

32
24



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Zaragoza

Determinación del Tipo de Interacción Existente entre Celulas
Provenientes de Tumores Humanos Malignos con Leucocitos de
Sangre Periferica y la Función del Linfocito t y Monocito en
este Mecanismo de Reconocimiento.

T E S I S

Que para obtener el título de
B I O L O G O
p r e s e n t a

ROSALVA RANGEL CORONA

1 9 8 6



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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

INTRODUCCION

Cultivo de tejidos.....	1
Ciclo y Diferenciación Celular.....	4
Cáncer.....	8
Inmunología.....	12
METODOLOGIA.....	23
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	53
CONCLUSIONES.....	62
APENDICES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	70

R E S U M E N

Se sabe que existen células mononucleadas aún no plenamente identificadas, que tienen la característica de reconocer antígenos sobre la membrana de algunas células tumorales, provocando la respuesta inmune de rechazo. Se piensa que entre las células mononucleadas que participan en este reconocimiento están tanto los monocitos como los linfocitos. Se supone que el monocito tiene la propiedad de reconocer neoantígenos y presentarlo al linfocito, además de lisar directamente a la célula maligna; mientras que el linfocito por su parte, tiene la facultad de inducir la producción de anticuerpos así como la activación de células asesinas.

Por otro lado, existen indicios de que el reconocimiento celular esté directamente relacionado con el tiempo de doblaje IN VITRO que presentan las células malignas.

En este trabajo con la finalidad de determinar si existe una interacción selectiva entre leucocitos mononucleados normales y células procedentes de diferentes tumores humanos, así como para identificar el tipo de célula participante en dicha interacción, se co-cultivaron células de 6 sarcomas y 9 carcinomas con leucocitos de sangre periférica de donadores normales y se evaluó el grado de interacción medido como el porcentaje de células malignas con leucocitos adheridos.

Al comparar el tiempo de saturación IN VITRO con el porcentaje de interacción se encontró una relación directa entre ellos. En esta interacción el número de células adherentes se incrementaba conforme aumentaba el tiempo de saturación; además, al comparar los datos clínicos correspondientes al tiempo de evolución del tumor, se encontró que mientras este era mayor, el tiempo de saturación fue menor.

Se identificó que más del 70% de las células que interaccionaban eran linfocitos T y que la presencia del monocito no era absolutamente necesaria para que dicha interacción se llevase a cabo. Por otra parte, se detectó la presencia de linfocinas en los medios de co-cultivo capaces de mitogenizar y diferenciar linfocitos.

Finalmente se discute la posible aplicación diagnóstica del ensayo de interacción IN VITRO descrito aquí, al tomar en consideración que mientras menor sea la velocidad de proliferación, probablemente sea menor la malignidad del tumor.

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

CULTIVO DE TEJIDOS:

En la actualidad el desarrollo y perfeccionamiento de la técnica de cultivo IN VITRO ha permitido mantener órganos, tejidos y células aisladas del organismo animal, asimismo esta técnica de cultivo es una herramienta útil, que permite realizar estudios encaminados a un mejor entendimiento de los procesos celulares básicos. El principal problema al que se enfrentaron los primeros investigadores en este campo, fué el encontrar medios de cultivo que contuvieran los elementos indispensables para que las células pudieran desarrollarse adecuadamente fuera del organismo.

Con este propósito, se realizaron una serie de experimentos, como lo demuestran los trabajos de Roux 1885, que mantuvo placa neural de pollo en una solución salina caliente (1). En 1907 Harrison cultivo IN VITRO células nerviosas de anfibio utilizando como medio nutritivo plasma sanguíneo (2). Hasta ese momento se utilizaban como medios de cultivo fluidos y extractos de tejidos corporales, los

cuales debido a su complejidad, no permitían observar el efecto de una determinada sustancia sobre el comportamiento de las células, por lo que se les llamó medios nutritivos indefinidos. Esto provocó que se dedicaran mayores esfuerzos en la búsqueda de medios de composición conocida, que permitieran establecer el efecto de las diferentes sustancias sobre las células; de esta manera en 1912 Carrel estudió los promotores (de bajo peso molecular) del crecimiento celular en extractos de embrión de pollo, logrando con ello propagar células nerviosas de anfibio durante 34 años (3).

Sin embargo, no fué sino hasta 1929 que Reaker utilizó medios semidefinidos, que contenían glicina, ácidos nucleicos, glutatión y hemoglobina, suplementados con plasma humano y extractos de embrión de pollo, en los que logró mantener en crecimiento continuo células de sarcomas de ratón (4). Posteriormente, en 1959 Eagle implementó el primer medio mínimo esencial, que como su nombre lo indica contiene los elementos tanto orgánicos como inorgánicos básicos para el crecimiento celular, entre los cuales se encuentran 12 de los 20 aminoácidos esenciales (5). Después de este medio, se desarrollaron otros diferentes, con el propósito de obtener condiciones óptimas de crecimiento para líneas celulares específicas, entre los que se encuentran, el medio de McCoy 5A usado como medio estándar para el clonado celular (6) y el medio de Ham F10 elaborado especialmente para el clonado de células de ovario de

hamster (7). Cabe aclarar que la mayoría de los investigadores actualmente suplementan estos medios con suero, ya sea de caballo, humano o fetal de bovino, los cuales contienen promotores del crecimiento tales como hormonas y proteínas.

De esta manera, la técnica de cultivo de tejidos ha permitido el mantenimiento IN VITRO de células malignas, lo cual es una herramienta para el estudio de procesos biológicos (8). La primera línea celular proveniente de un tumor maligno, fué denominada HeLa obtenida en 1951 (9), y que ha sido mantenida hasta la fecha. Posteriormente, se crearon líneas de sarcomas y carcinomas (10), siendo las primeras menos numerosas que las de carcinoma, debido a la menor incidencia de los sarcomas en el humano (11).

A la par del desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos, se establecieron las condiciones físicas óptimas para el crecimiento celular, imitando lo más posible las que se presentan en el organismo de los mamíferos. En general, se emplea una temperatura de 37 °C y una composición atmosférica de 5 a 10% de bióxido de carbono en el aire, la cual junto con el bicarbonato del medio de cultivo permite mantener un pH entre 6.8 - 7.2, y para evitar la evaporación en los cultivos se utiliza un ambiente húmedo saturante a punto de rocío (12).

CICLO Y DIFERENCIACION CELULAR:

La proliferación celular está dada por la duplicación de todos los elementos estructurales y capacidades funcionales de la célula. Actualmente, la investigación sobre ciclo celular se centra en comprender como estos complejos y distintos componentes de la proliferación están relacionados entre si en una forma única, integrando un patrón dentro del ciclo celular y como esto lleva a la división celular. El entendimiento de como las células pasan a través del ciclo, puede permitirnos descubrir como su interrupción da la regulación de la proliferación celular.

Los dos procesos más sobresalientes, fácilmente identificables son, la replicación del ADN y la división celular. Estas dos etapas permiten que el ciclo sea dividido en cuatro periodos sucesivos: G1, S, G2 y M.

El conocimiento de los periodos S y M es aún bastante incompleto, sin embargo los periodos G1 y G2 son de los que se tiene mayor conocimiento, aunque no se sabe con precisión los eventos específicos de cada uno de ellos (13).

El periodo G1 está dado por una serie de eventos que conducen a la replicación del ADN, así como a la regulación

del ciclo celular, en esta fase las células presentan un número haploide de cromosomas, así mismo se da una importante síntesis protéica y crecimiento celular. La fase S se caracteriza por ser el período durante el cual se lleva a cabo la duplicación del material genético, siendo muy baja la tasa de síntesis protéica. El período G2 presenta una serie de eventos moleculares que conducen a la división celular, en este momento la célula presenta un juego diploide de cromosomas. La fase M comienza con la espiralización de la cromatina integrando los cromosomas; para su estudio se divide en cuatro etapas denominadas profase, metafase, anafase y telofase, finalizando esta etapa con la citocinesis formándose dos células (14).

De acuerdo con estudios realizados en células humanas provenientes de adultos, se ha observado que la duración del ciclo completo varía de 18 a 24 hrs, en donde el tiempo para cada fase es aproximadamente de: 8 hrs para G1, 6 hrs para la duplicación del ADN (S), la G2 tomó alrededor de 4-5 hrs y la mitosis (M) 1 hr. Asimismo, ha sido encontrado que existen variaciones en cuanto a la duración del ciclo celular, dependiendo del tipo de célula en estudio y que la disminución o aumento en la duración del ciclo se encuentra asociado a la fase G1 (15).

Dentro del ciclo celular también ocurre la diferenciación, que según De Robertis, es el proceso mediante el cual se adquieren diferencias estables entre las células de un

organismo (16). El proceso de diferenciación en animales se da a partir de la gastrulación, etapa embrionaria en la que se constituyen las tres hojas germinales, de las cuales se forman los diferentes tejidos y órganos. Sin embargo, persisten células indiferenciadas también llamadas precursoras, que continúan su reproducción de tal manera que la población de células diferenciadas es renovada constantemente (17). Ahora bien, se han establecido diversas teorías para explicar el fenómeno de la diferenciación celular, en donde se indica que esta es producto de la transcripción secuencial de diversas partes del genoma al interactuar con determinados componentes del citoplasma (18).

Asimismo, se han desarrollado otros modelos para explicar el fenómeno de diferenciación, como el propuesto por Lopashov (1977), donde establece que esta es debida a la presencia de factores extrínsecos de programación, entre los que destacan la influencia de células colindantes e influencias humorales, que al actuar sobre factores propios de la célula (los cuales mantienen la estabilidad fenotípica), provocan el cambio del fenotipo (19). Además, este autor indica que para mantener el estado diferenciado deben existir ciertas barreras localizadas en el citoplasma, que impidan el acceso de nuevos factores de programación hacia el núcleo. Como se puede apreciar, se considera que el fenotipo de las células no es resultado de la programación secuencial del genoma durante el desarrollo,

sino que depende de la naturaleza de las estructuras celulares que regulan la división, el movimiento y reconocimiento de células, los cuales conducen a la formación de órganos y tejidos.

Debido a que la membrana citoplásmica es el principal componente de la célula en su interacción con el medio externo, se ha considerado que esta sea la responsable de la regulación de los eventos de diferenciación (20), y que los procesos de proliferación, movimiento y reconocimiento celular, sean coordinados por un ensamblaje de moléculas de membrana interactuando entre sí (receptores de membrana y estructuras fibrilares submembranales). Por otro lado, las glicoproteínas específicas en la superficie celular parecen desempeñar un papel importante en los cambios relacionados con la modulación celular (receptores de superficie para hormonas, anticuerpos, etc.). Se considera que el sistema de control transmembranal se encuentra en la membrana plasmática, con una estructura fluida sobre la que los receptores de superficie se pueden mover. Esta hipótesis sugiere que el reconocimiento y proliferación celular, estén regulados en gran parte por alteraciones epigénicas en la estructura de receptores de superficie, así como por cambios en su movilidad y distribución que conducen a modificaciones de las estructuras citoplásmicas con las que están asociadas (21).

Además, se supone que si la proliferación celular

dependiera de una regulación externa sobre receptores membranales, entonces una alteración en la estructura de estos o un bloqueo en su capacidad de reconocimiento podría ser la causa de una proliferación descontrolada. Según esta teoría los procesos malignos estarían asociados a alteraciones membranales y no a cambios que involucren al genoma celular directamente (20).

CANCER

Según Robbins una neoplasia es una neoformación constituida por acumulaciones anormales de células, cuyo crecimiento excede al de los tejidos normales y que es autónomo (22). Las neoplasias se dividen en benignas y malignas, llamándose a estas últimas cáncer. En la actualidad, cáncer es el término empleado para designar la transformación maligna de una o varias células (23,24).

Las neoplasias benignas se caracterizan por poseer una morfología parecida al tejido de origen, con células bien diferenciadas y crecimiento lento. En ellas casi no se observan figuras mitóticas y las que se llegan a ver son normales, su crecimiento es en forma de masas localizadas y expansibles rodeadas de una membrana fibrosa llamada

cápsula. Cabe mencionar que en este tipo de tumores no sólo se presentan las células neoplásicas, sino que en algunas ocasiones también aparecen células fibroblásticas que proliferan por un fenómeno de tipo inflamatorio (25,26).

Las neoplasias malignas, presentan comunmente células indiferenciadas con un alto porcentaje de mitosis y no presentan encapsulación, se caracterizan por un crecimiento infiltrativo que destruye por invasividad los tejidos vecinos y con el tiempo puede originar el establecimiento de colonias en partes distantes del lugar de origen, a lo que se le conoce como metástasis, o crecimiento tumoral secundario (27). Esta capacidad es conferida por las alteraciones en los mecanismos de proliferación, que les permite reproducirse indefinidamente en condiciones adversas. El fenómeno de la metástasis causa en la mayoría de los casos la muerte del organismo, aunque también debemos tomar en cuenta la localización de las neoplasias, ya que puede suceder que una neoplasia benigna cause la muerte del organismo por su localización u obstrucción de un órgano vital (22,24).

Entre otras características que presentan las células cancerosas se encuentran: el escape a los mecanismos de regulación del organismo, el aumento en el potencial de crecimiento, alteración de la membrana celular, en donde aparecen nuevos antígenos, aparición de anomalías cariotípicas, así como transformaciones morfológicas y

bioquímicas (22).

No todas las características antes mencionadas se encuentran en este tipo de células transformadas. Además estas alteraciones se pueden encontrar en forma muy sutil, de tal manera que las células pueden tener gran semejanza con las del tejido normal, o la modificación puede ser muy grande y en tal caso se pierde toda semejanza y exhiben en la mayoría de los casos una morfología común cuyas principales características son: pleomorfismo celular y nuclear, núcleo picnótico por gran acumulación de cromatina y presencia de células gigantes multinucleadas (22).

Debemos mencionar, que las propiedades alteradas de una población de células cancerosas pueden cambiar con el tiempo y dar lugar a diferentes estadios en el desarrollo del tumor (evolución neoplásica) (26), y que además la mayor parte de las células malignas poco diferenciadas actúan sólo como fábricas ingobernadas de sustancias celulares, debido a que no tienen función especializada. Por otra parte, la transformación de una célula, no implica necesariamente el posterior desarrollo de un tumor canceroso, ya que no toda alteración celular de origen a una célula maligna (28).

A pesar del intenso estudio realizado sobre las células cancerosas, no se sabe que las impulse a proliferar sin control. Las teorías más aceptadas para explicar el

mecanismo de la transformación maligna son 2: la teoría de la supresión de la retroalimentación y la teoría de la alteración genética; la primera se refiere a la pérdida de la facultad de la célula para la regulación de sus funciones normales y la segunda expone que los agentes carcinogénicos provocan la modificación del genoma (22,26,29).

La diferenciación de las células cancerosas suele ser índice de su nivel de malignidad y grado de proliferación. En general, cuanto mayor sea la diferenciación, más lentamente crecerá la neoplasia y a la inversa, poca diferenciación se acompaña de crecimiento rápido. Se piensa que estas propiedades están relacionadas con la respuesta defensiva del organismo, puesto que se postula que mientras más lento crece un tumor, mayor es dicha respuesta (30).

INMUNOLOGIA

La inmunología estudia los fenómenos, las técnicas y las enfermedades relacionadas con las reacciones antígeno-anticuerpo-complemento. Los métodos empleados en el estudio de la inmunología están basados esencialmente en la observación de la respuesta que ocurre al combinarse un antígeno con los anticuerpos producidos en un organismo viviente, o en cultivo de células. De acuerdo a las investigaciones realizadas, se sabe que el sistema inmunitario es extremadamente complejo y tiene una gran diversidad de actividades para mantener la homeostasis y por tanto la salud. La protección inmune es dada por un sistema celular y humoral que defiende al organismo en contra de invasores, ambos sistemas están adaptados y responden específicamente hacia distintos cuerpos extraños. Además, lo esencial del sistema inmune es su capacidad para reconocer la superficie de moléculas que no son constituyentes normales del organismo.

Debido a la carencia de métodos cuantitativos precisos, hace algunos años los conocimientos acerca de los mecanismos detallados de la inmunidad celular eran escasos. Sin embargo, con la introducción de nuevas técnicas, muchos campos de investigación sobre la inmunología celular han recibido gran impulso, entre ellos cabe destacar los estudios

básicos relacionados con la función de los linfocitos, lo cual ha coadyuvado para aclarar su papel biológico en procesos como trasplantes, tolerancia e inmunidad tumoral (28).

Los principales componentes celulares del sistema inmunitario son los macrófagos y los linfocitos (28). Los macrófagos son fagocitos mononucleados que derivan de los monocitos de la médula ósea y desempeñan actividad importante en la inmunidad celular. Entre sus principales propiedades funcionales están: la quimiotaxis, el reconocimiento de partículas extrañas, la ingestión de estas por mecanismos de pinocitosis (de partículas en suspensión) y fagocitosis (de partículas mayores de 0.1 μ m). Además tienen la capacidad de fijar tanto antígenos como los complejos antígeno-anticuerpo y presentarlos a células linfocíticas (28,31,32). Los linfocitos son células mononucleadas provenientes de precursores en la médula ósea y que también desempeñan un papel muy importante en la respuesta inmune. Entre sus funciones más importantes están la citotoxicidad hacia células extrañas y síntesis de anticuerpos. Las funciones de los macrófagos y los linfocitos en ocasiones se encuentran interrelacionadas, como en la fabricación por parte de los macrófagos de sustancias mitogénicas que afectan a los linfocitos y la presentación de antígenos procesados por macrófagos a estos.

El sistema linfoide consta de dos poblaciones de células morfológicamente indistinguibles, los linfocitos T dependientes del timo y los linfocitos B derivados de médula ósea. Cada linfocito en las 2 poblaciones es capacitado para reconocer y responder a una sustancia extraña relacionada. Durante una respuesta inmune, estas células primero deben proliferar y diferenciarse antes que ellas o sus productos sean capaces de eliminar elementos no propios. Los linfocitos B, son los responsables de la respuesta humoral! Cuando se activan por el reconocimiento de sustancias extrañas, se diferencian a células plasmáticas que producen anticuerpos. Se caracterizan por ser los productores de inmunoglobulinas, que son glucoproteínas que funcionan como anticuerpos, estas son fácilmente identificables sobre la superficie de la célula contra la que van dirigidos. Los anticuerpos reconocen y unen a antígenos por moléculas complementarias, las cuales permiten múltiples interacciones no covalentes semejantes a las que confieren especificidad sobre uniones enzima-sustrato (40).

Los linfocitos T participan en diversas reacciones mediadas por células y forman parte de una población heterogénea de células con funciones diferentes. Ante la presencia de sustancias extrañas que alteran la superficie de las células del huésped una subpoblación de células T capaces de detectar estas diferencias, son activadas e inician reacciones que van encaminadas a eliminar a las células alteradas. El papel de las células T en el

rechazo de tumores fué deducido originalmente de los estudios sobre trasplantes de crecimientos tumorales que mostraron que la respuesta de rechazo era abolida en animales carentes de células T. Al parecer estas células tienen receptores de superficie para los fragmentos Fc, de la IgG, IgM (inmunoglobulinas) y posiblemente de la IgA. La presencia de receptores para Fc se ha demostrado por la formación de rosetas con eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos purificados de IgM o de IgG. Además, de la técnica de rosetas, existe la microscopía inmunofluorescente y la autorradiografía, que nos permiten diferenciar y clasificar las subpoblaciones de las células T (28).

La población de linfocitos T produce distintos tipos de células efectoras con diferentes funciones. Una de ellas son las citotóxicas o células T asesinas que eliminan directamente células extrañas. Estas células son muy importantes en la respuesta inmune a los tumores, ya que interviene en el reconocimiento y lisis de células aberrantes. Otras células son responsables de la demora de hipersensibilidad, otras más son células auxiliares de la diferenciación y proliferación de células B, y otras son células amplificadoras de la diferenciación y proliferación de las T asesinas y las células T supresoras (31).

Debemos mencionar la existencia de una subpoblación de

células llamadas asesinas naturales (NK del inglés; natural killer) que tienen una función muy importante en el rechazo de células tumorales. Las NK fueron descubiertas a raíz de experimentos en los que se usaba sangre periférica de individuos normales para cultivos IN VITRO con células tumorales, observándose que existían en la sangre normal linfocitos capaces de eliminar células malignas (31). Estudios recientes sugieren que las NK, tanto en el ratón como en el hombre, pueden ser del grupo de linfocitos T, ya que se ha demostrado que estas células tienen afinidad por los eritrocitos de carnero y en condiciones óptimas pueden formar rosetas con ellos, al igual que los linfocitos T. Además, la morfología que presentan las NK es parecida a la de los grandes linfocitos granulares (34), aunque algunos autores consideran que estas células son en realidad los efectores de las NK (35). Sin embargo, a la fecha no existe un consenso sobre el origen de estas células llegando hasta pensarse que son células mielomonocíticas inmaduras (36).

La variabilidad de la respuesta encontrada en diferentes experimentos con células NK en su susceptibilidad hacia anticuerpos específicos, dirigidos contra diferentes antígenos de superficie de estas células, han sugerido la idea de que las NK pueden diferir unas de otras por el estado de diferenciación en que se encuentran, lo cual evidentemente influye en su actividad. Por otro lado, la baja funcionalidad en algunos tejidos linfoides ha sido

atribuida a la ausencia de estas células (37). Hasta ahora, las células NK parecen ser un tipo celular relativamente heterogéneo con marcadores de superficie diferentes de los linfocitos B y T, granulocitos y monocitos, pero existen indicios de que puedan ser un subgrupo de las células T (36).

Por otra parte, el grupo de linfocitos T presenta una gran cantidad de subgrupos que tienen funciones muy variadas, como por ejemplo se tiene a las células T auxiliares (TA) que ayudan a la proliferación de las células citotóxicas, las que provocan la maduración de las células plasmáticas (TMP), las que madura a las células supresoras (TMS), las que tienen la propiedad de lisar células (TLC), aquellas que reclutan y ayudan a los macrófagos a cerrar el sitio de infección, las que suprimen el desarrollo de la respuesta inmune, y las NK entre otras (31).

La regulación de las funciones antes mencionadas es mediada por moléculas denominadas interleucinas, que son secreciones solubles provenientes de diversas células sanguíneas que afectan el comportamiento de una gran variedad de células, incluyendo linfocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, timocitos, células de la médula ósea, fibroblastos, osteoclastos y células endoteliales. En otras palabras, las interleucinas son mensajeras intracelulares que regulan tanto la

interacción entre células linfoides, y no linfoides, así como entre ambos tipos celulares. La actividad de los linfocitos que han sido estimulados por la interacción de agentes extraños con los receptores de la membrana linfocítica, provoca la secreción de productos solubles llamados linfocinas (que forman parte de las interleucinas), las cuales no se almacenan pero son activamente sintetizadas y secretadas durante la respuesta inmune. Su descubrimiento siguió de experimentos realizados en 1962 por George y Vaughan (38), en los cuales se observó que la inhibición de la migración de células mononucleadas (macrófagos) en animales inmunizados, era debida a la presencia de antígenos, demostrándose que el efecto inhibitor requiere la presencia simultánea de antígenos y de linfocitos sensibilizados. En la actualidad este efecto se ha mostrado por la prueba de la tuberculosis, en la cual al inocular este antígeno en la piel de animales previamente inmunizados, se ha observado que los macrófagos permanecen en el sitio de la inflamación por acción del factor inhibitor de la migración (FIM) (33).

En general, las linfocinas son glicoproteínas de peso molecular variado, que modulan la actividad de las células que participan en el proceso inmune, y no exhiben analogía con las moléculas de inmunoglobulinas. Tanto los linfocitos de la sangre periférica, de los nódulos linfáticos, del bazo, y de los ductos torácicos pueden ser estimulados a producir linfocinas (39).

En cultivos IN VITRO se puede lograr hacer interaccionar linfocitos, macrófagos e interleucinas de tal forma que se reproduzcan casi todos los procesos que constituyen la respuesta inmune. Algunas linfocinas IN VITRO amplifican este tipo de reacciones inmunológicas, entre estas, cabe destacar la inducción tanto a la proliferación de otro grupo de linfocitos como a la formación de células T asesinas (31,40,41). Hasta ahora una de las linfocinas más estudiadas es la estimuladora de la proliferación de timocitos, producida por linfocitos T al ser activados por productos de monocitos, llamada interleucina 2 (IL-2) (41). Esta molécula tiene además las funciones de inducir a la proliferación de linfocitos B, la de producción de anticuerpos de células B, e inducir a linfocitos citotóxicos a desencadenar una serie de reacciones que lisan específicamente células tumorales (42). También existe un factor mitogénico de timocitos producido por monocitos llamado interleucina 1 (IL-1) (43,44), que comparte con la IL-2 la propiedad de activar a células T auxiliares (TA) (45,46,47).

Siendo que existe un sistema inmune altamente complejo y eficiente cuya función es la de proteger la homeostasis del organismo, nos surge la pregunta de porqué en estas condiciones se llega a desarrollar un cáncer? Con el fin de explicar este fracaso de la inmunidad en el huésped portador de tumores, se han propuesto varias hipótesis,

incluyendo la posible existencia de una respuesta inmune deficiente y la presencia de factores bloqueadores que interfieren con los procesos de regulación normales. La hipótesis de inmunidad tumoral deficiente establece que los tumores débilmente antigénicos pueden seguir desarrollándose ante la respuesta inmunitaria, ya sea por que estos tumores inhiben al sistema inmune, o por que lo emplean para facilitar su crecimiento (28). La hipótesis de interferencia por factores bloqueadores en el huésped, presupone la existencia de sustancias circulantes, que parten del tumor hacia los fluidos corporales llegando a los lugares de reconocimiento antigénico impidiendo el reconocimiento y ataque de la célula tumoral (48,49,50).

A pesar de que existen tumores que escapan al control del sistema inmune, se tiene una gran cantidad de datos que indican que este sistema está activamente eliminando células transformadas. El estudio de las características inmunogénicas que presentan las células malignas, se han efectuado en base a modelos tanto IN VIVO como IN VITRO, donde se ha identificado la existencia de neoantígenos de membrana característicos de cada célula tumoral (28,49). En base a esto se llegó a establecer que existía una capacidad de las células inmunocompetentes del mismo paciente, para reconocer y destruir a sus células malignas, demostrándose que las células tumorales son atacadas y lisadas a través de mecanismos tanto humorales como

celulares (42,51).

El mecanismo de lisis humoral se lleva a cabo por medio de la secreción de anticuerpos específicos producidos por linfocitos B, que al enlazarse con los neoantígenos de las células malignas permiten la lisis de estas por parte del sistema del complemento. Por otro lado, el mecanismo celular para la destrucción de células tumorales, está dado ya sea por el ataque de los linfocitos T capaces de reconocer los neoantígenos de membrana, o por citotoxicidad anticuerpo dependiente de los precursores de linfocitos B, o por la acción de las células NK en base a un patrón indiscriminativo y desconocido, o finalmente por la lisis por parte de los macrófagos, los cuales en su superficie poseen anticuerpos específicos (28). Una de las aplicaciones importantes del descubrimiento de los neoantígenos asociados a las células malignas y del conocimiento de los mecanismos por medio de los cuales las células inmunocompetentes detectan y destruyen a las células tumorales, dió origen a la inmunoterapia.

Aunque los trabajos realizados en cultivo de tejidos han proporcionado información acerca de las características morfológicas, fisiológicas, inmunológicas y bioquímicas de las células malignas, aun no se entiende suficientemente la razón por la cual estas han perdido su comportamiento normal. El campo de la inmunología es donde más se ha investigado la razón de la falla del organismo en el

rechazo de la proliferación de células malignas, abriendo una nueva área llamada Inmunología Tumoral.

Recientemente se ha encontrado que existe una relación directa entre el grado de interacción IN VITRO de células provenientes de sarcomas, con leucocitos obtenidos del torrente sanguíneo de donadores normales y el tiempo de doblaje (tiempo de duplicación celular) que presentan estas (52). Además como se mencionó anteriormente, se sabe que existe una célula mononucleada aún no plenamente identificada, que tiene la propiedad de reconocer antígenos sobre la membrana de la célula tumoral, para desencadenar la respuesta inmune de rechazo.

Teniendo como antecedente lo antes expuesto, en este trabajo se cultivaron células provenientes de sarcomas y carcinomas humanos en presencia de leucocitos de sangre periférica humana, con la finalidad de determinar si al igual que con los sarcomas, al emplear carcinomas se encontraba una relación entre el grado de interacción y la cinética de proliferación, así como para tratar de identificar el tipo de célula mononucleada que interviene en dicha interacción.

M E T O D O L O G I A

En este trabajo se utilizaron explantes provenientes de 6 sarcomas y 9 carcinomas, así como una línea de fibroblastos normales provenientes de piel humana y células epiteliales normales.

CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS LINEAS CELULARES.

Las células se colocaron en platos de cultivo (Lux Scientific U.S.A.) de 60 x 15 mm agregando 5 ml de medio de cultivo (m.c.), el cual se preparó con 80% de medio de Eagle (Microlab, Mexico) (Apéndice 1) suplementado con 20% de suero fetal de bovino (Gibco, U.S.A.) previamente desactivado (Apéndice 2) y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5 a 10% de bióxido de carbono en un ambiente húmedo saturado (12). Los cajas que contenían las células se observaron cada tercer día, usando el microscopio invertido y en el momento en que se percibió que las células habían saturado la superficie del cultivo se procedió a subcultivar las células de la forma que a continuación se describe.

El m.c. en que se encontraban las células se desecho del

plato y se agregaron 2 ml de verseno (Apéndice 3) lavando suavemente, con el fin de quitar desechos celulares, residuos de proteínas y cargas divalentes, posteriormente el verseno se desechó y se adicionaron 2 ml de una solución de tripsina al 0.025% (en verseno) a un pH 7.7 (Apéndice 4) y se incuban a 37 °C por 5 min. Después de la incubación, la solución conteniendo a las células se centrifugó a 500g durante 5 min, al término de este tiempo, la tripsina se desechó y el botón celular se resuspendió en una pequeña cantidad de m.c. y se colocaron aproximadamente 300 000 células por plato de cultivo agregando la cantidad de m.c. necesaria para completar 5 ml y se procedió a incubarlas (53).

Cabe aclarar que la tripsinización para cada línea celular varió de acuerdo al tiempo de saturación para cada una de ellas y que este oscila entre 4 - 15 días.

Por otro lado, se sabe que las resiembras que soportan los subcultivos no deben exceder de 50, ya que las células tienden a transformar sus características por el tiempo de cultivo (54).

Con el propósito de tener células disponibles para los experimentos que se realizaron, se empleó la técnica de criopreservación, en la que cultivos en fase de proliferación exponencial se tripsinizaron y las células que se obtuvieron fueron resuspendidas en una solución compuesta

por 80% de m.c. suplementado al 10% con suero fetal de bovino (desactivado) y 10% de dimetil sulfóxido. Inmediatamente después se repartieron alícuotas de 1 ml de la solución celular en ampolletas de 1 ml (costar U.S.A.). Las ampolletas correctamente cerradas y etiquetadas se colocaron en congelación a -70°C por 24 hrs, posteriormente se trasladaron a nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C , en donde pueden permanecer por varios años. Las células que se colocan en criopreservación (para tener una reserva de ellas) no deben de exceder del quinto subcultivo (después de obtener la línea celular), para asegurar así que las células no sufran transformaciones provocadas por el cultivo prolongado.

Para disponer de las células que se encuentran en criopreservación; se tomó una ampolleta del nitrógeno líquido, la cual se colocó en un baño a 37°C hasta que el contenido paso a estado líquido, en seguida la ampolleta se centrifugó a 500g durante 5 min, el sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en m.c. y se colocó en 2 platos de cultivo (55,56).

OBTENCION DE LEUCOCITOS MONONUCLEADOS DE SANGRE PERIFERICA

Bajo condiciones estériles se obtuvieron de 5 a 15 ml de sangre periférica de donadores normales, con una jeringa que

contuviera de 0.1 - 0.5 ml de heparina (Rikercab/NC B U.S.A.) a 1,000 U.I./ml. Posteriormente, la sangre se virtió en tubos de ensaye (colocando en cada tubo 5 ml de sangre) mezclándose con cantidades iguales de solución salina amortiguadora (Apéndice 5), suplementada con glucosa al 0.1% y un pH de 7.4. Una vez que la solución se mezcló perfectamente, se separó en tubos de ensaye conteniendo 2 ml de ficoll-paque (Ficoll 400 Finechemical Suécia) (Apéndice 6), con una densidad de 1.077 gr/ml, a cada tubo se le agregó 5 ml de la mezcla de sangre, lo cual debe hacerse con mucho cuidado, resbalando por la pared del tubo y centrifugando a 400g durante 30 min. Después de transcurrido este tiempo, la banda blanca de células mononucleadas que se forma entre los eritrocitos y el plasma, se extrajo cuidadosamente lavándose 3 veces con solución salina amortiguadora, en el último lavado se reunieron las células en un solo tubo y se dió un lavado final a todas las células. El sobrenadante se desechó colocando 2 ml de m.c. para resuspender el boton celular, contando las células en un hemocitómetro Neubauer (American Optical U.S.A.) (54). Para la identificación de las células mononucleadas estas se tiñeron utilizando la técnica May-Greenwald Giemsa.

CO-CULTIVO DE LAS CELULAS MONONUCLEADAS CON LAS DIFERENTES LINEAS CELULARES.

Para la obtención de células (de las diferentes líneas celulares) en co-cultivo con linfocitos de sangre periférica se llevó a cabo el siguiente método: Se hicieron subcultivos con 25 000 células por plato de cultivo de 35 x 15 mm (Costar U.S.A.), los cuales se mantuvieron 3 días en incubación. Transcurrido este tiempo, se agregó a cada plato 1×10^4 células mononucleadas de sangre periférica y se dejaron en incubación por 24 hrs o 10 días dependiendo del experimento.

La forma en que se evaluó la interacción de los leucocitos con las células de las diferentes líneas celulares, fué como a continuación se describe: después de 24 hrs de iniciado el co-cultivo, los platos se lavaron 3 veces con PBS sin calcio ni magnesio (Apéndice 7) y se tiñeron usando la técnica May-greenwald-Giemsa. El grado de interacción entre las células mononucleadas y las células de las líneas celulares se midió de acuerdo al número de linfocitos adheridos a cada célula. Para lo cual se consideró como una interacción débil cuando se encontraron de 1 a 3 células linfoides, fuerte cuando se hallaron de 4 a 15, y muy fuerte con más de 15 linfocitos adheridos.

Asimismo, se utilizaron medios condicionados de las líneas celulares, colocándo estos en platos de cultivo 35 x 15 mm, en los que se colocaron 1×10^4 células mononucleadas por plato dejándolas incubar por 10 días, después de esto, se tiñeron las células en suspensión usando la técnica May-Greenwald-Giemsa.

IDENTIFICACION DE LINFOCITOS B Y T.

Para la identificación de linfocitos T se empleó la tinción histoquímica de pararrosanilina que consiste en lo siguiente: Se preparó un frótis de células en porta objetos (etiquetados) y se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente se fijaron en formol cálcico (BeaKer) (Apéndice B) pH 6.7 a 4°C por 10 min y se lavaron con agua destilada a temperatura ambiente por 20 min. Después de esto se incubaron en un medio que contenía 40 ml de amortiguador de fosfatos pH 5.0, 0.067 ml y 2.4 ml de pararrosanilina diozoxotizada (Apéndice 9) más 10 mg de -naftil acetato en 4 ml de acetona, la mezcla se ajustó a un pH de 5.8 usando NaOH 1N. La incubación se hizo a temperatura ambiente durante 21 hrs en obscuridad. Transcurrido este tiempo se lavaron en agua destilada por 40 min, posteriormente se contratiñeron en una solución acuosa al 1 % de azul de toluidina por 60 min, finalmente se cuantificaron como linfocitos positivos,

aquellos en los que aparecían en su citoplasma manchas de color café-rojizo. Las células B pueden diferenciarse de las T por que las primeras presentan un color azul en su citoplasma y núcleo.

Otra tinción histoquímica empleada fué la denominada fosfatasa ácida para linfocitos T (Apéndice 10). Para la cual se preparó un frótis de células en un porta objetos (etiquetado) y se dejaron secar a temperatura ambiente, en seguida fueron colocados durante 30 seg en una solución de citrato-acetona, se enjuagaron con agua destilada y dejaron secar al aire. Posteriormente fueron incubados a 37 °C en obscuridad durante 1 hr en una solución de Nafftol AS-BI (Sigma Chemical Co. U.S.A.), finalmente se enjuagaron las preparaciones con agua destilada y teñidas con hematoxilina ácida de Mayer por 5 min. Los linfocitos T se pueden diferenciar por que en ellos se observarán granulos de color marrón. Todos los experimentos realizados en este trabajo, se repitieron un mínimo de dos veces y siempre por duplicado. Los medios y soluciones utilizados para el cultivo y subcultivo de las células fueron previamente calentados a 37° C en un baño de agua.

La esterilización de las soluciones utilizadas se realizó por medio de filtros (Milipore, tipo GS, U.S.A.) de membrana con diámetro de poro de 0.22 μ .

Los reactivos utilizados, a menos que así se indique, fueron del grado reactivo Q.P. de J.T. Beaker, México. El material de cristalería fue Pyrex.

R E S U L T A D O S

INTERACCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA NORMAL
CON FIBROBLASTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUERO FETAL
DE BOVINO EN EL MEDIO DE CULTIVO.

Se sembraron 2.5×10^4 células en presencia de medio de cultivo conteniendo 0.5, 5 o 20% de suero fetal de bovino, con la finalidad de obtener diferentes cinéticas de proliferación en cada concentración.

La evaluación de las cinéticas de proliferación se llevó a cabo por medio de conteos cada 72 hrs (figura 1), obteniéndose a partir de estas, los tiempos de doblaje. Se encontró que el tiempo de doblaje para los fibroblastos se incrementó a medida que disminuyó la concentración de suero, determinándose tiempos de doblaje de 48, 58 y 72 hrs para las concentraciones de 20, 5 y 0.5% respectivamente.

Simultáneamente a la realización de las cinéticas de proliferación, se efectuó el co-cultivo de los fibroblastos con leucocitos de sangre periférica con las mismas concentraciones de suero. El co-cultivo y su respectiva cinética se llevó a cabo en 5 experimentos con distintos

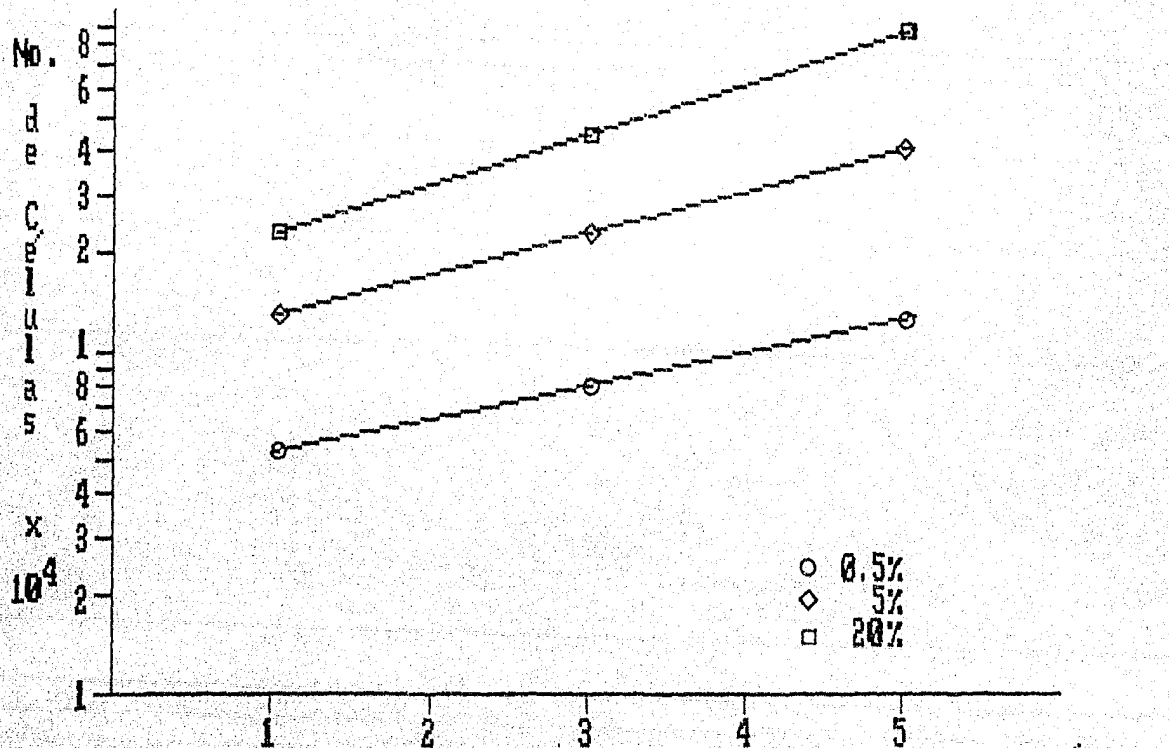


Figura 1.- Curvas de Proliferación de Fibroblastos a Diferentes Concentraciones de Suero Fetal. 32

donadores cada vez. Al realizar la evaluación se encontró que en general el grado de interacción variaba desde muy alto para la concentración de 0.5%, hasta valores bajos para la concentración de 20%, en tanto la concentración de 5% mostró una interacción intermedia (tabla 1). Sin embargo, se observó una gran variación en los resultados de la cinética de proliferación, ya que el tiempo de doblaje para la concentración de 20% de suero fetal, varió desde 48 hasta 192 hrs.

INTERACCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE DONADORES NORMALES CON CELULAS PROVENIENTES DE SARCOMAS Y CARCINOMAS HUMANOS.

En trabajos anteriores se había encontrado que linfocitos y monocitos de sangre periférica, eran capaces de adherirse IN VITRO a células malignas provenientes de sarcomas humanos. Se encontró asimismo, que esta interacción aumentaba mientras el tiempo de doblaje de las células blanco disminuía. Consideramos que de existir alguna relación entre el grado de interacción de leucocitos mononucleados con células malignas, así como entre los datos clínicos e histopatológicos, se podría disponer de una herramienta más en el diagnóstico y posterior tratamiento de pacientes con tumores malignos. Con esta finalidad, en el presente trabajo se cultivaron biopsias procedentes de 6 sarcomas y 9

Concentración de suero fetal de bovino (%)	Tiempo de doblaje (hrs)	Tipo de Interacción (%)	
		Débil	Fuerte
0.5	72	50	5
5.0	58	35	4
20.0	48	26	3

TABLA 1 .- INTERACCION DE FIBROBLASTOS CON LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUERO FETAL DE BOVINO.

carcinomas humanos realizándose subcultivos por tres ocasiones para posteriormente proceder a la evaluación del grado de interacción entre estas y leucocitos de sangre periférica humana. Simultáneamente se recopilaron los datos clínicos del expediente de los pacientes procedentes del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional. Por último, para determinar si la interacción con las células procedentes de los tumores humanos, era diferente a la obtenida con células normales en todos los experimentos de interacción, se incluyeron cultivos de células normales de fibroblastos para los sarcomas y epiteliales en el caso de los carcinomas.

De los experimentos realizados, se encontró que en los carcinomas también se presenta interacción con leucocitos de sangre periférica. Al analizar los resultados obtenidos con las células provenientes de los carcinomas (tabla 2), se observó que al igual que con los sarcomas (tabla 3) existían diferentes grados de interacción con leucocitos de sangre periférica. Esta interacción variaba desde muy débil para el carcinoma de tiroides (CTP-2) con solo un 12% de células blanco con escasos leucocitos adheridos, hasta una interacción muy intensa para el carcinoma de labio (CLA-1) en donde hubo casi un 70% de interacción, de la cual el 20% de las células blanco presentaban abundantes leucocitos. En los cultivos con células epiteliales normales (ENO-84) se encontró un grado de interacción mayor que la mostrada para 6 de los 9 carcinomas evaluados con un 45% de interacción de los cuales el 9% era fuerte.

Tipo Celular	Tipo de Interacción (%)	
	Débil	Fuerte
Epiteliales Normales (ENO-84)	36	9
Carcinoma de Tiroides (CTP-2)	12	0
Carcinoma Adenoideo Escamoso (CAE-2)	13	6
Carcinoma Adenoideo Quístico (CAQ-2)	19	1
Carcinoma Mucoepidermoide (CGM-1)	22	1
Carcinoma de Tiroides (CTM-1)	30	1
Carcinoma de Encía (CDE-1)	30	3
Carcinoma Adenoideo Quístico (CAQ-1)	37	14
Carcinoma Adenoideo Escamoso (CAE-1)	41	15
Carcinoma de Labio (CLA-1)	47	20

TABLA 2 .- INTERACCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA CON CELULAS PROVENIENTES DE CARCINOMAS HUMANOS.

Tipo Celular	Tipo de Interacción (%)	
	Débil	Fuerte
Fibroblastos Normales (VC-2)	19	0
Condrosarcoma (COR-2)	12	0
Sarcoma Mulleriano (SAM-4)	25	2
Osteosarcoma (OSX-3)	30	0
Condrosarcoma (COR-1)	38	10
Melanoma (ME-1)	41	3
Rabdomiosarcoma (RAB-84)	47	15

TABLA 3 .- INTERACCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA CON CELULAS PROVENIENTES DE SARCOMAS HUMANOS.

La evaluación de la interacción con las células provenientes de sarcomas también mostró grandes variaciones, presentándose desde interacciones muy débiles en el caso del condrosarcoma (COR-2) con solo 12% de interacciones débiles, hasta muy fuertes como la mostrada por rhabdomyosarcoma (RAB-84) que presentaba un 62% de interacción de las cuales el 15% era con abundantes leucocitos. Para este caso a diferencia de lo observado con las células epiteliales normales, se encontró que los fibroblastos normales tenían una interacción muy baja con solo un 19% de interacción débil.

Al comparar los datos de edad y sexo de los pacientes, así como el tamaño y tiempo de evolución del tumor, además de su diagnóstico histopatológico (tabla 4) con los resultados de interacción, encontramos que tanto para los sarcomas como para los carcinomas hubo una relación muy directa con el tiempo de evolución de los tumores, ya que los pacientes que reportaron los mayores tiempos de evolución entre los sarcomas (30 y 10 meses), resultaron ser los de interacción más débil, mientras que los sarcomas de menor tiempo de evolución (3 y 6 meses) son los que presentaron la mayor interacción. En forma análoga, los carcinomas con mayor tiempo de evolución (24 y 60, meses), fueron los que presentaron menor interacción y por lo general el grado de interacción fue alto para los carcinomas con menor tiempo de evolución. Además, sólo en los sarcomas también se observó una relación directa entre el grado de interacción y la edad

Diagnóstico Histopatológico	Edad y Sexo	Tipo Celular	Tamaño	Evolución
Encía Normal	7 - Masc	ENO-84	1x2	6 meses
Condrosarcoma bien diferenciado	62 - Fem	COR-2	14x18	36 "
Tumor Mesodérmico Mixto Uterino (Mulleriano)	64 - Fem	SAM-4	20x30	10 "
Sarcoma Osteogénico Osteoblástico	16 - Fem	OSX-3	10x10	6 "
Rabdomiosarcoma Embrionario Alveolar.	26 - Fem	RAB-84	20x15	6 "
Condrosarcoma bien diferenciado	52 - Fem	COR-1	18x25	3 "
Melanoma Maligno	52 - Fem	ME -1	8x4	3 "
Ca. Papilar de Tiroides	49 - Fem	CTP-2	6x6	60 "
Ca. Adenoideo Escamoso	45 - Fem	CAE-2	3x3	24 "
Ca. Medular de Tiroides con Permeación Linfática	33 - Fem	CTM-1	5x6	23 "
Ca. Adenoideo Escamoso	41 - Fem	CAE-1	3x2	13 "
Ca. Mucoepidermoide	27 - Fem	CGM-1	2.5x1.5	10 "
Ca. Adenoideo Quístico	29 - Fem	CAQ-2	3x2	8 "
Ca. Epidermoide Invasor	33 - Masc	CLA-1	5x3	8 "
Ca. Adenoideo Quístico	75 - Fem	CAQ-1	4x3	6 "
Ca. Epidermoide de Encía	60 - Fem	CDE-1	5x3	6 "

TABLA 4.- DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES DE QUIENES SE OBTUVIERON BIOPSIAS.

de los pacientes. Los tumores de los pacientes con edades de 52 y 26 años tuvieron interacción bastante fuerte. Por otro lado no se encontró ninguna relación entre la interacción, el tamaño y tipo histológico del tumor.

EVALUCION DE LA PROLIFERACION in vitro DE SARCOMAS Y CARCINOMAS

La evaluación se efectuó por observación directa de la proliferación de los diferentes tipos celulares, tanto de los explantes primarios como de las resiembras celulares, para ello se determinó el tiempo en días en que las células de sarcomas y carcinomas saturaban el sustrato de cultivo (tabla 5,6). Los tiempos de saturación para las células provenientes de sarcomas variaron desde 8 días para fibroblastos normales VC-2, hasta 22 días para el rhabdomiosarcoma RAB-84. Al comparar estos tiempos de saturación, con los resultados obtenidos de la interacción con leucocitos de sangre periférica en el mismo tipo celular, encontramos una relación directa. Para el caso del tiempo de saturación se obtuvo que las células de fibroblastos normales fueron las de menor tiempo de saturación y las de menor interacción con leucocitos aumentando progresivamente en los demás tipos celulares hasta llegar al rhabdomiosarcoma que fue el más lento, con un mayor tiempo de saturación y el de

	Fibro- blastos (UC-2)	Condro- sarcoma (COR-2)	Sarcoma Mulleriano (SAM-4)	Osteo- sarcoma (OSX-3)	Mela- noma (ME-1)	Condro- sarcoma (COR-1)	Rabdo- mio - sarcoma (RAB-84)
Proliferación celular en subcultivos (días)	8	12	10	16	5	18	22
Proliferación celular en explantado primario (días)	8	33	28	ND	5	36	45

TABLA 5 .- EVALUACION DE LA PROLIFERACION EN SARCOMAS.

ND .- No Determinado

	Epiteliales Normales (EN0-84)	Carcinoma de Tiroides (CTP-2)	Carcinoma Adenoideo Escamoso (CAE-2)	Carcinoma Adenoideo Quístico (CAQ-2)	Carcinoma Mucopider- moide (CGM-1)
Proliferación celular en subcultivos (días)	8	ND	8	9	ND
Proliferación celular en explante primario (días)	40	27	21	40	45

TABLA 6 .- EVALUACION DE LA PROLIFERACION EN CARCINOMAS.

	Carcinoma de Tiroides (CTM-1)	Carcinoma de Enca (CDE-1)	Carcinoma Adenoideo Quístico (CAQ-1)	Carcinoma Adenoideo Escamoso (CAE-1)	Carcinoma de Labio (CLA-1)
Proliferación celular en subcultivos (días)	13	12	15	19	27
Proliferación celular en explant primario (días)	28	12	18	19	19

TABLA 6 .- CONTINUACION.

mayor interacción (tabla 3,5) Al tomar en consideración los tiempos de saturación de los explantes primarios de los diferentes sarcomas, encontramos a excepción del melanoma ME-1 (con 5 días) que las células de interacción débil fueron las más rápidas (condrosarcoma COR-2, 33 días) y las más lentas correspondieron a aquellas que presentaron mayor interacción (FAK-84, 45 días).

Por otro lado, observamos que aunque los tiempos de saturación para las células epiteliales y fibroblastos normales fué semejante, la interacción con leucocitos de sangre periférica fué mucho mayor con las células epiteliales. Siendo que ya se había encontrado que existía una relación directa, entre el grado de interacción de las células provenientes de sarcomas con leucocitos de sangre periférica y el tiempo de doblaje de estas, se procedió a determinar la cinética de proliferación tanto de fibroblastos y epiteliales normales, con el fin de encontrar si entre estas existía diferencia importante en su tiempo de doblaje. Se observó un tiempo de doblaje de 33 hrs para los fibroblastos y 69 hrs para las epiteliales normales ENO-84 (figura 2). Estos resultados nos indican una vez más que a menor interacción mayor tiempo de doblaje.

Para el caso de las células provenientes de carcinomas, los tiempos de saturación variaron desde 8 días para las células epiteliales normales (ENO-84) y el carcinoma adenoideo escamoso (CAE-2), hasta 27 días para el carcinoma de lengua

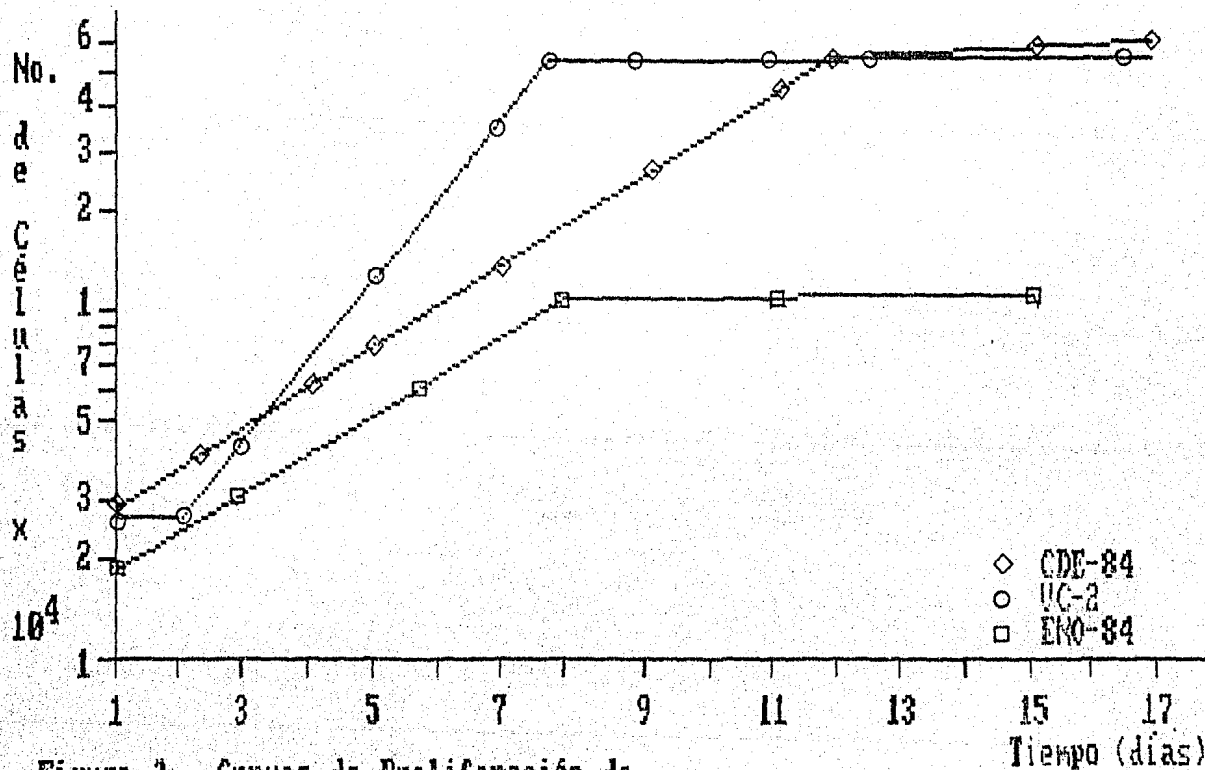


Figura 2.- Curvas de Proliferación de Diferentes Líneas Celulares Cultivadas.

(CLA-1). Al comparar estos resultados con el grado de interacción con leucocitos de sangre periférica para cada tipo celular, nuevamente encontramos una relación directa entre ellos. Obtuvimos para el carcinoma adenoideo escamoso (CAE-2) el menor tiempo de saturación, con una interacción baja, presentando un aumento progresivo en el tiempo de saturación los demás tipos celulares hasta llegar al carcinoma de lengua (CLA-1), que fué el que presentó un mayor tiempo de saturación y también una mayor interacción. Al tomar en consideración los tiempos de saturación de los explantes primarios de los carcinomas (tabla 6), encontramos una gran variación en estos desde 12 días para el carcinoma de encía (CDE-1), hasta de 45 para el carcinoma mucoepidermoide (CGM-1). Para estos casos, no se da una relación directa entre el tiempo de saturación y la interacción de leucocitos de sangre periférica como la encontrada en las células subcultivadas, pues en estos casos al mayor tiempo de saturación, no correspondió la mayor interacción. Considerando que tanto el carcinoma de encía (CDE-1), como las células epiteliales (ENO-84), presentaron un grado de interacción y un tiempo de saturación semejante, se procedió a evaluar sus cinéticas de proliferación, encontrando un tiempo de doblaje de 67 hrs para el carcinoma de encía (CDE-1) y 69 para las células epiteliales (ENO-84) (figura 2). En consecuencia estos resultados indican que al igual que con los sarcomas, existe alguna relación directa entre tiempo de doblaje y grado de interacción con leucocitos IN VITRO.

IDENTIFICACION DEL TIPO DE LEUCOCITO ADHERIDO A LAS CELULAS MALIGNAS

Para identificar el tipo de leucocitos que participa en la interacción de células malignas y células mononucleadas IN VITRO, se decidió hacer cultivos con células de la línea HBV-60, la cual se caracteriza por presentar un alto grado de interacción (51). Para ello se hicieron co-cultivos con células de este tipo (con 72 hrs de incubación previa) y leucocitos de sangre periférica. Al evaluar el grado de interacción encontramos que esta fué elevada llegando a ser hasta un 56% .

Para diferenciar a los linfocitos T de los B se utilizó la técnica de hexazotización con pararrosanilina, con la que los linfocitos T presentan áreas teñidas de color café-rojizo en su citoplasma. Al realizar los conteos en las células de histiocitoma, se observó que el 77% de los linfocitos adheridos a ellas eran T (figura 3). Con esta misma línea celular se realizó un experimento con leucocitos, depletando del paquete leucocitario aquellas células que se adherían al sustrato de cultivo. Para este caso se encontró una disminución muy importante en el grado de interacción ya que únicamente se presentó un 17% de interacción débil (tabla 7). Por otro lado no tuvo efecto el retirar a los monocitos del paquete leucocitario ya que se presentó una interacción de más del 80% .

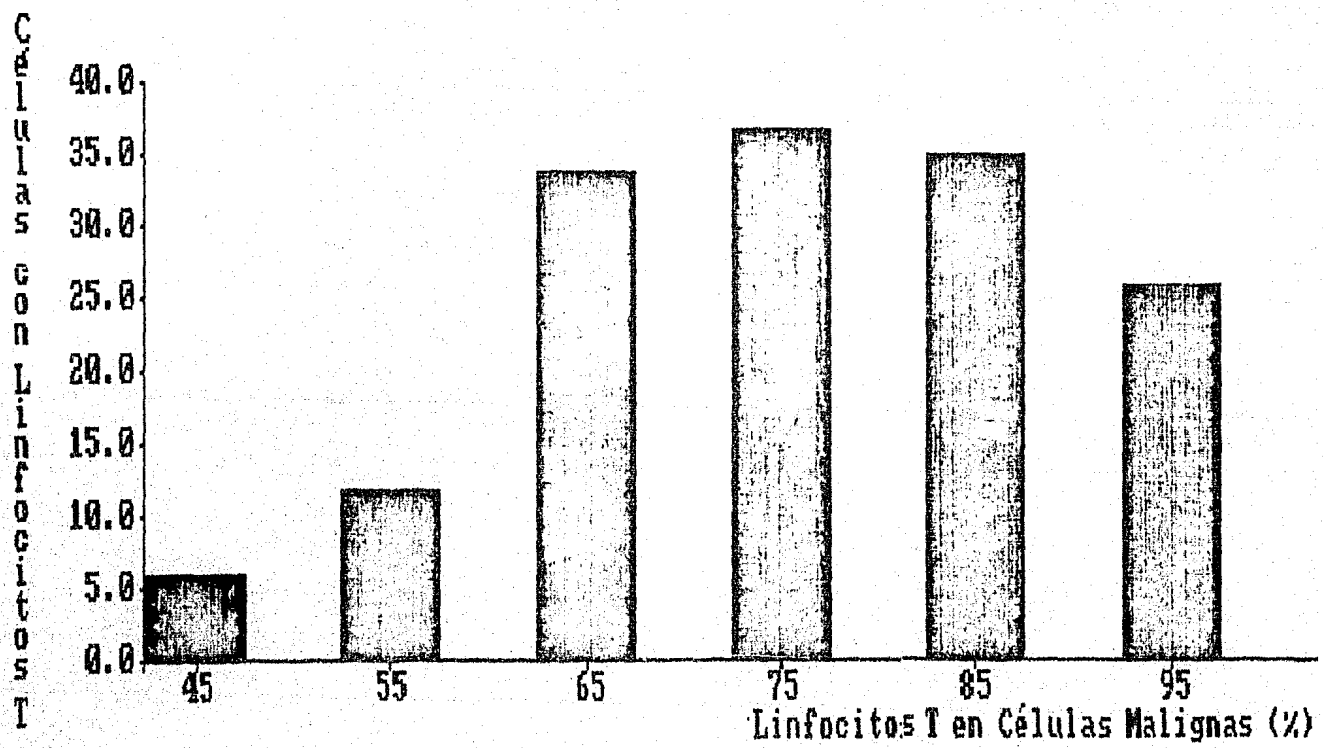


Figura 3.- Interacción de Linfocitos T en Células de Histiocitoma.

Leucocitos Interactuantes	Tipo de Interacción (%)		
	Débil	Fuerte	Muy Fuerte
Células Mononucleadas Totales	16	56	24
Células Mononucleadas Sin Monocitos	28	57	11
Células Mononucleadas Sin Células Adherentes	17	0	0

TABLA 7 .- INTERACCION DE CELULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA CON CELULAS PROVENIENTES DE HISTIOCIOMA.

Nota.- El co-cultivo fue por 24 hrs.

ACTIVACION DE LINFOCITOS EN CO-CULTIVO POR DIFERENTES TIPOS
CELULARES MALIGNOS Y FIBROBLASTOS NORMALES.

Es conocido que de la interacción entre células de origen maligno con leucocitos de sangre periférica, en particular los linfocitos T, se producen moléculas denominadas linfocinas (39), en consecuencia se esperaría que estas se encuentren presentes en nuestros co-cultivos. Para determinar su presencia se realizaron co-cultivos con leucocitos y células de tres líneas celulares (2 osteosarcomas OSX-1, OSX-2 y el histiocitoma HBV-60), así como con fibroblastos normales. La evaluación de la presencia de linfocinas se hizo mediante la determinación del número de leucocitos flotantes a los 10 días de co-cultivo. Para ello, se tomó en consideración a las células que presentaban una morfología alterada, esto es, con un citoplasma aumentado bien definido, con morfología típica de célula plasmática o a células en mitosis. Para las 3 líneas celulares de origen maligno se obtuvo que el 60% de las células presentaron una morfología alterada. En el caso de los osteosarcomas se presentaron hasta un 12% de células plasmáticas, mientras que para el histiocitoma solo fue de 4%. Células en mitosis solo fueron observadas con los osteosarcomas, siendo de un 5% para el OSX-1 y de 2% para el OSX-2. Por otro lado, se encontró un 5% de células muertas en el osteosarcoma y un 22% en el

histiocitoma (tabla B).

Para los fibroblastos se pudo observar un porcentaje bajo de células activadas, siendo para este caso de 9%; hay que destacar que no se presentaron mitosis a diferencia de lo observado con las 3 líneas celulares malignas. Por otro lado, el porcentaje de células muertas fue el mayor con un 56% .

Tipo Celular	Células Activadas (%)	Células Plasmáticas (%)	Células Sin Activar (%)	Células En Mitosis (%)	Células Muertas (%)
Fibroblastos Normales (UC-2)	9	0	35	0	56
Osteosarcoma (OSX-1)	62	12	15	5	6
Osteosarcoma (OSX-2)	59	12	21	2	6
Histiocitoma (HBV-60)	68	4	6	0	22

TABLA 8 .- EVALUACION DE LA ACTIVACION DE LINFOCITOS EN CO-CULTIVO CON DIFERENTES TIPOS CELULARES MALIGNOS Y FIBROBLASTOS NORMALES A LOS 10 DIAS.

DISCUSION

Hoy en día los esfuerzos por dar alivio a los padecimientos del cáncer han provocado que las investigaciones encaminadas a establecer tratamientos adecuados sean más favorecidas. Los tratamientos más comunmente empleados son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. No obstante, poco a poco han surgido nuevas técnicas para mejorar dichos tratamientos como son entre otras, la termoterapia, la terapia de microondas, la de resonancia de electrones y la inmunoterapia la cual parece tener mayor posibilidades de aplicación. Se han obtenido resultados positivos al aplicar la inmunoterapia sobre todo en algunos casos en donde las lesiones eran de fácil acceso, sin embargo, en la mayoría de los casos no se obtiene respuesta satisfactoria lo cual se puede atribuir a la heterogeneidad de las células y que dicha heterogeneidad sea resultado del estadio de diferenciación en que se encuentren, lo que les confiere diferente sensibilidad al tratamiento. En consecuencia, sería recomendable el desarrollo de una técnica que permita establecer la sensibilidad individual de cada tumor al tratamiento por inmunoterapia.

Se sabe que los tumores con mejor pronóstico son aquellos que tienen una infiltración de tipo linfocítica (54,55,56), de tal manera que debe haber alguna relación

entre las células malignas y la respuesta exitosa al tratamiento. Si la infiltración linfoide al tejido tumoral se lleva a cabo mediante la existencia de un mecanismo de reconocimiento entre linfocitos y células neoplásicas (57,58), entonces suponemos que una forma de evaluar la posible respuesta a un tratamiento inmunológico, sería mediante el estudio IN VITRO de la interacción de leucocitos de sangre periférica normal con células provenientes del tumor en estudio. En este trabajo se describe un ensayo en el cual se evaluó IN VITRO esta interacción, usando células tanto de sarcomas como de carcinomas en interacción con leucocitos de sangre periférica humana de donadores normales. El hecho de haber encontrado una sensibilidad diferente para cada tumor, nos hace pensar que probablemente tengamos una herramienta que ayude a evaluar la respuesta de los pacientes a un tratamiento inmunológico.

Específicamente en este trabajo se encontró una relación directa entre el grado de interacción de leucocitos normales y células malignas con el tiempo de saturación de estas últimas, lo cual nos hace pensar que los tumores lentos por presentar una mayor interacción, puedan tener un tratamiento inmunológico más eficiente que los de crecimiento rápido.

El hecho de que los fibroblastos normales aumentaran su interacción con leucocitos de sangre periférica al disminuir

su velocidad proliferativa con bajas concentraciones de suero (figura 1), nos indica que el grado de interacción medido no es resultado de la manifestación de antígenos tumorales, si no de una variación de las propiedades cinéticas de la célula que ve alterada su velocidad normal de proliferación por diversos mecanismos (viral, químico, o físico), la cual es detectada por el sistema inmune desencadenando un mecanismo de defensa inmunológico (28,59).

Sin embargo, no hay que perder de vista que para el caso de los fibroblastos al bajar su velocidad de proliferación aumentó su interacción con leucocitos, aunque está nunca fué tan intensa como la encontrada en células malignas de proliferación lenta (tabla 1,2,3). Esta diferencia se puede atribuir al estado de diferenciación en que se encuentran las células malignas al momento de interaccionar. Sería pues conveniente trabajar con células de la misma estirpe en diferentes estados de diferenciación para determinar si existe alguna correlación entre este y la intensidad de interacción con leucocitos.

Por otro lado, tanto en los sarcomas como en los carcinomas estudiados, se encontró que había una relación directa entre el grado de interacción de linfocitos con células tumorales y el tiempo de saturación (tabla 6,7). Este grado de saturación fué menor tanto para los fibroblastos como para las células epiteliales normales,

a diferencia de casi todas las células tumorales a excepción de las células ME-1 provenientes de un melanoma. Este comportamiento general nos hace pensar que IN VITRO las células tumorales tardan más que las células normales en acostumbrarse a las condiciones experimentales, probablemente debido a la ausencia de los factores transformadores que dieron origen a las células neoplásicas.

El tiempo de saturación encontrado en los explantes primarios fué muy superior al de las líneas celulares, lo cual nos muestra una vez más, que existe un periodo de adaptación de las diferentes células a condiciones ambientales nuevas. Las células ME-1 fueron las únicas que presentaron altos grados tanto de interacción con linfocitos, como una alta capacidad de saturación de los cultivos, lo cual nos hace pensar en la existencia de un agente transformador diferente. Es evidente que no podemos decir en este momento que todos los demás tumores tuvieron una causa etiológica semejante, sin embargo, sería recomendable trabajar con líneas celulares previamente transformadas con agentes tanto químicos y físicos como virales para esclarecer este punto.

Aunque los cultivos primarios de células epiteliales en general tardaban igual o más tiempo en saturar al sustrato de cultivo que las líneas celulares (tabla 2,6), estas mostraron una relación inversa respecto al grado de interacción con linfocitos, lo cual nos indica que en

contra de lo que sucede con los explantes primarios de sarcomas (tabla 3,5), las células epiteliales transformadas se adaptan más fácilmente a ser cultivadas fuera del organismo. Esta facilidad de proliferación puede ser debida a que en el caso de las células epiteliales, existen uniones desmosomales intensas y en los fibroblastos (26) no, en consecuencia, una transformación maligna puede ser interpretada como una disminución de este grado de anclaje en favor de una proliferación más rápida.

El hecho de haber obtenido una mayor interacción de linfocitos con células epiteliales normales en comparación con fibroblastos normales, puede ser debido a que presenten propiedades proliferativas (24,26), o histológicas diferentes. Al efectuar el cálculo del tiempo de doblaje de estas dos líneas celulares (figura 2), encontramos que era mayor en las células de origen epitelial, lo cual nos confirma una vez más nuestra hipótesis que la interacción con linfocitos aumenta cuando disminuye la proliferación de las células blanco IN VITRO. Análogamente, al determinar la cinética de proliferación, de una línea de carcinoma que presentó un grado de interacción semejante al de las células epiteliales normales, encontramos un valor muy similar en sus tiempos de doblaje. Al ser las células epiteliales menores en tamaño, las densidades de saturación fueron mayores que las encontradas con las líneas celulares malignas.

Por otro lado, se debe aclarar que el grado de saturación semejante presentado por los fibroblastos y células epiteliales normales (tabla 5,6), no corresponde a tiempos de doblaje semejantes (figura 2), por lo tanto suponemos que para tener una evaluación más correcta del estado proliferativo de las células tumorales, es necesario la evaluación de sus tiempos de doblaje.

Así mismo, se encontró una gran variación en los grados de interacción con linfocitos y las diferentes líneas celulares (tabla 2,3), la cual iba desde un 10% hasta casi un 70%. En consecuencia si existiera alguna conexión entre el tiempo de doblaje y el grado de diferenciación de una célula maligna, entonces la interacción con linfocitos normales nos proporcionaría de un ensayo muy sensible para evaluar el grado de diferenciación celular.

De entre los parámetros clínicos estudiados (tabla 4), solo se encontró una relación entre la evolución del tumor y el tiempo de saturación de este, ya que a un mayor tiempo de evolución (de las células que provenían de los tumores), correspondía IN VITRO tanto una menor interacción con leucocitos de sangre periférica, como un mayor grado de proliferación (tabla 2,3,4). Aunque no tenemos una explicación lógica de este fenómeno, pues parecería ser obvio que una célula que proliferare lentamente IN VIVO, lo hiciera también IN VITRO, consideramos que más experimentos serán necesarios para poder generalizar esta

observación.

Debido a la propiedad de reconocimiento de antígenos que tiene el linfocito T (54,60,61), se cree que este juega un papel importante en el proceso de interacción con células malignas. En consecuencia consideramos que era de esperarse el que en nuestros ensayos hasta un 77±14% de este tipo de células interaccionaran con las de origen tumoral (figura 3). La variación estándar encontrada de 14% indica cierta heterogeneidad de reconocimiento por los linfocitos T, lo cual creemos es debida a que las células blanco se encuentran en diferentes etapas de su ciclo celular, presentando por tanto diferentes antígenos membranales. Aunque el monocito se encontraba participando en aproximadamente un 10% de las interacciones con las células blanco, parece ser que su presencia no es absolutamente necesaria para que el fenómeno de reconocimiento se lleve a cabo, pues según nuestros resultados al remover a esta célula la interacción fue muy semejante a la del control. Sin embargo al repetir el ensayo en ausencia de todas aquellas células que se adhieren a un sustrato de cultivo, se perdió la capacidad de reconocimiento (tabla 7). Pensamos que esto se debe a la existencia de un linfocito adherente que tiene la propiedad de reconocer a las células blanco IN VITRO.

Los medios condicionados por la interacción de linfocitos (32,40) con células blanco, dieron lugar a

una gran actividad mitogénica (57) y de diferenciación hacia aquellos linfocitos que no se adherían a dichas células. Encontrando que mientras mayor era el grado de interacción, mayor era la activación de las células en suspensión, llegando hasta más de un 70% cuando se utilizó a las células provenientes de un histiocitoma maligno (tabla 8). Por su cuenta los medios condicionados por fibroblastos normales casi no presentaron activación.

Asimismo, el hecho de haber encontrado resultados semejantes en dos líneas de osteosarcoma, nos hace pensar que tienen un grado de diferenciación semejante que les permite secretar al medio de cultivo un mismo tipo de linfocinas que provean el mismo efecto mitogénico en los linfocitos en suspensión.

Por último, podríamos decir que el co-cultivo de leucocitos de sangre periférica con células neoplásicas, aparte de ser un sistema que facilite el estudio del reconocimiento de antígenos tumorales por el sistema inmune y, el de secreción de linfocinas, puede también tener una aplicación clínica importante. Como puede ser, el disponer de una herramienta que ayude a establecer el tratamiento más adecuado para cada paciente, dependiendo del tipo de tumor y tomando en consideración el grado de diferenciación de las células que lo integran. La aplicación de nuestro ensayo resultaría de la asociación encontrada en este trabajo entre el grado de proliferación de las células de origen

tumoral y su interacción con leucocitos normales, lo cual sabemos esta estrechamente ligado al grado de diferenciación celular.

CONCLUSIONES

1.- El ensayo de interacción de células mononucleadas con fibroblastos normales, a diferentes concentraciones de suero fetal de bovino, para inducir diferentes tiempos de saturación, indica que la interacción no es resultado del reconocimiento de antígenos tumorales, sino de la presencia de algún receptor normal.

2.- El hecho de haber encontrado IN VITRO una relación directa entre el grado de interacción de leucocitos normales y células malignas con el tiempo de saturación, nos hace pensar que los tumores lentos pueden ser tratados inmunológicamente.

3.- Se confirmó la hipótesis de un aumento en la interacción conforme la proliferación celular disminuye.

4.- Con los datos clínicos para cada tumor, se encontró una relación entre la evolución del tumor y el tiempo de saturación, así como con la interacción con leucocitos mononucleados. Lo que puede ser una herramienta en el diagnóstico del grado de diferenciación de tumores malignos.

5.- Se encontró que el linfocito T es el que interacciona predominantemente con células malignas.

6.- En nuestras condiciones de cultivo observamos que el monocito no es absolutamente indispensable para que la interacción se lleve a cabo y que debe existir un linfocito adherente capaz de reconocer y atacar a las células malignas en cultivo IN VITRO.

7.- El sobrenadante de la interacción de leucocitos de sangre periférica humana con células malignas cocultivadas IN VITRO, mostró tener capacidad de activación de linfocitos flotantes. Esta activación era mayor para las líneas celulares que presentaron interacción intensa.

APENDICE 1

Preparación del Medio de Cultivo:

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen total de medio desecado. Se adicionan 13.4 g/l de medio de Eagle en polvo (Microlab México), agitándose suavemente, se agregan 3.7g de bicarbonato de sodio, 100 u/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomocina. Se completa el volumen deseado, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del requerido que es de 7.29 (usando ácido clorhídrico) y se esteriliza por filtración con bióxido de carbono, pasándolo a través de una membrana con poro de 0.22 μ .

Composición del Medio Mínimo Esencial de Eagle.

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/l)
L-Arginina	84.0
L-Cistina	62.57
L-Glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-Histidina HCl.H ₂ O	42.0
L-Isoleucina	105.0
L-Leucina	105.0
L-Lisina.HCl	146.0
L-Metionina	30.0
L-Fenilalanina	66.0
L-Serina	42.0
L-Treonina	95.0
L-Triptófano	16.0
L-Tirosina (Sal Disódica)	104.2
L-Valina	94.0
VITAMINAS	
D-Ca Pantotenato	4.0
Cloruro de Colina	4.0
Acido Fólico	7.2
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal	4.0
Riboflavina	0.4
Tiamina	4.0

SALES INORGANICAS

Cloruro de Calcio Anhidro	200.0
Nitrato de Hierro III Nonhidratado	0.1
Cloruro de Potasio	400.0
Sulfato de Magnesio Anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.0
Fosfato Monosódico Monohidratado	125.0

OTROS COMPUESTOS

L-Glucosa	4500.0
Rojo Fenol	15.0

 APENDICE 2

Desactivación del Suero Fetal de Bovino:

Se toma una botella de Suero Fetal de Bovino (Gibco, USA) y se coloca en un baño a 57 °C por 30 min. posteriormente el suero es trasvasado a frascos más pequeños para poderlos manejar más fácilmente.

APENDICE 3

Preparación de Verseno:

Para preparar el verseno se agregan a 800 ml de agua bidestilada, las siguientes sustancias.

COMPUESTOS	CONCENTRACION (g/l)
Tris Base _____	3.04
Cloruro de Sodio _____	8.00
Cloruro de potasio _____	0.40
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA) _____	0.20

Posteriormente se mezclan y agita, se afora a 1 lt con agua bidestilada, ajustándose el pH a 7,7 con ácido clorhídrico 10N y se esteriliza por medio de autoclave a 20 lb durante 20 min.

APENDICE 4

Preparación de Tripsina:

La solución de tripsina se prepara colocando 0.025 g de tripsina (Sigma Chemical U.S.A.) en 100 ml de verseno, esto se mezcla y se filtra utilizando un filtro milipore de 0.22 μ . Se recomienda colocarla en tubos pequeños y almacenarla a temperatura bajo cero para evitar su autodigestión.

APENDICE 5

Preparación de Solución Salina Amortiguadora:

Solución A

Cloruro de Sodio	8.00 g
Cloruro de Potasio	0.40 g
Sulfato de Magnesio .7 H O	0.20 g
Fosfato de Sodio	0.045g
Fosfato de Potasio	0.060g

Estas sustancias se disuelven en 500 ml de agua destilada.

Solución B

CaCl .2H O	0.147g
------------------	--------

Disolviéndolo en 500 ml de agua destilada.

Solución C

Glucosa	1.00g
---------------	-------

Disuelto en 10 ml de agua destilada, se mezcla con partes iguales de solución A más B.

Solución D

Rojo-fenol.....	0.002g
-----------------	--------

Disolver en 10 ml de agua destilada y se añade a la mezcla previa:

$$A + B + C + D = Q$$

Solución E

Tris base	19.1g
-----------------	-------

Disolver en 800 ml de agua destilada ajustar el pH a 7.4 después de mezclar partes iguales de solución E con la solución Q. La esterilización se hace utilizando un filtro milipore de 0.22 μ .

APENDICE 6

Preparación de Ficoll-Paque:

Se prepara una solución de Ficoll (Ficoll 400, Fine Chemicals Suiza) al 9% en agua destilada. De esta solución se toman 24 ml y son mezclados con 10 ml de una solución Hypaque (Riker U.S.A.) al 34% en agua destilada. Estas 2 soluciones se mezclan perfectamente, quedando a una densidad final de 1.07 g/ml. Se esteriliza en autoclave a 10 lb de presión durante 15 min.

APENDICE 7

Preparación de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS):

En 1 litro de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias.

Cloruro de sodio	8.00g
Fosfato de sodio monobásico	2.16g
Fosfato de Potasio	0.20g
Cloruro de Potasio	0.20g

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

APENDICE 8

El formol cálcico se prepara mezclando formol al 4% más cloruro de calcio al 1%, en proporción uno a uno y ajustando el pH a 6.7 usando hidróxido de sodio 1N y protegiéndolo de la luz.

APENDICE 9

Preparación de pararrosanilina dioxoacetizada:

Solución A.

Pararrosaniline (Sigma Chemical U.S.A) 1g

Se disuelve en 20 ml de agua destilada más 5 ml de ácido clorhídrico, enfriar y almacenar a 4 C en la obscuridad.

Solución B.

Preparar una solución al 4% de nitrito de sodio en agua destilada (Preparar al momento).

Se mezclan en partes iguales la solución A y B, agitando por pocos segundos hasta que adquiera un color ámbar.

APENDICE 10

Preparación de fosfatasa ácida para linfocitos T:

Solución fijadora 1.

Se toman 2 ml de solución concentrada de citrato (*) y se mezclan con 18 ml de agua destilada, a esto se le adicionan 30 ml de acetona. Prepararse al momento de usarse.

Solución conteniendo el sustrato 2.

Se toman 2 ml de una solución de Naftol AS-BI ácido fosfórico a una concentración de 12.25 mg/ml en N,N Dimetilformamida, se mezclan con 2 ml de una solución 2.5 M de acetato (*) y se adicionan 46 ml de agua destilada. Una vez preparada esta solución, se agregan 15 mg de sal Rápida de Garnet GRC, se mezcla bien y se filtra por papel Watman No. 54.

(*) Estos reactivos vienen preparados en el Kit. 386 para fosfatasa ácida de Sigma Chemical Co. U.S.A.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Roux, W., BEITRAGE ZUR ENTWICKLENGSMECHANIK DES EMBRYO. in: Raymond, C., METHODS OF TISSUE CULTURE. Ed. Paul B. Hoerber, 3rd. ed. New York, pp. 1, 1961.
- 2.- Harrison, R.G., OBSERVATION ON THE LIVING DEVELOPING NERVE FIBER. in: Raymond, C., METHODS OF TISSUE CULTURE. Ed. Paul B. Hoerber, 3rd. ed. New York, pp. 2, 1961.
- 3.- Carrel, A., ARTIFICIAL ACTIVATION OF THE GROWTH in vitro OF CONECTIVE TISSUE. in: METHODS OF TISSUE CULTURE. Ed. Paul B. Hoerber, 3rd. ed. New York, pp. 62, 1961.
- 4.- Baker, L.E., THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCES REQUERID FOR CELL MULTIPLICATION II THE ACTION OF GLUTATIONE HEMOGLOBIN, AND ASH OF LIVER ON THE GROWTH OF FIBROBLASTS. J. Exp. Med., 49:163, 1929.
- 5.- Eagle, H., THE ESPECIFIC AMINO ACID REQUERIMENTS HUMAN CARCINOMA CELL (STRAIN HeLa) IN TISSUE CULTURE. J. Exp. Med., 102:37, 1959.
- 6.- McCoy, T.A., et al, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 100:115, 1959.
- 7.- Ham, A.W., Exp. Cell Res., 29:515, 1963.
- 8.- Hayflick, L., and Moorhead, P.S., THE SERIAL CULTIVATION OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. Exp. Cell Res., 25:585, 1961.
- 9.- Gey, G.O., et al, TISSUE CULTURE STUDIES OF THE PROLIFERATIVE CAPACITY OF CERVICAL CARCINOMA AND NORMAL EPITHELIUM. Cancer Res., 12:264, 1952.
- 10.- The American Type Culture Collection, Catalogue of Strains. II. 2ds. ed., Maryland, U.S.A., 1979.
- 11.- Poten, J., et al, TWO STABLISHED in vitro CELL LINES FROM HUMAN MESENCHYMAL TUMORS. Int. J. Cancer, 2:434, 1967.
- 12.- Taylor, W.G., ELECTROLYTES DISSOLVED GRASES, BUFFERS AND pH CHANGES IN TISSUE CULTURE, IN THE GROWTH REQUIREMENTS OF VERTEBRATES CELLS in vitro. Ed. Waymonth EJ. Press Syndicate of the University of Cambridge New York, U.S.A. Med., pp. 94, 1981.
- 13.- Mitchinson, Sc.D., THE BIOLOGY THE CELL CYCLE. Ed. Cambridge University, Press, pp. 25, 1971.
- 14.- Prescott, D.M., THE CELL CYCLE AND THE CONTROL OF CELLULAR REPRODUCTION. in: Adv. in Genet., Ed. E. W. Caspari, Academic Press, New York, pp. 99, 1976.
- 15.- Avers, Ch.S., BIOLOGIA CELULAR. Ed. Gpo. Editorial Iberoamericana 2da. ed. Mexico, pp. 415, 1981.
- 16.- De Robertis, E., et al, BIOLOGIA CELULAR. Ed. Ateneo, 9na. ed. Buenos Aires Argentina, pp. 388, 1977.
- 17.- Ham, A.W., TRATADO DE HISTOLOGIA, Ed. Interamericana. 6ta. ed. Mexico, D.F., Mexico, pp. 59, 1970.
- 18.- Jacoby, F., et al, 'LES CONFERENCES NOBEL (1965)'. Sciences, 35:43, 1966.
- 19.- Lopashov, G.V., LEVELS IN STABILIZATION OF CELL DIFFERENTIATION AND ITS EXPERIMENTAL TRANSFORMATION. Diff., 9:131, 1977.

- 20.- Edelman, M.G., SURFACE MODULATION IN CELL RECOGNITION AND CELL GROWTH. *Science*, 192:218, 1976.
- 21.- Brunner, G., MEMBRANE IMPRESSION AND GENE EXPRESSION. *Diff.*, 8:123, 1977.
- 22.- Robbins, S.L., PATOLOGIA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL. Ed. Interamericana, Mexico, D.F., Mexico., pp. 81. 1975.
- 23.- Perez, R., INTRODUCCION A LA PATOLOGIA. Ed. Instituto Nacional de la Nutricion, Mexico, D.F., Mexico., pp.315 1979.
- 24.- De Vita, V.T., et al, CANCER PRINCIPLES AND PRACTICE OF ONCOLOGY. Ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, U.S.A., pp.80, 1982.
- 25.- Kirk, D., NON-RECIPROCAL INTERACTIONS IN NORMAL-NEOPLASTIC HUMAN CELLS. A CUANTITATIVE, KINETIC APPROACH TO CELL INTERACTIONS in vitro. *Cell. Biol. Int. Rep.*, 4:599, 1980.
- 26.- Vassiliou, J.M. NOPLASTIC AND NORMAL CELLS IN CULTURE. Ed. Cambridge University Press, Great Britain, pp.3, 1981.
- 27.- Nicolson, G.H., METASTASIS CANCEROSAS. *Investigacion y Ciencia*, 32:22, 1979.
- 28.- Fudenberg, H.H., INTRODUCCION A LA INMUNOLOGIA BASICA, Ed. El Manual Moderno, 4ta. ed., Mexico, D.F., Mexico., 1983.
- 29.- Takahashi, M., COLOR ATLAS OF CANCER CYTOLOGY. Ed. George Thieme, Verlag Stuttgart, 2da. ed., Tokyo, Japan, pp. 32, 1981.
- 30.- Perez, T.R., PATOLOGIA MOLECULAR, SUBCELULAR Y CELULAR. Dpto. de Patologia, Instituto Nacional de la Nutricion, Ed. Fournier, Mexico, D.F., Mexico, pp. 493, 1975.
- 31.- Hood, L.E., et al, IMMUNOLOGY. 2da. ed., Ed. Benjamin Cummings, California, U.S.A., pp. 436, 1984.
- 32.- Melchers, F. and Andersson, J., B CELL ACTIVATION: THREE STEPS AND THEIR VARIATIONS. *Cell*, 37:715, 1984.
- 33.- Alberts, B., et al. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. Ed. Garland Publishing, London, pp. 996, 1983.
- 34.- Reynolds, C.W., et al, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE NATURAL KILLER (NK) CELLS IN RATS, in: NK Cells and Other Natural Effector Cells. Ed. Herberman, Academic Press, New York, pp. 17, 1982.
- 35.- Tagliabue, A., et al, LARGE GRANULAR LYMPHOCYTES AS EFFECTOR CELLS OF NATURAL KILLER ACTIVITY IN THE MOUSE, in: NK Cells and Other Natural Effector Cells. Ed. Herberman, Academic Press, New York, pp. 25, 1982.
- 36.- Perussia, B., et al, PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF HUMAN NATURAL KILLER AND ANTIBODY-DEPENDENT KILLER CELLS AS AN HOMOGENEOUS AND DISCRETE CELL SUBSET, in: NK Cells and Other Natural Effector Cells. Ed. Herberman, Academic Press, New York, pp. 39, 1982.
- 37.- Abo, T., et al, CHARACTERIZATION OF HUMAN NK CELLS IDENTIFIED BY THE MONOCLONAL HNK-1 (Leu-7) ANTIBODY, in: NK Cells and Other Natural Effector Cells. Ed. Herberman Academic Press, New York, pp. 31, 1982.
- 38.- George, M. and Vaughan J.H., in vitro CELL MIGRATION AS A MODEL FOR DELAYED HYPERSENSITIVITY. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111:514, 1962.

- 39.- Oppenheim, J.J., LYMPHOKINES, in: Cellular Functions in Immunity and Inflammations. Ed. Edward Arnold, U.S.A., pp. 259, 1981.
- 40.- Farrar, J.J., et al, THE BIOCHEMISTRY, BIOLOGY, AND ROLE OF INTERLEUKIN 2 IN THE INDUCTION OF CYTOTOXIC T CELL AND ANTIBODY-FORMING B CELL RESPONSES. Immunol. Rev., 63:129, 1982.
- 41.- Palacios, R., MECHANISM OF T CELL ACTIVATION: ROLE AND FUNCTIONAL RELATIONSHIP OF HLA-DR ANTIGENS AND INTERLEUKINS. Immunol. Rev., 63:73, 1982.
- 42.- Troye, M., et al, LYMPHOCYTE-MEDIATED LYSIS OF TUMOR CELLS *in vitro* (ASCC), INDUCED BY SERUM ANTIBODIES FROM PATIENTS WITH URINARY BLADDER CARCINOMA OR FROM CONTROLS. Int. J. Cancer., 25:45, 1980.
- 43.- Aarden, L.A., et al, REVISED NOMENCLATURE FOR ANTIGEN-NONSPECIFIC T CELLS PROLIFERATION AND HELPER FACTORS. J. Immunol., 123:2928, 1979.
- 44.- Oppenheim, J.J., et al, COMPARISON OF LYMPHOCYTE AND MONONUCLEAR PHAGOCYTE DERIVED MITOGENIC 'AMPLIFICATION' FACTORS. IN BIOLOGY OF THE LYMPHOKINES. Ed. Cohen S., Academic Press, New York, pp. 291, 1979.
- 45.- Farrar, J.J., et al, LIPOPOLYSACCHARIDE-MEDIATED ADJUVANTICITY: EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDE ON THE PRODUCTION OF T CELL GROWTH FACTOR (INTERLEUKIN 2), IN MICROBIOLOGY. Ed. Schlessinger, D., Amer. Soc. Microbiology, Wash. D. C., pp. 36, 1980.
- 46.- Larsson, E.L., et al, TWO DISTINCT FACTORS ARE REQUIRED FOR INDUCTION OF T CELL GROWTH. *Natu.* 263:464, 1980.
- 47.- Lamon, E.W., STIMULATION OF TUMOR CELL GROWTH *in vitro* A CRITICAL EVOLUTION OF IMMUNOLOGIC SPECIFICITY. J. Nat. Cancer Inst., 59:769, 1977.
- 48.- Klein, G., IMMUNE AND NO-IMMUNE CONTROL OF NEOPLASTIC DEVELOPMENT CONTRASTING EFFECTS OF HOST AND TUMOR EVOLUTION. *Cancer*, 45:2486, 1980.
- 49.- Balm, F.J.M., et al, MONONUCLEAR PHAGOCYTE FUNCTION IN HEAD AND NECK CANCER: DEPRESSION OF MURINE MACROPHAGE ACCUMULATION BY LOW MOLECULAR WEIGHT FACTORS DERIVED FROM HEAD AND NECK CARCINOMAS. *Laryngoscope*, 94:223, 1984.
- 50.- Rosenberg, S.A., LYSIS OF HUMAN NORMAL AND SARCOMA CELLS IN TISSUE CULTURE BY NORMAL HUMAN SERUM: IMPLICATIONS FOR EXPERIMENTS IN HUMAN TUMOR IMMUNOLOGY. *J. Natl. Cancer Inst.*, 58:1233, 1977.
- 51.- Gutierrez, X.M.L., Esquivel, G.F.R., Villarreal, R. B., ESTUDIO MORFOLOGICO, BIOQUIMICO E INMUNOLOGICO DE CELULAS PROVENIENTES DE SARCOMAS HUMANOS CULTIVADOS *in vitro*. Tesis Profesional. E.N.E.F.-Zaragoza, U.N.A.M. 1984.
- 52.- Lwitin, J., TRIPSINIZATION OF DIPLOID HUMAN FIBROBLAST IN TISSUE CULTURE. Ed. Krussa, F.P. and Patterson, M.K. Ed. American Press. San Francisco, U.S.A. pp 168, 1973.
- 53.- Adams, R.L., CELL CULTURE BIOCHEMISTS. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. Med., pp. 60, 1980.
- 54.- Vose, B.M., et al, HUMAN TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES: A MARKER OF HOST RESPONSE. *Sem. Hem.*, 22:127, 1985.
- 55.- Vanky, F., et al, CORRELATION BETWEEN LYMPHOCYTE-MEDIATED AUTO-TUMOR REACTIVITIES AND THE CLINICAL COURSE. II.

- EVALUATION OF 69 PATIENTS WITH LUNG CARCINOMA. *Cancer Immunol Immunother*, 16:17, 1983.
- 56.- Vanky, F., et al, CORRELATION BETWEEN LYMPHOCYTE-MEDIATED AUTO-TUMOR REACTIVITIES AND CLINICAL COURSE. I. EVALUATION OF 46 PATIENTS WITH SARCOMA. *Cancer Immunol Immunother*, 16:11, 1983.
- 57.- Vanky, F., et al, HUMAN TUMOR-LYMPHOCYTE INTERACTION in vitro. VII. BLASTOGENESIS AND GENERATION OF CYTOTOXICITY AGAINST AUTOLOGOUS TUMOR BIOPSY CELLS ARE INHIBITED BY INTERFERON. *Int. J. Cancer*, 26:405, 1980.
- 58.- Hans, H., CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY in vitro OF HUMAN LYMPHOCYTES AGAINST A TISSUE CULTURE MELANOMA CELL LINE (IGR3). *J. Immunol.*, 115:539, 1975.
- 59.- Kontiainen, S., FUNCTIONAL STIMULATION OF T CELLS WITH PROTEIN ANTIGENS. *Cancer Immunol.* 6:184, 1979.
- 60.- Rees, A., et al, HUMAN T CELL RESPONSES in vitro: CELL INTERACTIONS AND FACTORS. *Acad. Sci.* 332:503, 1979.
- 61.- Bessis, M., BLOOD SMEARS REINTERPRETED. Ed. Springer-Verlag, Berlin heidelberg, pp 145, 1979.

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer constar mi agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider por su apoyo, dirección y consejos, los cuales hicieron posible la realización de este trabajo.

Por otro parte, doy las gracias al Biol. Carlos Bautista R., al Biol. Ramiro Rios G., al M en C. Mario Altamirano L. y a la C.D.M.D. Julia Urdiales Ramos por la revisión del manuscrito así como por sus acertadas y útiles observaciones para mejorar la presentación de este trabajo.

También expreso mi gratitud a los señores Ranulfo Pedraza y Jose Chavarría por su colaboración técnica.