BANDICH, A. "Retrogenetic expression the reaparence of embryonal antigens in cancer cells. NATURE 228: 370. 1970
52. SINKOVIES, J.G., di saia, P.J. RTLEDGE, F.M. "Tumour im - munology and evolution of placenta." LANCET 11: 1190. 1970
53. GORER, P.A. "Some recent work on tumour immunity" ADV. - CAN RES. 4: 149. 1956
54. BENNETT, B. OLD, L.J., BOYCE, E. "The fagocytosis of tu - mor cells in vitro". TRASPLANTATION. 2: 183. 1964
55. RAVINOVITCH, M. "Phagocytic recognition in mononuclear phagocytes" BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS OXF. p.299 1970
56. CHAMBERS, W.E., WEISER, R.S. "The ultrastructure of sar - coma I cells and immune macrophages during their interac - tion in the peritoneal cavities of immune C57 BL/6 mice" CAN. RES. 32: 413. 1972
57. GRANGER, G.A., WEISER, R.S. "Homograft target cells spe - cific destruction in vitro by contact inter action with immune macrophages" SCIENCE 145: 1427. 1964
58. GRANGER, G.A., WEISER, R.S. "Homograft target cells con -

- tact destruction in vitro by immune macrophages" . SCI-
ENCE 151: 97. 1966
59. CHAMBERS, V.C. WEISER, R.S. "The ultrastructure of target cells and immune macrophages during their interaction in vitro". CAN RES 29: 301 1969
 60. DANNENBERG, L. "A histochemical study of phagocytic and polymorphonuclear exudate cells and alveolar macrophages" J. CELL BIOL 17: 465. 1963
 61. WEAVER, J.M. "Destruction of mouse ascites tumour cells in vitro by homologous macrophages, lymphocytes and cell free antibodies" PROC AM SOC CAN RES 2: 354. 1958
 62. EVANS, R., ALEXANDER, P. "Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumor immunity". NATURE 228: 620. 1970
 63. BLACK, M. M. , OPLER, S.P., SPEER, F. D. "Allograft Response in vitro" SURG. GYNEC. OBSTET. 98: 725 1954
 64. TORIKAI, TAKASHI, OSAMU ITOH, MOTONOBU SATOH and TOSHIAKI OSAWA. "Enhancement of macrophage tumoricidal activity by a serum glycoprotein that increased in OK 432 (picibanil) treated mice". GANN71(1):52-29 1980
 65. TANIYAMA, TADAYOSHI and HOWARD T. HOLDEN. "Direct augmentation of cytolytic activity of tumor-derived macrophages and macrophage cell lines by muramildipentide. CELL IMMUNOL 48 (2): 369-374
 66. TANIYAMA, TADAYOSHI AND HOWARD T. HOLDEN "Cytolytic activity against tumor cells by macrophage cell lines and augmentation by macrophage stimulants." INT. J. CANCER 26 (1): 61-70 1980
 67. BORASCHI, DIANA and MONTES MELTZER. "Defective tumoricidal capacity of macrophages from P/J mice: Characterization of the macrophage cytotoxic defect in vivo and in vitro activation stimuli, " J. IMMUNOL 125 (2): 771 - 776. 1980
 68. WEINBERG, J. BRICE and B. HIBBS, Jr. "In vitro modulation of macrophage-activating factor (s) in supernatants of NaIO₃ treated peritoneal cells. " RES. J. RETICULOENDOTHEL SOC 26(3): 283-294. 1979
 69. MARINO, P.A. and D.O. ADAMS. "Interaction of BCG-activated macrophages and neoplastic cells in vitro: 1. Conditions of binding and its selectivity" CELL IMMUNOL 54 (1): 11-25. 1980
 70. ADAMS, DOLPH. JUO-JANG KAO, RODERICK FARB SALVATORE V. PIZZO. "Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages: 2. Secretion of cytolytic factor by activated macrophages and its relationship to secreted neutral-

proteases. " J. IMMUNOL 124 (1): 293-300. 1980

71. SHARMA, GOMESH D., WILLY F. PIESSENS AND GARDER MIDDLEBROOK. "In vitro killing of tumor cells by soluble products of activated guinea pig peritoneal macrophage" . CELL IMMUNOL 49 (2): 379-383. 1980
72. STEVENSON, MARY M., JOHN C. REES AND MONTES. MELTZER. "Macrophage function in tumor bearing mice: Evidence for lactic dehydrogenase elevating virus associated changes." J. IMMUNOL 124(6); 2892-2899. 1980
73. WESTON, J.A., HENDRICKS, K.L. "Reversible transformation by urea of contact inhibited fibroblasts". PROC ACAD. SCI. 69: 3727. 1972
74. MORENO BONETT, A. y JAUFFRED M., F.J. 1969 "Elementos de probabilidad y estadística", Representaciones y servicios de ingeniería, México,

APENDICE. FUNCION DE DISTRIBUCION DE DIFERENCIA DE PROPORCIONES

La distribución binomial

Supóngase efectuar n experimentos independientes tales que el resultado de cada uno de ellos es: éxito (E) o fracaso (F); que la probabilidad de E es p y la de F es q , siendo $p + q = 1$. Entonces, se dice que se tienen n pruebas de Bernoulli con probabilidad p de éxito (ref 86, p 61).

En una prueba como esa, la probabilidad de obtener x éxitos es dada por la siguiente expresión:

$$f(x) = \binom{n}{x} p^x q^{n-x} \quad x = 1, 2, 3, \dots, n \quad (1)$$

esta función recibe el nombre de distribución binomial o de Bernoulli (ref 86, p 62); su media y desviación estándar están dadas respectivamente por:

$$\mu_x = np \quad (2)$$

$$\sigma_x = \sqrt{npq} \quad (3)$$

Aproximación de la distribución binomial a la normal

Teorema 1: Si x representa el número de aciertos en n pruebas de Bernoulli con probabilidad p de éxito, entonces la variable

$$Z = \frac{\bar{x} - \mu_x}{\sigma_x} = \frac{x - np}{\sqrt{npq}} \quad (4)$$

tiene una distribución que se aproxima a la normal estándar $f(x; 0, 1)$ cuando el número de pruebas crece indefinidamente.

Se ha encontrado que la aproximación mencionada es suficientemente buena si $np > 5$ cuando $p \leq \frac{1}{2}$, o $nq > 5$ cuando $p > \frac{1}{2}$ (ref 86, p 76-77).

Corolario. Si al realizar n pruebas de Bernoulli con probabilidad p de éxito, el resultado éxito se verifica k veces, entonces la proporción de éxitos es:

$$f^* = \frac{k}{n} \quad (5)$$

La variable aleatoria asociada a los diversos valores de f^* es $y = \frac{x}{n}$ y su media está dada por:

$$\mu_y = E\{y\} = E\left\{\frac{x}{n}\right\} = \frac{1}{n} E\{x\} = p \quad (6)$$

y su variancia es:

$$\sigma_y = E\{(y - p)^2\} = \frac{1}{n^2} E\{(x - np)^2\} = \frac{pq}{n} \quad (7)$$

De esta manera las proporciones del resultado éxito siguen una distribución de probabilidad que se aproxima a la normal con media p y desviación estándar pq/n si n es suficientemente grande

Diferencia de proporciones

Teorema 2: Sean p'_1 y p'_2 proporciones muestrales independientes de poblaciones binomiales con probabilidades p_1 y p_2 . Si n_1 y n_2 son suficientemente grandes para que las proporciones p'_1 y p'_2 sean tratadas como normales, la función de la variable $(p'_1 - p'_2)$ se aproxima a la normal con media

$$\mu(p'_1 - p'_2) = p_1 - p_2 \quad (8)$$

y desviación estándar

$$\sigma(p'_1 - p'_2) = \sqrt{\frac{p_1 q_1}{n_1} + \frac{p_2 q_2}{n_2}} \quad (9)$$

Entonces, (teorema 1), la variable

$$Z = \frac{\bar{x} - \mu_x}{\sigma_x} = \frac{(p'_1 - p'_2) - \mu(p'_1 - p'_2)}{\sigma(p'_1 - p'_2)} \quad (10)$$

tiene una distribución normal estándar $\delta(p_1 - p_2; 0, 1)$.

Supóngase que se desea probar que p_1 y p_2 (las probabilidades de éxito de estas dos poblaciones binomiales) son iguales

($p_1 - p_2 = 0$). Bastará comprobar, sobre esa suposición, que Z

tiene un valor que cae en un intervalo de confianza $(-Z_\alpha, Z_\alpha)$

con un nivel de significación de α por ciento. En caso de no caer en ese intervalo, dicha hipótesis deberá rechazarse. Esto es,

$$H_0 : p_1 = p_2$$

$$H_1 : p_1 \neq p_2$$

Para probar H_0 :

$$\mu(p'_1 - p'_2) = p_1 - p_2 = 0 \quad (11)$$

de donde

$$\sigma(p'_1 - p'_2) = \sqrt{\frac{p_1 q_1}{n_1} + \frac{p_2 q_2}{n_2}} = \sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_2}} \quad (12)$$

Entonces, de (10) :

$$Z = \frac{p'_1 - p'_2}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_2}}} \quad (13)$$

en donde p es desconocida y puede aproximarse con las muestras de las dos poblaciones, esto es:

$$p = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2} \quad (14)$$

en que x_1 , n_1 y x_2 , n_2 son el número de aciertos y el número de observaciones respectivamente para la población 1 y la 2.