

24, 18



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

"Algunos Aspectos de la Respuesta Inmune  
Inespecífica en Pacientes con Cáncer  
del Cervix."

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

MA. GUADALUPE HURTADO VELAZQUEZ

ARTURO TORRES DE LA O.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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

Introducción .....	1
Fundamento del tema .....	9
Planteamiento del problema .....	13
Objetivos .....	15
Hipótesis .....	16
Material .....	17
Método .....	20
Resultados .....	30
Discusión de resultados .....	49
Conclusiones .....	54
Anexo .....	57
Bibliografía .....	62

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

Las primeras enfermedades en las cuales fué reconocida - la importancia de un potencial inmunológico adecuado fueron - aquellas relacionadas con un agente infeccioso y así se vió - la necesidad de que existiesen " defensas " contra dichos - agentes patógenos. Conforme más se ha ido aprendiendo sobre el sistema inuane, muchas más enfermedades de distinta índole se añaden a la lista de aquellas en donde dicho sistema parti- cipa en la etiopatogenia. El Cáncer Cérvico Uterino ( CaCU ) se considera una enfermedad donde el sistema inmunológico jue- ga un papel importante ( 21,32 ).

Desde un punto de vista clínico, el tumor surge de la - transformación de una célula normal en otra que carece de los mecanismos de control normal sobre el crecimiento y diferen- ciación celular. El carcinoma es un tumor derivado de tejido epitelial, que puede ser benigno o maligno y alcanzar su máxi- ma expresión cuando hay metástasis. El CaCU se extiende por contigüidad y las metástasis más frecuentes son a vejiga y - recto ( 13,24 ).

Dentro de las ciencias relacionadas con la investigación del Cáncer se encuentran la Inmunología, debido a que las cé- lulas tumorales son antigénicamente extrañas y por lo tanto - son capaces de despertar una respuesta inmune.

En el Departamento de Inmunología de la E.N.C.B. se ha - enfocado la atención hacia esta enfermedad, estudiando diver- sos parámetros de la respuesta inmune. Se sabe que en el Ca CU hay linfopenia y leucopenia, disminución en el porcentaje de linfocitos T totales y elevación en el porcentaje de linfo- citos B ( 1,12,30 ). Hay estudios citoquímicos que indican -

deficiencia intracelular de N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa, así como de  $\beta$ -glucuronidasa y Mieloperoxidasa ( 5,6,10 ). Además se ha abordado el estudio de diversos parámetros de inmunidad celular ( 12 ) y humoral, entre los cuales se pueden mencionar la determinación de complejos inmunes circulantes en sangre periférica ( 2,30 ). Dichos estudios intentan hacer más evidente una posible relación de las condiciones de la respuesta inmune con la evolución clínica y la respuesta al tratamiento que reciben las pacientes.

Dentro de la respuesta inmune los mecanismos efectores de la inmunidad celular juegan un papel importante. Esta rama de la inmunidad está representada por los linfocitos T que se originan en la médula osea y maduran en el timo, para después localizarse en sangre y en los órganos linfoides. Cuando hay estimulación por un antígeno tumoral empiezan a dividirse y a generarse diversas subpoblaciones de células, entre las que se encuentran células cooperadoras y/o inductoras ( CD4 ), células supresoras y/o citotóxicas ( CD8 ) y células efectoras ( CD3 ) capaces de producir factores solubles conocidos en el nombre genérico de linfocinas. Por supuesto que existe una red de interacciones entre estas células y los macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos B, además de otras células ( 8,9,11,26 ).

La activación de los linfocitos B resulta en la producción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden jugar cierto papel en el ataque del sistema inmune contra los tumores de origen linfóide más no se ha demostrado que sean un factor impor

tante en el control de tumores sólidos. Por el contrario; - pueden generarse situaciones que incluso provocan el desarrollo del tumor, como por ejemplo lo que se conoce como facilitación inmunológica ( 8,21,27 ).

Puesto que la respuesta inmune inespecífica puede tener gran importancia en el control inicial de un tumor, decidimos emprender su estudio, utilizando un modelo de control del crecimiento bacteriano por elementos celulares y humorales de pacientes con CaCU.

### C A N C E R D E L C E R V I X

#### A). Consideraciones generales.

El cáncer del cuello uterino es el proceso maligno que ocupa el tercer lugar por frecuencia de neoplasias en el sexo femenino de países subdesarrollados, después del cáncer mamario y endometrial. Alrededor del 2% de las mujeres mayores de 40 años lo desarrollan. La edad promedio es de 45 años, - pero pueden aparecer a los 20 años o en el embarazo. Cuando se detecta a tiempo, el 95% de las enfermas con carcinoma incipiente pueden ser curadas ( 13,22 ).

El carcinoma de células planas constituye el 87% de los casos de neoplasia epitelial maligna, en tanto que el adenocarcinoma mixto el 13%.

#### B) Epidemiología.

Las causas se desconocen, pero se reconocen factores predisponentes. La actividad sexual se ha analizado en estudios como el realizado por Rotkin y Cameron quienes revisaron un -

grupo de 120 variables estadísticas asociadas al cáncer y concluyeron que el coito a una edad temprana constituye un fac-tor muy significativo. Otros factores adicionalmente impor-tan-tes son los aspectos sociológicos, la pobreza e ignorancia ( 28 ).

La edad del primer embarazo correlaciona con estados precancerosos cuando ocurre antes de los 20 años. El número de embarazos incrementa la proporción de riesgo. Además existen factores del compañero como el esmegma que se encuentra en el pene y que se convierte en un agente carcinógeno cuando no -hay higiene genital. El CaCU es cuatro veces mayor entre -prostitutas que en otras mujeres ( 15,18 ).

Otros factores que intervienen son el estrato socioeconómico bajo, falta de higiene y educación. Las personas que emplean anticonceptivos orales tienen una proporción más alta -de lesiones precancerosas que pacientes que emplean diafragma como control. Adicionalmente es necesario señalar que hay -una probable asociación entre el herpes virus simple tipo 2 y el carcinoma escamocelular ( 18 ).

### C) Patología.

El CaCU es un proceso de lento desarrollo que puede co-menzar como una displasia con progresión gradual por varios -años hasta llegar a la forma preinvasiva " carcinoma in situ". El 90% del carcinoma del cérvix se desarrolla en las capas -intraepiteliales. Esta forma preinvasiva en la mayoría de -las mujeres permanece estática por otros 7 a 10 años, pero -

puede extenderse, afectando zonas más grandes del epitelio es camoso y columnar ( 13,22,24 ).

Cuando invade el estroma cervical ( estadio IA ), consti tuye un proceso localizado, siempre que no haya pruebas histo patológicas de afección al espacio vascular. La penetración más allá suele correr el riesgo de metástasis linfática o he- matógena. El tumor también se disemina por extensión directa al parametrio, donde puede comprimir los ureteres y llegar a producir la muerte por uremia. Las células tumorales también pueden ser transportadas a los gánglios linfáticos, pélvicos, obturadores, iliacos externos y sacros.

El carcinoma de células escamosas, limitado al cuello - uterino, afecta los gánglios linfáticos regionales de la pelvis en 15 - 20% de los casos. Cuando el cáncer afecta el pa- rametrio ( fase IIB ), se pueden encontrar células tumorales en los gánglios linfáticos pélvicos en 30 - 40% y los gánglios paraaórticos casi en 10% de los casos. Los gánglios paraaórticos están afectados en el 45% de pacientes en fase III - ( 22,24 ).

#### D) Etapas clínicas.

Es importante evaluar la extensión de la enfermedad con el fin de hacer el diagnóstico, establecer el pronóstico y el tratamiento, así como para evaluar los métodos terapéuticos.

La clasificación más usada es la de la Federación Inter- nacional de Ginecología y Obstetricia ( FIGO ) ( 13,24 ).

## CLASIFICACION INTERNACIONAL DEL CANCER DEL CERVIX

### Carcinoma preinvasivo.

Estadio 0      Carcinoma " in situ ", carcinoma intraepitelial.

### Carcinoma invasivo.

Estadio I      Carcinoma estrictamente circunscrito al cérvix ( se descarta la extensión al cuerpo uterino ).  
IA      Carcinoma microinvasor ( invasión temprana del estroma ).  
IB      Otras formas del estadio I.

Estadio II      El carcinoma se extiende más allá del cérvix, - pero no ha alcanzado la pared pélvica. Afecta la vagina pero no alcanza el tercio inferior.  
IIA      Sin afectar parametrios.  
IIB      Hay afección de parametrios.

Estadio III      El carcinoma se ha extendido sobre la pared - pélvica. A la exploración rectal no existe espacio libre entre el tumor y la pared pélvica o se ha afectado el tercio inferior de la vagina. Existe hidronefrosis o un riñón no funcional.  
IIIA      No hay extensión de pared pélvica. Hay afección vaginal incluyendo el tercio inferior.  
IIIB      Hay extensión del tumor a pared pélvica, hidronefrosis o ambos.

Estadio IV      El carcinoma se ha extendido más allá de la pélvis, invade la mucosa de la vejiga urinaria o - al recto.  
IVA      Diseminación hacia órganos adjuntos ( recto o - vejiga ).  
IVB      Diseminación a órganos distantes.

Clasificación aprobada por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia ( FIGO ) ( 13,24 ).

**E) Cuadro clínico.**

El sangrado intermenstrual constituye el síntoma más frecuente del cáncer invasor y puede tomar forma de leucorrea - sanguinolenta o purulenta, fétida y que ocasiona prurito. El dolor pélvico, unilateral e irradiado a cadera o muslo es manifestación de enfermedad avanzada, con la pérdida involuntaria de orina y heces. ( síntomas terminales de la enfermedad ). Por la pérdida aguda de sangre puede haber anemia en la etapa I.

El estadio IA no provoca síntomas, pero a medida que la enfermedad progresa se manifiesta. El cáncer infiltrante produce un desarrollo exofítico con sangrado, adquiriendo un aspecto de coliflor en la parte cervical. La ulceración puede ser manifestación primaria de carcinoma invasivo, que al profundizar se necrosa, formándose bordes endurecidos de superficie fácilmente sangrante. Al final, la infiltración extensa a los parametrios produce un engrosamiento nodular de los ligamentos uterosacros y cardinales con la pérdida resultante de la movilidad y fijación del cérvix ( 13,22,24 ).

**F) Datos de laboratorio.**

- 1.- Estudio de frotis ( Papanicolau ).
- 2.- Biopsia.
- 3.- Colposcopia.
- 4.- Diagnóstico diferencial ( 22,24 ).

**G) Tratamiento.**

Radioterapia. La dosis varía entre 5000 a 6000 rads con <sup>60</sup>Co administradas en 4 a 5 semanas y 1 ó 2 aplicaciones de - radium intracavitario ( 20,33 ).

Quimioterapia. La Doxorrubicina, Bleomicina y Cisplatino son muy activos contra el cáncer de células planas del cullo uterino. En las lesiones con potencial bajo de curación ( estadíos III y IV ) se agrega la quimioterapia a la radioterapia ( 20,33 ).

#### H) Pronóstico.

Los factores que deben considerarse son:

- Edad de la enferma. Los tumores anaplásicos más agre-sivos se encuentran en mayor frecuencia en las mujeres jóvenes. Las de mayor edad están más aptas para albergar tumores malignos de lento crecimiento bien diferenciados.

- Estado físico general. La muerte por enfermedad intercurrente es más frecuente en enfermas que tienen graves enfermedades crónicas; por ejemplo diabetes, cardiopatía o nefropatía. La obesidad impone gran desventaja volviéndola más diffcil.

- Estado socioeconómico. Las enfermas que son de muy escasos recursos económicos generalmente tienen la enfermedad - en etapa más avanzada cuando son diagnosticadas por primera - vez, respondiendo menos bien a la terapéutica.

- Características macroscópicas del cáncer. Los tumores exofíticos o papilares ( aspecto de coliflor ) se observan en una etapa clínica más temprana que los tumores endofíticos - ( 8,21,33 ).

## FUNDAMENTO DEL TEMA

Las funciones de inmunidad en el ser humano requieren de un sistema linforreticular, que incluye células que se localizan en médula ósea, amígdalas, timo, ganglios linfáticos, placas de Peyer y bazo, distribuyéndose por vía linfática y hematogena en los tejidos de aparatos y sistemas ( 32 ).

Cuando se provoca la activación de dichas células por un material extraño se presentan una serie de fenómenos humorales y celulares que constituyen la respuesta inmune inespecífica y específica. La respuesta inmune inespecífica incluye fagocitosis, producción de interferón, acción del complemento, etc., en el proceso de inflamación y es lo que se genera inicialmente ( 17,32 ).

Después del contacto con un material extraño, el huésped presenta diversos mecanismos efectores que incluyen acción directa de diversas células ( citotoxicidad ) así como la liberación de productos sintetizados por las mismas ( linfocinas ) y factores séricos solubles conocidos con el nombre genérico de anticuerpos. Entre los componentes celulares se encuentran las células fagocíticas ( macrófagos y polimorfonucleares ) quienes participan eliminando a bacterias intracelulares, así como en los procesos de degradación de partículas infecciosas y de descamación ( 26,27 ).

Estas células fagocíticas reconocen material extraño al cual son atraídas por quimiotaxia y son estimuladas a fagocitar por algunas linfocinas como el factor inhibidor de la migración ( MIF ), factor activador de macrófagos ( MAF ) y opsoninas ( 26 ). Una vez que se ha producido la endocitosis -

ocurre una desgranulación activa en el interior de las células con la participación de procesos químicos microbicidas in dependientes y dependientes del oxígeno. Destaca entre estos últimos la formación del sistema haluro-peróxido de hidrógeno que tiene potente actividad microbicida y que junto con la acción de la mieloperoxidasa ( MPO ) alteran e interfieren en muchos de los sistemas biológicos del agente agresor causando su muerte ( 3,16,17 ).

En cuanto a las enfermedades neoplásicas se refiere, el sistema inmune cuenta con lo que se conoce como " Vigilancia Inmunológica " que se postula como un mecanismo según el cual la inmunidad celular tiene entre sus funciones fundamentales el reconocer y destruir a las células tumorales que expresan marcadores no propios como son los neoantígenos. Se dice que normalmente este sistema de vigilancia inmunológica reconoce y reacciona contra dichos antígenos antes de que la masa tumoral obtenga un tamaño crítico más allá del cual este mecanismo de control sería ineficaz ( 2,21 ).

Aunque la respuesta de tipo celular es la que está directamente involucrada en los mecanismos que integran la vigilancia inmunológica como sistema de eliminación de células tumorales, también es importante destacar el papel del linfocito B que al transformarse en célula plasmática participa con la producción de anticuerpos ( IgG e IgM ). No obstante, la presencia de éstos anticuerpos no guarda relación directa con una buena evolución del huésped. Más aún; frecuentemente estos anticuerpos recubren a las células tumorales sin causar--

les daño y evitan su accesibilidad a los linfocitos T u otras células citotóxicas que si serían efectivas, lo cual dá como resultado la evasión de la respuesta inmune por parte de la célula tumoral y la facilitación para su desarrollo ( 8,21 ).

Además las células tumorales también se incluyen entre una variedad de células blanco que son susceptibles al sistema haluro-peróxido de hidrógeno cuando se combina con las peroxidases. Entre las peroxidases que muestran tener actividad tumoricida se encuentra la mieloperoxidasa ( peroxidasa de neutrófilos y monocitos ) y la peroxidasa de eosinófilos ( EPO ) ( 14,23,31 ).

Las células fagocíticas tienen funciones importantes en la inmunidad inespecífica y específica y se ha observado que la eficacia de la citolisis " in vitro " de las células tumorales aumenta por la presencia de linfocitos activados o de linfocinas que activan a los macrófagos ( 9,11 ). La fagocitosis y fenómenos relacionados pueden ser importantes para la eliminación de células aberrantes, y es por ello que consideramos importante el efectuar un estudio de la funcionalidad de los polimorfonucleares en personas que sufren la presencia de un tumor, como es el caso de pacientes con cáncer cérvico-uterino, donde suponemos que puede haber alteración en la respuesta inmune inespecífica. El estudio de eliminación se ha realizado empleando células bacterianas y buscando correlación con la función integral de elementos celulares ( células fagocíticas y linfocitos ) con o sin la presencia de suero, de tal manera que refleje en forma más cercana la función -



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso fagocítico consta de varias fases muy importantes y bien caracterizadas. Las deficiencias en este proceso se dividen en extrínsecas e intrínsecas. Dentro de las extrínsecas están las deficiencias de opsoninas, de inmunoglobulinas, de componentes del sistema del complemento, la supresión del número total de fagocitos por agentes inmunosupresores, la interferencia de la función fagocítica por los corticosteroides y la supresión de los neutrófilos circulantes por los autoanticuerpos dirigidos específicamente contra los antígenos de los neutrófilos ( 32 ).

Los trastornos celulares están relacionados con las enzimas necesarias para la destrucción de las bacterias, lo que se puede observar en síndromes como: la enfermedad granulomatosa crónica ( deficiencia de NADPH y NADH oxidasas ), el síndrome de Chediak-Higashi ( quimiotaxis anormal ), el síndrome de Job ( dermatosis con niveles elevados de IgE en suero y quimiotaxis defectuosa en neutrófilos ), el síndrome del leucocito perezoso ( quimiotaxis defectuosa ), leucemia granulocítica aguda, policitemia vera, etc. ( 4,7,31 ).

La inmunidad celular mediada por los linfocitos T es vital para el control de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos intracelulares, el rechazo de aloinjertos por diversos estados patológicos autoinmunitarios y por formas de hipersensibilidad retardada. La acción directa del linfocito para lograr la destrucción del agente extraño se efectúa por medio de la producción de sustancias solubles ( linfocinas ) con acción sobre otras células normales o alteradas. Entre -

las linfocinas más importantes cabe mencionar el factor estimulador de colonias ( CSF ), factor inhibidor de la migración de leucocitos ( LIF ), factor activador de fibroblastos ( CFF ), interferón gamma, interleucina 2 y 3, etc. Algunas de ellas estimulan y retienen a los macrófagos, con el factor inhibidor de la migración ( MIF ) y el factor activador de macrófagos ( MAF ), que los transforman en macrófagos activados cuya función es más efectiva para causar la eliminación del agente. Cabe mencionar también la presencia de los macrófagos armados, que son células estimuladas por linfocinas y difieren de los activados en cuanto a que presentan selectividad o especificidad sobre el antígeno que despertó la respuesta. Ellos son eficientes destructores de las células tumorales y células de transplantes, además de participar en las reacciones cutáneas de hipersensibilidad tardía ( 9,26,27 ).

Para la destrucción de las células tumorales por macrófagos se requiere contacto con el linfocito T para desarrollar un proceso citolítico. Esta es una de las razones que despertó nuestro interés el evaluar la actividad microbicida de los leucocitos humanos en sangre periférica y según este modelo - asumir si existe una alteración en la efectividad de la respuesta inespecífica en pacientes con cáncer cérvico uterino.

## O B J E T I V O S

- 1.- Aplicar metodología útil para evaluar la función inmunológica que puede estar implicada en la eliminación de células tumorales.
- 2.- Cuantificar los niveles de actividad enzimática de la Mieloperoxidasa en leucocitos polimorfonucleares de pacientes con Cáncer Cérvice Uterino.
- 3.- Determinar la influencia del suero autólogo en la eliminación de agentes extraños por parte de las células fagocíticas.
- 4.- Correlacionar entre los datos de laboratorio y el estado de las pacientes o su respuesta al tratamiento convencional.

## H I P O T E S I S

Considerando que el proceso fagocítico en particular y - la respuesta inmune inespecífica ( RII ) en general constituyen el primer contacto de una célula tumoral para su destrucción o eliminación, es importante estudiar la presencia de - una alteración en la capacidad fagocítica, mecanismos relacionados como opsonización y los niveles de actividad enzimática de la mieloperoxidasa en pacientes con Cáncer Cérvico Uterino, donde la alteración de la RII podría conducir a admitir la -- presencia de células aberrantes sin ser eliminadas con la suficiente prontitud para evitar que se manifieste como una masa tumoral.

## M A T E R I A L

### a) Instrumental.

Centrifuga refrigerada DAMON/ICE

Centrifuga clínica Solbat 115

Incubadora de 0°C a 100°C Thelco

Microscópio óptico Zeiss

Estufa Lab-line

Refrigerador Acros

Congelador de 0°C a - 20°C American

Congelador de 0°C a - 76°C ULTRA COLD

Espectrofotómetro Bausch & Lomb, espectral 20

Vórtex - Genie

Autoclave

Destilador BARNSTEAD

Balanza analítica Mattler

Balanza granataria OHAUS

Balanza granataria de dos platillos OHAUS

Potenciómetro Beckmann SS-3

Termómetro

Cámara de Neubauer

Cronómetro

Pipetas automáticas de 1 ml, 0.25 ml y 0.05 ml

Mecheros Bunsen

Pipetas de Thoma para glóbulos blancos

Celdas para espectrofotómetro

Porta asa y asa bacteriológica

Porta objetos

Cubre bocas

Cubrehamatímetro.

b) Material estéril

Cajas de Petri de 90 mm de diámetro

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm

Tubos con tapón de rosca de 15 x 125 mm

Tubos con tapón de rosca de 15 x 150 mm

Pipetas Pasteur

Jeringas de 5, 10 y 20 ml

Agujas del número 20 y 21

Puntas de plástico para pipetas automáticas

Tubos Eppendorf ( micro test tubes ) polipropileno 1.5 ml

c) Soluciones estériles

Solución salina al 0.85%

Dextrana al 6%

Solución de Alsever

Carbonato de sodio al 0.7%

Solución de Ficoll-Hypaque, densidad de  $1.077 \pm 0.001$  g/ml

Agua bidestilada

d) Medios de cultivo ( Celular y Bacteriano )

Medio TC 199 10x ó MEM 10x

Agar soya tripticaseina

Caldo soya tripticaseina

Caldo soya tripticaseina más glicerol

e) Material biológico y reactivos.

Sangre periférica y suero

Líquido de Turk

Colorante de Giemsa

Colorante de May-Grünwald

Colorante azul tripano

Patrón de ovoalbúmina ( 1 mg/ml )

Patrón de peroxidasa de rábano tipo VI ( SIGMA P-8375 )

230 ng/ml

Ortodianisidina 0.02 M ( SIGMA No. D-3252 )

Peroxido de hidrógeno 0.03 m

Hidróxido de sodio 0.1 N

Tartrato de sodio y potasio al 0.2%

Sulfato de cobre pentahidratado al 1%

Bromuro de acetil trimetil amonio al 0.6%

Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7

Reactivo de fenol ( Polin-Ciocalteu SIGMA No. 2790 )

Dioxano

Metanol

Etanol

f) Material microbiológico

Cepa bacteriana pura de Escherichia coli invasiva 9001 -

( Serotipo O1.K1:H7 ) aislada de líquido cefalorraquídeo

de un niño de 1 año. Dicha cepa es letal para embrión -

de pollo, invade células HeLa, Hep. 2 y fibroblastos de

ratón. Se obtuvo del cepario de la E.N.C.B. I.P.N.

## M E T O D O

### Individuos en estudio.

Se estudió un grupo de 42 pacientes con Cáncer Cérvico - Uterino ( PC ), que se clasificó en dos formas: la primera - por estadio ( I, II, III y IV ) de acuerdo a la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia - ( FIGO ) ( 13 ), considerando como estadios primarios al I y II ( 18 PC ) y como estadios avanzados al III y IV ( 21 PC ). La segunda forma de clasificar ha sido de acuerdo al tratamiento recibido, tomando muestras al inicio ( 21 PC ) y final - ( 21 PC ) del mismo que es a base de radiación. Se estudió - simultáneamente a un grupo de 32 mujeres normales ( CN ) con fines de comparación. Los resultados serán analizados empleando la prueba " t " de Student para datos paramétricos, así como la prueba " U " de Mann-Whitney para datos no paramétricos ( 25 ).

### Ensayo microbicida.

#### a) Preparación del inóculo bacteriano.

1.- De una cepa bacteriana pura de Escherichia coli invasiva 9001, se tomó una asada que fué sembrada en 15 ml de caldo soya tripticaseína e incubada a 37°C por 24 horas.

2.- Se preparó medio glicerol-caldo soya tripticaseína - en proporción 5 / 50 ml. Se tomó una proporción de éste medio en un tubo de rosca estéril y se efectuó prueba de esterilidad, incubándolo a 37°C por 24 horas.

3.- El sembrado al medio glicerol-caldo soya tripticaseína se repartió en tubos Eppendorf de 1 ml, que se rotularon y

congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

b) Ajuste de bacteria.

1.- Fue depositado el contenido del vial en 3 ml de caldo soya tripticaseina en un tubo de rosca estéril, y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

2.- Del tubo anterior se depositó una alícuota en caldo soya tripticaseina y se ajustó a una Densidad Optica ( D.O. ) de 0.1 a 620 nm de longitud de onda.

3.- Se realizó una dilución 1:5 del ajuste anterior con caldo soya tripticaseina y se mantuvo en refrigeración hasta su uso en la preparación de los tubos mezcla de reacción.

c) Obtención del suero ( de PC y CN ) para el ensayo microbiciada.

1.- Fueron extraídos 8 ml de sangre sin anticoagulante para obtener aproximadamente 5 ml de suero en un tubo de rosca estéril, que se mantuvo en refrigeración hasta su inclusión en la preparación de los tubos mezcla de reacción unas horas después.

2.- Una porción de este suero fresco se descomplementó a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos y se mantuvo en refrigeración hasta su empleo en la preparación de los tubos mezcla de reacción.

d) Obtención de leucocitos.

1.- Se obtuvieron 15 ml de sangre venosa con una jeringa de 20 ml, conteniéndole 5 ml de dextrana al 6% en solución de -

**Alsever.**

- 2.- Se mezcló perfectamente.
- 3.- Se colocó una porción de 0.5 ml en un tubo de ensayo. Se empleará para la cuenta de leucocitos totales.
- 4.- La jeringa con sangre fué incubada en posición vertical durante 30' a 37°C.
- 5.- Se separó el plasma rico en leucocitos y se recibió en un tubo de rosca estéril.
- 6.- Se centrifugó a 500 x g durante 10' a 4°C y se des--cartó el sobrenadante.
- 7.- Se resuspendió el botón celular en 1 ml de solución de Alsever usando una pipeta Pasteur y se llevó a 15 ml con ésta solución.
- 8.- Se centrifugó a 500 x g durante 10' a 4°C, descartando el sobrenadante, se resuspendió en 1 ml de Alsever y se -llevó a 15 ml con ésta misma solución.
- 9.- Se centrifugó a 500 x g durante 10' a 4°C y se des--cartó el sobrenadante.
- 10.- Se resuspendió el botón celular en 1 ml de agua bi--destilada estéril con una pipeta Pasteur se homogeneizó durante 45''. Se aforó hasta 15 ml con Medio Mínimo Esencial - ( MEM ) y se volvió a homogeneizar.
- 11.- Se centrifugó a 500 x g durante 10' a 4°C y se des--cartó el sobrenadante.
- 12.- Cuando quedaban eritrocitos en el botón celular, se repitieron los pasos 10 y 11.
- 13.- Se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de MEM

y se homogeneizó con una pipeta Pasteur, aforando hasta 15 ml con MEM.

14.- Se centrifugó a 500 x g durante 10' a 4°C y se descartó el sobrenadante.

15.- Se resuspendió el botón celular en 2 ml de solución salina estéril y se determinó el número de leucocitos totales en suspensión, empleando una pipeta de Thoma para cuenta de glóbulos blancos usando azul tripano como diluyente ( 1:20 ) y contando en la cámara de Neubauer.

16.- Se aforó la suspensión anterior hasta 15 ml con MEM, se homogeneizó y se centrifugó a 500 x g durante 10' a 4°C. Se descartó el sobrenadante.

17.- Se resuspendió el sedimento celular en 2 ml de MEM.

18.- Se efectuaron los cálculos para tomar el volumen de suspensión celular que corresponden a  $2 \times 10^6$  células en 2 ml.

e) Preparación de tubos mezcla de reacción.

1.- Se preparó una serie de tubos 13 x 100 mm estériles por duplicado que contenían lo siguiente:

Tubos	Contenido
1, 2	Control
3, 4	Suero inactivado ( 0.2 ml )
5, 6	Suero ( 0.2 ml )
7, 8	Suero inactivado ( 0.2 ml ) + $2 \times 10^6$ células.
9, 10	Suero ( 0.2 ml ) + $2 \times 10^6$ células
11, 12	$2 \times 10^6$ células

Se añadió a cada tubo mezcla de reacción 0.050 ml de bac

teria ya ajustada y diluida y se aforó a un volumen de 2 ml - con MEM.

Nota: Cada serie de tubos se realizó para muestras de pa-  
cientes y de controles normales.

2.- Se incubó a 37°C por 70'.

3.- Se efectuaron cuatro diluciones 1:11 de cada tubo -  
mezcla de reacción con agua bidestilada estéril.

4.- De la última dilución se vertió 0.2 ml en un tubo con  
agar soya tripticaseína, previamente fundido y posterior-  
mente mantenido a 37°C. Se realizó esta operación por tripli-  
cado para cada tubo mezcla de reacción.

5.- Se vació la mezcla anterior en cajas de Petri esté-  
riles y se incubó a 37°C por 24 horas.

6.- Se efectuó la cuenta de Unidades Formadoras de Colo-  
nias de Escherichia coli invasiva, y se evaluó el efecto inhi-  
bidor de crecimiento bacteriostático y/o bactericida.

#### Determinación enzimática.

a) Obtención de polimorfonucleares.

1.- Las células restantes del ensayo microbicida se tra-  
taron con solución de Ficoll-Hypaque de densidad 1.077 g/ml.

2.- Se centrifugó a 500 x g por 30' a 4°C.

3.- Se eliminó la banda de mononucleares con una pipeta  
Pasteur y se lavaron los polimorfonucleares en dos ocasiones  
con solución salina 0.85%.

4.- Se centrifugó a 500 x g durante 10 ' a 4°C. Se resus-  
pendió el botón celular del último lavado en 2 ml de solución

salina 0.85%.

5.- Se realizó la cuenta viable con la pipeta de Thoma -- para glóbulos blancos y se usó azul tripano como diluyente -- ( 1:20 ). Se contó en la cámara de Neubauer.

6.- Se depositó el volumen correspondiente de la suspensión en tubos de ensayo 13 x 100 mm de  $1 \times 10^6$  polimorfonucleares ( PMN's ) para la determinación de proteínas, así como  $0.1 \times 10^6$  PMN's para el ensayo de ortodiansidina ( ver página 26 ). Todo esto se hizo por duplicado.

7.- Se realizó frecuentemente frotis de las suspensiones celulares, que se tiñieron por el método de May-Grünwald para hacer la cuenta de PMN's. Se verificó que los PMN's se presentaban en más del 85% en relación a los mononucleares.

8.- Se almacenaron las preparaciones celulares a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para hacer posteriormente la determinación de proteínas y la actividad enzimática.

b) Determinación de proteínas por el método de Lowry:

1.- Se realizó la curva de calibración de proteínas de la siguiente manera ( 19 ): se preparó un patrón de ovoalbúmina a una concentración de 1 mg/ml en solución salina 0.85%. Se emplearon diferentes alícuotas por triplicado ( 0.02, 0.04, 0.08, 0.10, 0.16, 0.20 y 0.25 ml ) en tubos 13 x 100 mm.

2.- Se descongelaron los tubos almacenados con  $1 \times 10^6$  PMN's y se ajustó el volumen de cada tubo a 1 ml con solución salina 0.85%.

3.- Se agregó a cada tubo 3 ml de una solución que conte

nía 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2%, 1 ml de sulfato de cobre pentahidratado al 1%, carbonato de sodio al 2% en 100 ml de hidróxido de sodio 0.1 N.

4.- En dos tubos de 13 x 100 mm se colocaron los reactivos anteriores y se trabajó simultáneamente como blanco de reactivos.

5.- Se agitó y se dejó reposar 10' a temperatura ambiente.

6.- Se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu ( 0.1 ml ) y se leyó contra el blanco a una longitud de onda de 600 nm - después de incubar 10' a temperatura ambiente.

7.- Con los datos obtenidos de las diferentes alícuotas, fué construida la curva tipo colocando en las abscisas la concentración de proteína en  $\mu\text{g/ml}$  de la solución patrón de ovoalbúmina y en las ordenadas los valores de Densidad Óptica - ( D.O. ).

8.- En cuanto a las muestras problema, cada serie de determinaciones se hizo en correlación con las alícuotas de 0.08 y 0.1 ml de solución patrón.

c) Determinación de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa por el método de la ortodiansidina ( 34 ).

1.- Se descongelaron los tubos almacenados que contenían  $0.1 \times 10^6$  PMN's de cada muestra.

2.- Se llevaron a un volumen final de 2.5 ml con regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.

3.- Se agregó a cada tubo 0.1 ml de bromuro de acetil -

trimetil amonio ( CTAB ) al 0.6%, 0.05 ml de solución de orto dianisidina 0.02 M y 0.1 ml de peróxido de hidrógeno 0.03 m.

4.- En dos tubos 13 x 100 mm se colocaron todos los reactivos anteriores, excepto la muestra ( blanco de reactivos ) que se trabajaron simultáneamente.

5.- Se incubó a 37°C durante 20'.

6.- Se agregó a cada tubo 0.5 ml de ácido tricloroacético al 40%.

7.- Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 1400 x g durante 30' y con una pipeta Pasteur se descartó el sobrenadante.

8.- Se agregaron 3 ml de dioxano y se agitó.

9.- Se centrifugó a 1400 x g por 15'.

10.- El sobrenadante se leyó con respecto al blanco a una longitud de onda de 460 nm; la cuantificación de mieloperoxidasa se calculó de acuerdo a la proteína existente en las células. Como para el método de Lowry se colocaron  $1 \times 10^6$  PMN's se realizó el cálculo para  $0.1 \times 10^6$  PMN's. El resultado obtenido se relacionó con la D.O. de cada muestra en la determinación de mieloperoxidasa para conocer las Unidades Específicas de actividad enzimática:

Ejemplo:

N 72 Cantidad de proteína:

80.89  $\mu\text{g}$  de proteína en  $1 \times 10^6$  PMN's.

8.08  $\mu\text{g}$  de proteína en  $0.1 \times 10^6$  PMN's.

Cálculo de mieloperoxidasa:

D.O. de N 72 = 0.355

$$\begin{array}{r} 8.08 \mu\text{g de prot.} \text{ ----- } 0.355 \\ 100.00 \mu\text{g de prot.} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$x = 4.388 \text{ Unidades Específicas / } 0.1 \times 10^6 \text{ PMN's.}$$

Cuenta de leucocitos totales.

1.- Se tomó el tubo de ensayo con 0.5 ml de sangre venosa ( ver página 22 ) y se llenó con sangre una pipeta de Thoma para glóbulos blancos hasta la marca de 0.5.

2.- Se limpió la sangre adherida en el exterior de la pipeta con una gasa.

3.- Se completó hasta la marca de 101 con líquido de Turk.

4.- Se homogeneizó y se agitó vigorosamente 2'.

5.- Se colocó el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer por uno de sus bordes y se depositó la muestra.

6.- Se dejó reposar de 2 a 4'.

7.- Se observó al microscópio y se contaron los leucocitos en los 4 cuadrantes de las esquinas de la cámara.

8.- Cálculos: Se empleó la siguiente fórmula

$$\# \text{ de glóbulos blancos/mm}^3 = \frac{N \times 20}{4 ( 1.0 \text{ mm} )^2 \times 0.1 \text{ mm}}$$

$$= N \times 50$$

Donde:

N = número de células contadas. .

4 = número de cuadrantes contados.

( 1.0 mm )<sup>2</sup> = área de cada cuadrado.

0.1 mm = altura de la cámara.

20 = dilución de la muestra.

Como la sangre se diluyó con 5 ml de solución de dextransa al 6% en Alsever, el resultado se multiplicó por el factor 1.33 que corrige el número de glóbulos blancos.

#### Cuenta diferencial de leucocitos.

1.- Se realizó un frotis de sangre periférica en un portaobjetos limpio y desengrasado.

2.- El frotis se secó al aire y se fijó durante 3' en metanol.

3.- Se tiñó con el colorante May-Grünwald durante 5'.

4.- Se lavó con agua de la llave.

5.- Se tiñó con el colorante de Giemsa durante 15'.

6.- Se lavó con agua de la llave.

7.- Se secó al aire en posición vertical.

8.- Por último se observó y fueron contadas las células al microscopio empleando el objetivo de inmersión.

## R E S U L T A D O S

Se estudió un grupo de 42 pacientes con Cáncer Cérvico - Uterino ( PC ) con un rango de edad de 30 a 70 años (  $\bar{x} = 51 \pm 12$  ), así como un grupo de 32 mujeres normales ( CN ) las cuales procedían en su mayoría de un estrato socioeconómico - bajo, presentando hábitos higiénicos y dietéticos así como sexuales semejantes a las de las PC, con un rango de edad de 20 a 60 años (  $\bar{x} = 37 \pm 15$  ) que se estudiaron con fines de comparación.

Los porcentajes individuales de inhibición del crecimiento bacteriano en la realización del ensayo microbicida aparecen enlistados en las tablas I y II, representándose gráficamente la combinación suero fresco y suero fresco más células de ambas poblaciones ( gráfica 1 ), sin encontrar diferencias.

Se anexa la curva tipo para proteínas. Los valores de proteína celular ( gráfica 2 ), así como la actividad enzimática de la mieloperoxidasa determinadas en leucocitos polimorfonucleares son reportados en la tabla III, comparando las poblaciones de CN y PC. En cuanto a los valores de proteína celular no se encontró diferencia estadísticamente significativa, mientras que los valores de mieloperoxidasa de los PC se encontraron disminuidos y estadísticamente diferentes respecto a los CN, con P menor a 0.005. Se expresa ésto en la gráfica 3.

En la tabla IV se muestran los datos de proteína celular

analizando la población de pacientes en subgrupos, ya sea por el tratamiento ( inicio o final ) o bien por el estadio clínico ( primario o avanzado ) sin encontrar diferencia significativa ( P mayor a 0.05 ). La gráfica 4, ilustra éstos resultados.

En la tabla V los valores de actividad enzimática fueron analizados en subgrupos por tratamiento y por estadio, donde no se observa diferencia estadísticamente significativa ( P mayor a 0.05 ). En la gráfica 5 se muestra estadios primarios o avanzados como grupo, sin considerar el tratamiento o bien como pacientes al inicio o final de su tratamiento, sin considerar el estadio.

En la tabla VII se muestran las cuentas diferenciales porcentuales, así como de sus leucocitos totales de PC donde su población de linfocitos se encuentra baja y la población de neutrófilos, lo mismo que de eosinófilos se encuentran altas con respecto a la población porcentual de CN ( tabla VI ); con una P menor a 0.005. No se encontró diferencia significativa en la población de leucocitos totales, ello se ilustra en las gráficas 6, 7, 8 y 9.

TABLA I. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE Escherichia coli INVASIVA POR EL SUERO Y LEUCOCITOS DE CONTROLES NORMALES.

U F C X 10 <sup>6</sup> *						
	Control	Suero i <sup>o</sup>	Suero	Células	Suero, i.+	Suero +
		0.2 ml.	0.2 ml	2 x 10 <sup>6</sup>	células.	células.
N33	14.34	11.18 22.0% <sup>o</sup>	0.72 94.9%.	16.58 0.0%	11.38 20.6%	0.86 94.0%
N34	14.34	10.90 24.0%	0.48 96.7%	13.24 0.0%	12.75 11.1%	0.39 97.3%
N37	2.45	1.43 41.6%	0.78 68.1%	1.57 35.8%	1.39 43.2%	0.31 87.3%
N39	6.30	11.36 0.0%	0.33 94.7%	18.39 0.0%	13.39 0.0%	0.24 96.1%
N40	6.30	21.00 0.0%	0.48 92.3%	6.87 0.0%	13.24 0.0%	0.48 92.3%
N41	8.92	24.64 0.0%	0.20 97.7%	13.63 0.0%	12.93 0.0%	0.04 99.4%
N42	9.75	13.27 0.0%	0.29 97.0%	6.39 34.4%	N.D. <sup>o</sup>	0.00 100.0%
N43	9.75	11.63 0.0%	0.00 100.0%	12.78 0.0%	13.32 0.0%	0.04 99.5%
N44	7.97	27.10 0.0%	0.29 96.3%	20.93 0.0%	20.71 0.0%	0.70 91.2%
N45	7.97	23.37 0.0%	0.43 94.6%	28.54 0.0%	27.30 0.0%	0.25 96.8%

\* UFC x 10<sup>6</sup> : Unidades formadoras de colonias en millones.

<sup>o</sup>Suero inactivado a 56°C durante 30'.

• Indica el porcentaje de inhibición, en relación al control que tiene únicamente la bacteria.

o N.D. : No determinado.

Suero :  
 $\bar{x} = 0.4 \times 10^6 \pm 0.23 \times 10^6$   
 $\bar{x} = 94.35\% \pm 8.56\%$

Suero + células:  
 $\bar{x} = 0.33 \times 10^6 \pm 0.28 \times 10^6$   
 $\bar{x} = 96.26\% \pm 3.94\%$

TABLE II. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* INVASIVA POR EL SUERO Y LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CaCu.

U F C X 10 <sup>6</sup> ☆						
	Control	Suero i. <sup>o</sup> 0.2 ml.	Suero 0.2 ml	Células 2 x 10 <sup>6</sup>	Suero i.+ células.	Suero + células.
P33	3.25	2.95 9.2% <sup>θ</sup>	0.00 100.0%	2.00 38.4%	2.20 32.3%	0.00 100.0%
P34	3.25	2.70 16.9%	0.14 95.6%	3.80 0.0%	2.45 24.6%	0.36 88.9%
P35	8.92	16.66 0.0%	0.09 98.9%	11.39 0.0%	14.17 0.0%	0.11 98.7%
P36	13.82	18.14 0.0%	0.14 98.9%	35.00 0.0%	27.60 0.0%	0.07 99.4%
P37	13.82	34.50 0.0%	0.04 99.7%	32.85 0.0%	18.30 0.0%	0.14 98.9%
P39	15.93	23.88 0.0%	0.06 99.5%	N.D.	N.D.	0.19 99.8%
P40	16.61	30.84 0.0%	4.10 75.3%	29.60 0.0%	26.88 0.0%	0.36 97.8%
P41	36.43	N.D. <sup>φ</sup>	0.21 99.4%	40.44 0.0%	36.30 0.0%	0.00 100.0%
P42	36.43	N.D.	0.00 100.0%	50.46 0.0%	N.D.	0.00 100.0%
P44	32.30	30.25 0.0%	0.58 92.2%	45.68 0.0%	45.60 0.0%	0.53 98.3%
P45	5.48	12.70 0.0%	2.19 60.0%	N.D.	22.60 0.0%	0.51 90.6%
P46	5.48	15.70 0.0%	1.84 64.4%	N.D.	24.85 0.0%	1.28 76.6%
P51	3.94	9.66 0.0%	10.30 0.0%	5.34 0.0%	4.75 0.0%	3.24 17.7%

☆UFC x 10<sup>6</sup> : Unidades formadoras de colonias en millones.

● Suero inactivado a 56°C durante 30'.

θ Indica el porcentaje de inhibición, en relación al control que tie ne únicamente la bacteria.

φ N.D. : No determinado.

$$\begin{aligned} \text{Suero : } \bar{x} &= 1.51 \times 10^6 \pm 2.91 \times 10^6 \\ &\bar{x} = 91.61 \% \pm 14.6 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Suero + células : } \\ \bar{x} &= 0.52 \times 10^6 \pm 0.88 \times 10^6 \\ \bar{x} &= 96.2 \% \pm 9.77 \% \end{aligned}$$

TABLA III. ACTIVIDAD DE MIBIOPEROXIDASA EN CELULAS DE CONTROL  
 LES NORMALES Y PACIENTES CON CaCU.

	Unidades $1 \times 10^5$ PMN's <sup>θ</sup>	Unidades especificas		Unidades $1 \times 10^5$ PMN's	Unidades especificas <sup>φ</sup>
N 63	0.232	8.033	P 53	0.300	8.090
N 65	0.355	10.233	P 54	0.170	4.240
N 67	0.265	7.860	P 55	0.170	3.320
N 72	0.355	4.380	P 56	0.195	3.400
N 73	0.242	6.080	P 57	0.220	3.950
N 75	0.227	7.500	P 58	0.167	3.970
N 76	0.170	5.310	P 59	0.197	6.890
N 79	0.222	5.500	P 60	0.192	2.930
N 80	0.225	4.550	P 61	0.247	1.040
N 81	0.157	10.000	P 62	0.207	1.670
N 84	0.260	4.130	P 63	0.277	3.040
N 86	0.230	3.720	P 66	0.220	1.606
N 97	0.200	3.504	P 67	0.255	4.427
			P 68	0.155	3.376
			P 69	0.235	1.176
			P 70	0.255	1.448
			P 71	0.190	1.334
			P 72	0.260	1.532
			P 73	0.255	2.792
			P 74	0.16	3.270
			P 75	0.255	3.258
n	13	13		21	21
$\bar{x}$	0.241	6.215		0.218	3.178
SD	0.058	2.301		0.042	1.797

θ Una unidad: es la cantidad de células o proteína celular necesaria para producir un cambio en densidad óptica (D.O.) de 1.0 bajo las condiciones descritas para el ensayo con ortodiansidina.

φ Una unidad específica: es el número de unidades de enzima por 100 microgramos de proteína, determinada por el método de Lowry.

TABLA IV. UNIDADES DE PROTEINA CELULAR EN  $1 \times 10^5$  PMN's  
DE ACUERDO AL TRATAMIENTO Y ESTADIOS DE SEVERIDAD EN PC.

Unidades  $1 \times 10^5$  PMN's \*

		Inicio	Termino				
Estadio primario							
P 57	I B	0.220					
P 66	I B		0.220				
P 58	II B	0.167					
P 63	II B	0.277					
P 67	II B		0.255				
P 69	II B		0.235				
P 75	II B		0.255				
Estadio avanzado							
P 53	III B	0.300					
P 54	III B	0.170					
P 55	III B		0.170				
P 56	III B	0.195					
P 59	III B		0.197				
P 60	III B		0.192				
P 61	III B	0.247					
P 62	III B		0.207				
P 70	III B		0.255				
P 71	III B	0.190					
P 73	III B	0.255					
P 74	III B	0.160					
Tratamiento				Estadio			
	n	$\bar{x}$	SD		n	$\bar{x}$	SD
inicio	12	0.221	0.046	primario	7	0.232	0.035
termino	9	0.210	0.034	avanzado	12	0.211	0.043

\*Una unidad: es la cantidad de células o proteína celular necesaria para producir un cambio en densidad óptica (D.O.) de 1.0 bajo las condiciones descritas para el ensayo con ortodiansidina.

TABLA V. RELACION DE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE MIBIOPEROXIDASA POR TRATAMIENTO Y ESTADIOS - DE SEVERIDAD EN PC.

Unidades específicas.\*

		Inicio	Termino				
Estadio primario							
P 57	I B	3.950					
P 66	I B		1.606				
P 58	II B	3.970					
P 63	II B	3.040					
P 67	II B		4.427				
P 69	II B		1.176				
P 75	II B		3.258				
Estadio avanzado							
P 53	III B	8.090					
P 54	III B	4.240					
P 55	III B		3.320				
P 56	III B	3.400					
P 59	III B		6.890				
P 60	III B		2.930				
P 61	III B	1.040					
P 62	III B		1.670				
P 70	III B		1.448				
P 71	III B	1.334					
P 73	III B	2.792					
P 74	III B	3.270					
Tratamiento				Estadio			
	n	$\bar{x}$	SD		n	$\bar{x}$	SD
Inicio	12	3.335	1.837	Primario	7	3.061	1.237
Termino	9	2.269	1.829	Avanzado	12	2.589	1.042

\*Una unidad específica: es el número de unidades de enzima por 100 microgramos de proteína, determinada por el método de Lowry.

TABLA VI. CUENTAS DIFERENCIALES DE CONTROLES NORMALES.

	N 33	N 34	N 37	N 39	N 40	N 41	N 42	N 43	N 44	N 45
L.T.	6616	5985	5250	6300	6000	5400	6000	5400	6700	7150
Lin.	48	28	45	34	46	28	64	54	40	22
Neu.	46	69	50	61	50	65	31	36	59	78
Mon.	3	0	2	2	2	2	2	5	0	0
Eos.	2	2	1	1	1	3	1	0	1	0
Bas.	2	0	0	1	0	1	2	3	0	0
Ban.	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0

	N 46	N 47	N 54	N 61	N 67	N 68	N 69	N 72	N 73	N 75
L.T.	6700	7000	6650	6600	6850	7250	6450	6910	6650	8500
Lin.	55	51	55	38	54	53	43	31	54	35
Neu.	39	36	37	59	44	41	54	65	43	58
Mon.	4	2	1	1	1	5	3	3	1	4
Eos.	0	7	3	0	1	0	1	1	2	3
Bas.	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Ban.	2	4	4	2	0	1	0	0	0	0

	N 76	N 79	N 80	N 81	N 84	N 86	N 88	N 92	N 93	N 94
L.T.	5585	4780	4700	9300	4500	5100	5500	6650	4860	6250
Lin.	51	38	32	56	35	42	54	53	52	43
Neu.	46	54	64	36	62	53	45	45	42	55
Mon.	1	1	2	6	2	3	1	1	5	1
Eos.	2	2	0	2	0	2	1	1	1	0
Bas.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ban.	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1

	N 95	N 97
L.T.	6650	5500
Lin.	49	36
Neu.	46	59
Mon.	0	3
Eos.	1	3
Bas.	0	0
Ban.	4	0

	n	$\bar{x}$	SD
Leucocitos Totales / $\text{mm}^3$ (L.T.)	32	6510	1369
Linfocitos % (Lin.)	32	44.3	10.3
Neutrófilos % (Neu.)	32	50.8	11.4
Monocitos % (Mon.)	32	2.2	1.6
Eosinófilos % (Eos.)	32	1.4	1.4
Basófilos % (Bas.)	32	0.3	0.7
Bandas % (Ban.)	32	0.9	1.2

TABLA VII. CUENTAS DIFERENCIALES DE PACIENTES CON CaCu.

	P 33	P 34	P 35	P 36	P 37	P 38	P 39	P 40	P 41	P 42
L.T.	9640	9110	4000	4750	4200	6650	3750	4500	4700	5000
Lin.	40	30	20	11	11	13	28	41	39	29
Neu.	52	66	72	81	72	83	70	47	41	58
Mon.	1	2	1	4	2	2	1	5	2	3
Eos.	5	0	3	1	13	1	1	0	16	10
Bas.	1	1	1	0	2	0	0	0	0	0
Ban.	1	0	2	3	0	3	0	2	1	0

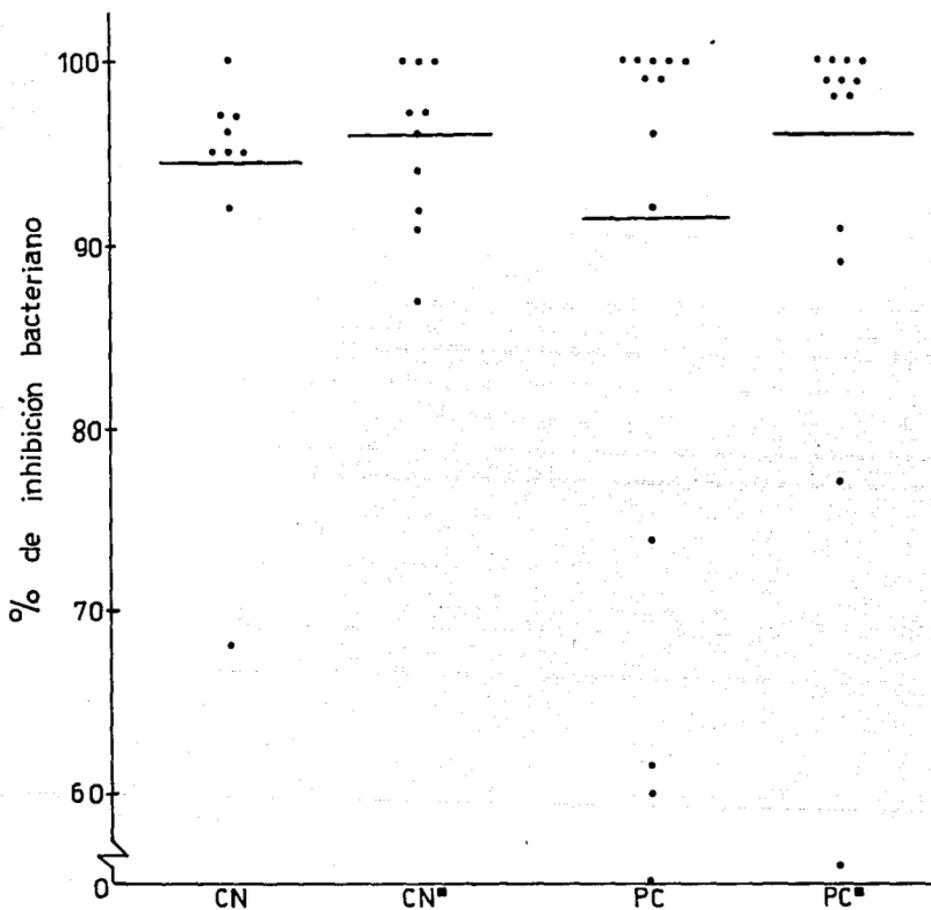
	P 44	P 45	P 47	P 48	P 49	P 50	P 51	P 52	P 53	P 54
L.T.	4650	6185	7850	5950	8780	3590	5050	5920	6650	10640
Lin.	39	23	13	34	32	9	42	38	21	14
Neu.	52	53	77	61	67	77	50	65	73	78
Mon.	2	8	4	4	2	9	3	4	2	2
Eos.	2	4	0	1	0	4	5	19	7	4
Bas.	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Ban.	4	1	5	0	0	1	1	1	0	2

	P 55	P 56	P 57	P 58	P 59	P 60	P 61	P 62	P 63	P 64
L.T.	5590	6650	5520	5450	3060	8850	10100	3390	5450	6850
Lin.	21	35	23	23	29	17	13	5	35	22
Neu.	63	54	74	62	71	75	79	85	56	72
Mon.	10	1	1	2	0	3	2	1	4	3
Eos.	0	7	0	5	0	5	7	4	2	2
Bas.	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Ban.	0	2	2	2	0	2	0	0	3	1

	P 65	P 76	P 67	P 68	P 69	P 70	P 71	P 72	P 73	P 74
L.T.	7980	6190	4909	6300	3460	2400	8050	8910	9510	5650
Lin.	29	19	12	50	22	6	36	27	17	28
Neu.	65	81	73	44	72	83	60	70	82	72
Mon.	3	0	1	2	4	3	3	3	1	0
Eos.	3	0	12	4	1	8	0	0	0	0
Bas.	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Ban.	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0

	n	$\bar{x}$	SD
Leucocitos totales / mm <sup>3</sup> (L.T.)	41	6120	2045
Linfocitos % (Lin.)	41	24.9	12.2
Neutrófilos % (Neu.)	41	67.2	12.7
Monocitos % (Mon.)	41	2.8	2.2
Eosinófilos % (Eos.)	41	3.9	4.6
Basófilos % (Bas.)	41	0.2	0.5
Bandas % (Ban.)	41	1.0	1.2

GRAFICA 1: Porcentaje de inhibición bacteriano de CN y PC, en los sistemas suero activo y suero activo con células.



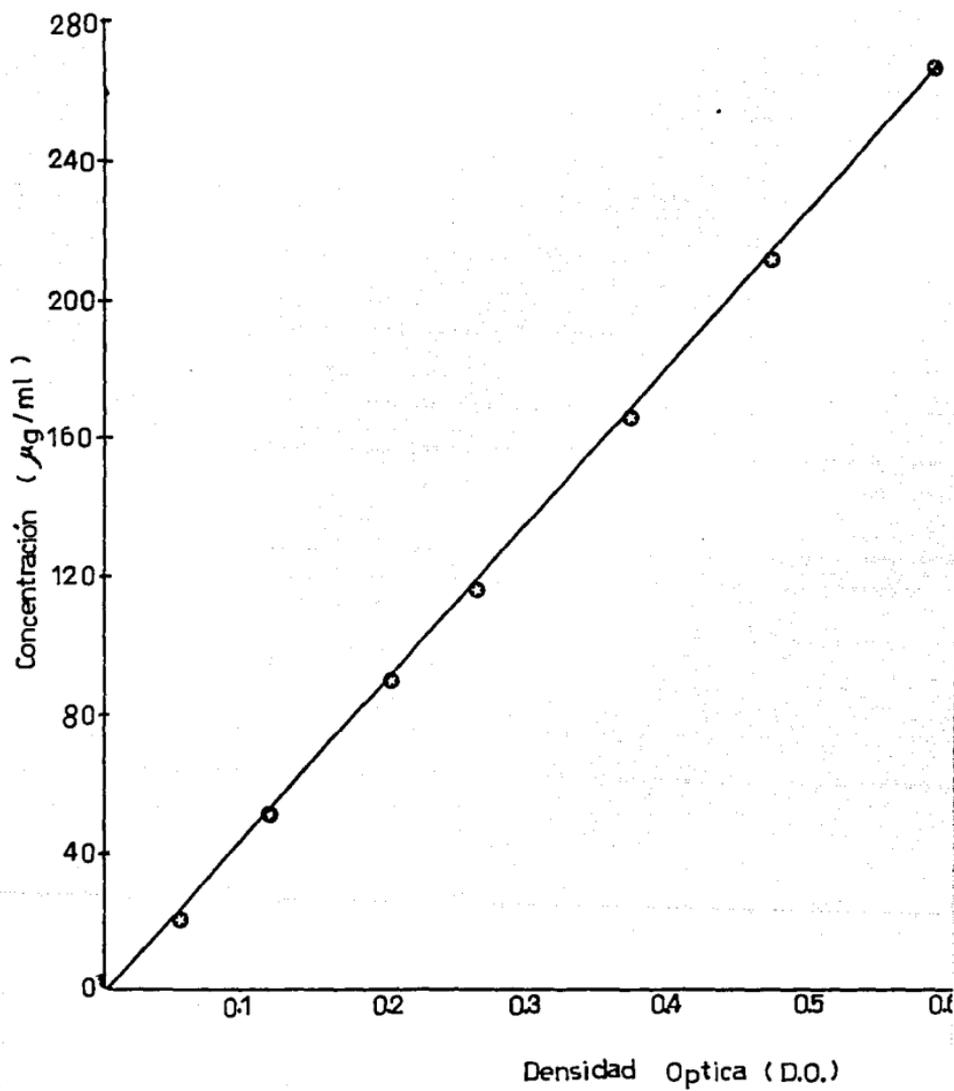
CN: Suero Controles Normales.

PC: Suero Pacientes con CaCU.

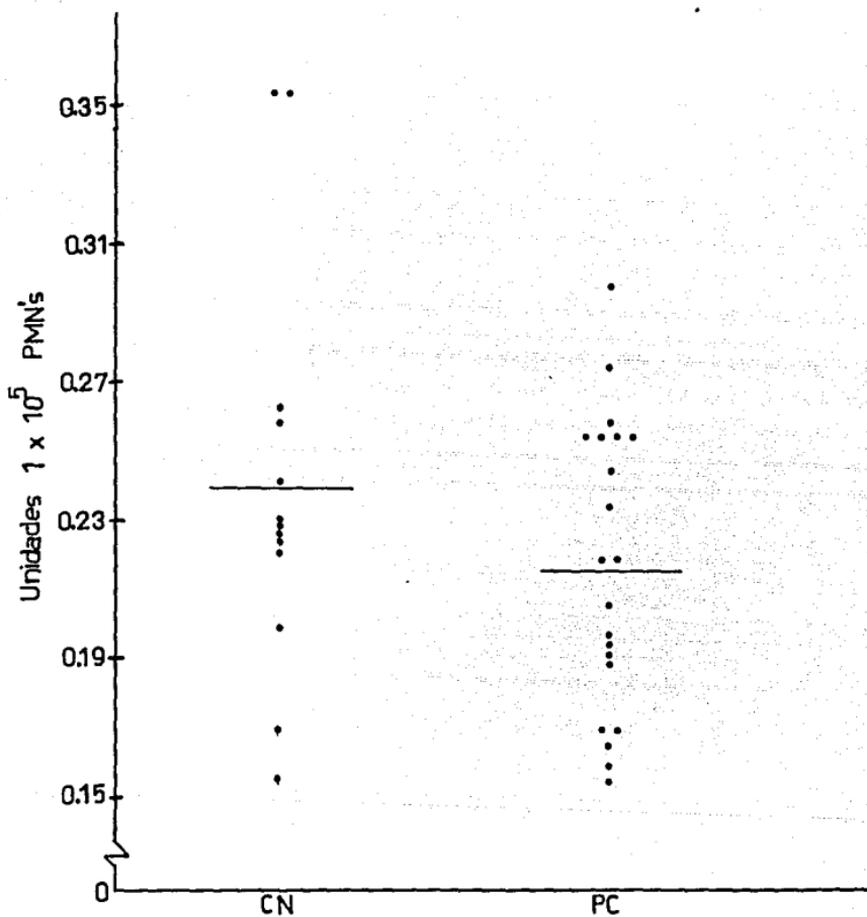
CN<sup>■</sup>: Suero más células Controles Normales.

PC<sup>■</sup>: Suero más células Pacientes con CaCU.

Curva de calibración para proteínas.



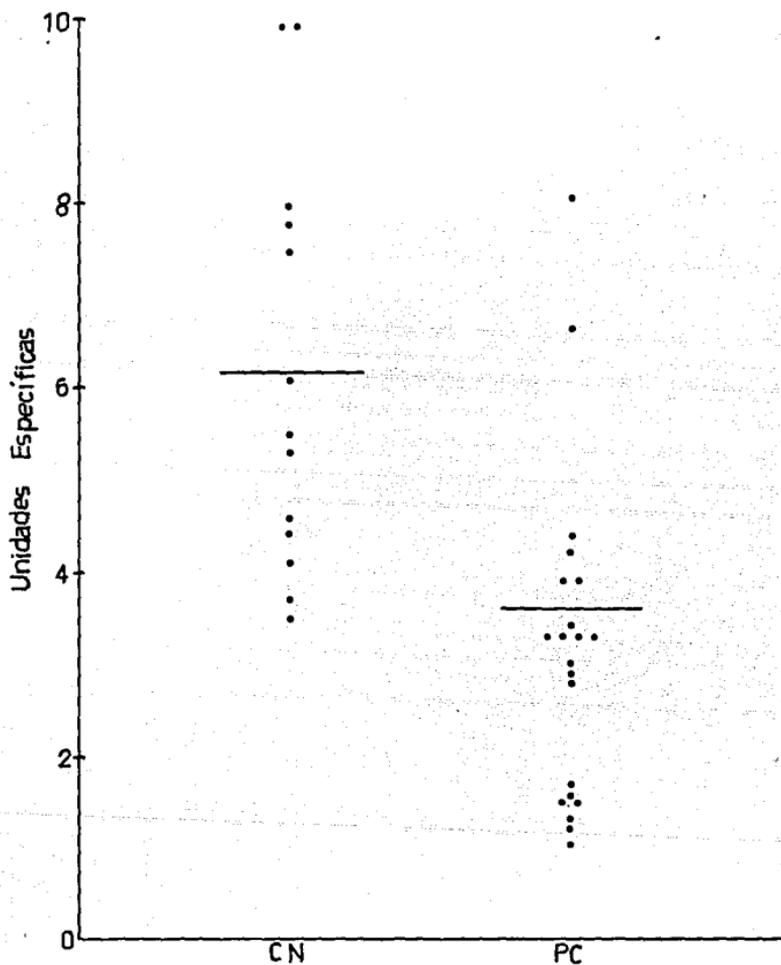
GRAFICA 2: Unidades de proteína celular en  $1 \times 10^5$   
PMN's de CN y PC.



CN: Controles Normales.

PC: Pacientes con CaCU.

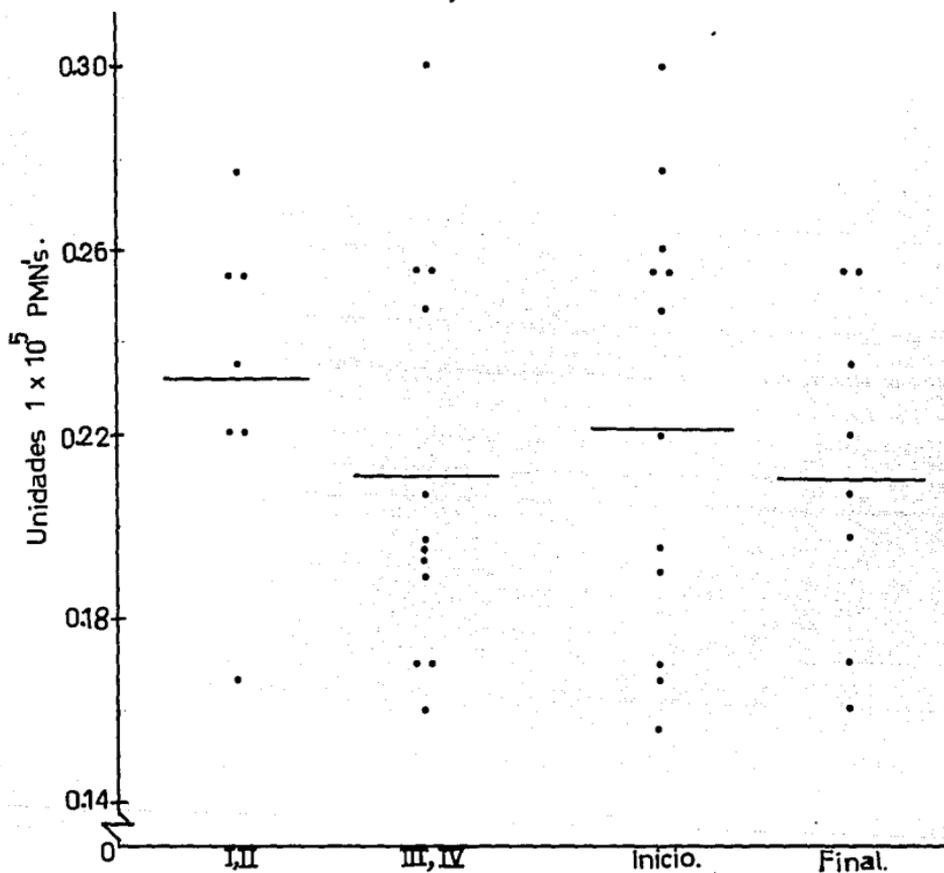
34  
GRAFICA 3 : Relación de los niveles de actividad enzimática de mieloperoxidasa en CN y PC.



CN : Controles Normales.

PC : Pacientes con CaCU.

GRAFICA 4: Unidades de proteína celular en  $1 \times 10^5$  PMN's de acuerdo a los estadios de severidad y al tratamiento de los PC.



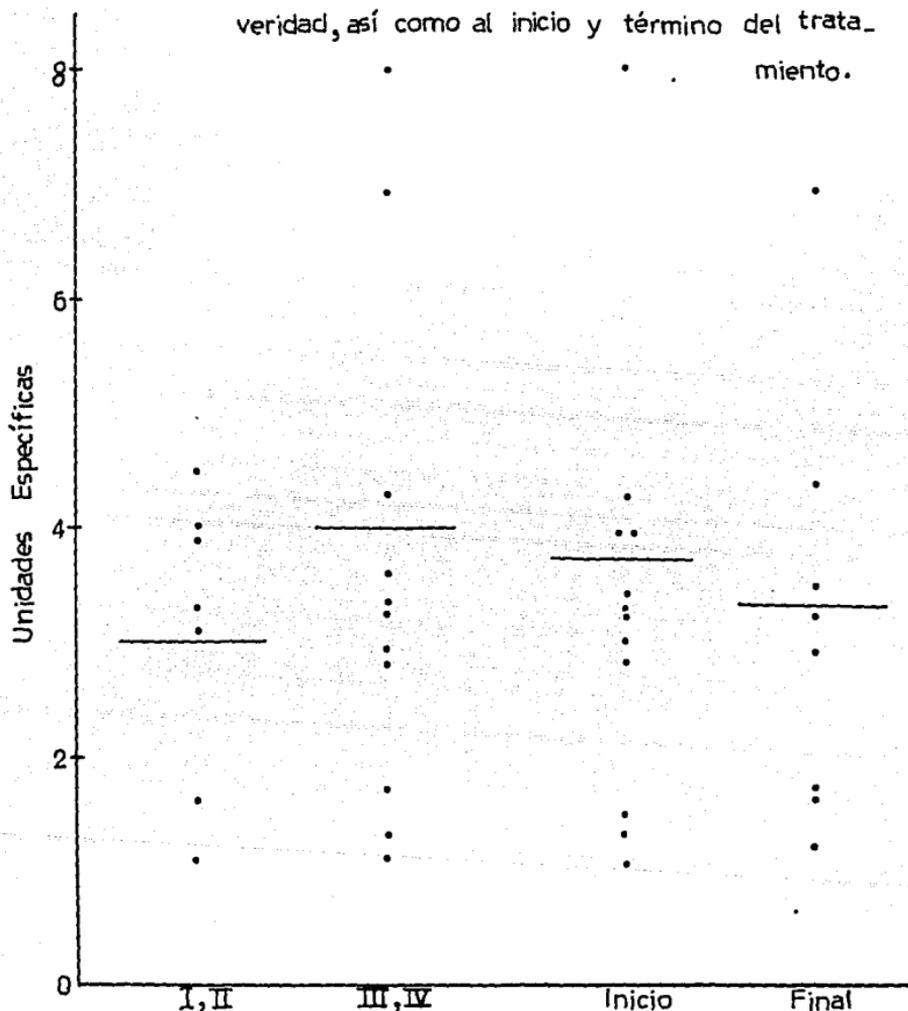
PC : Pacientes con CaCU.

I,II: Estadios primarios.

III,IV: Estadios avanzados.

Inicio y Final: Antes y después del tratamiento.

GRAFICA 5 : Relación de niveles de actividad enzimática de mieloperoxidasa en PC en estadios de severidad, así como al inicio y término del tratamiento.



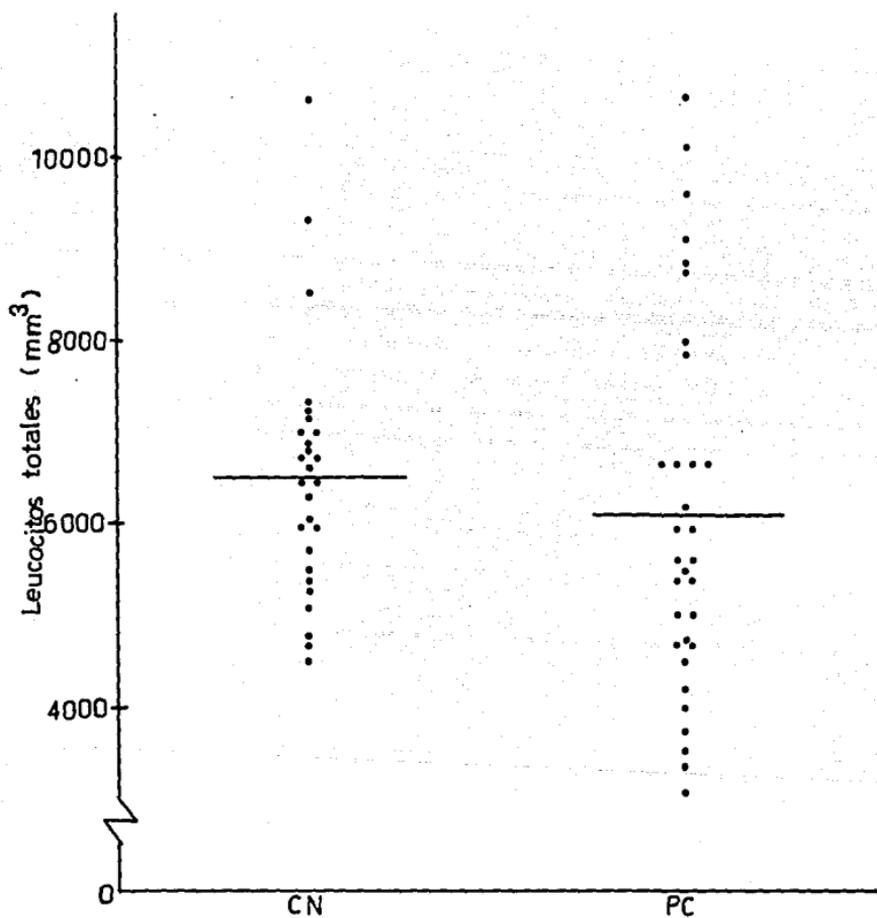
PC : Pacientes con CaCU.

I, II: Estadios primarios.

III, IV: Estadios avanzados.

Inicio y Final : Antes y después del tratamiento.

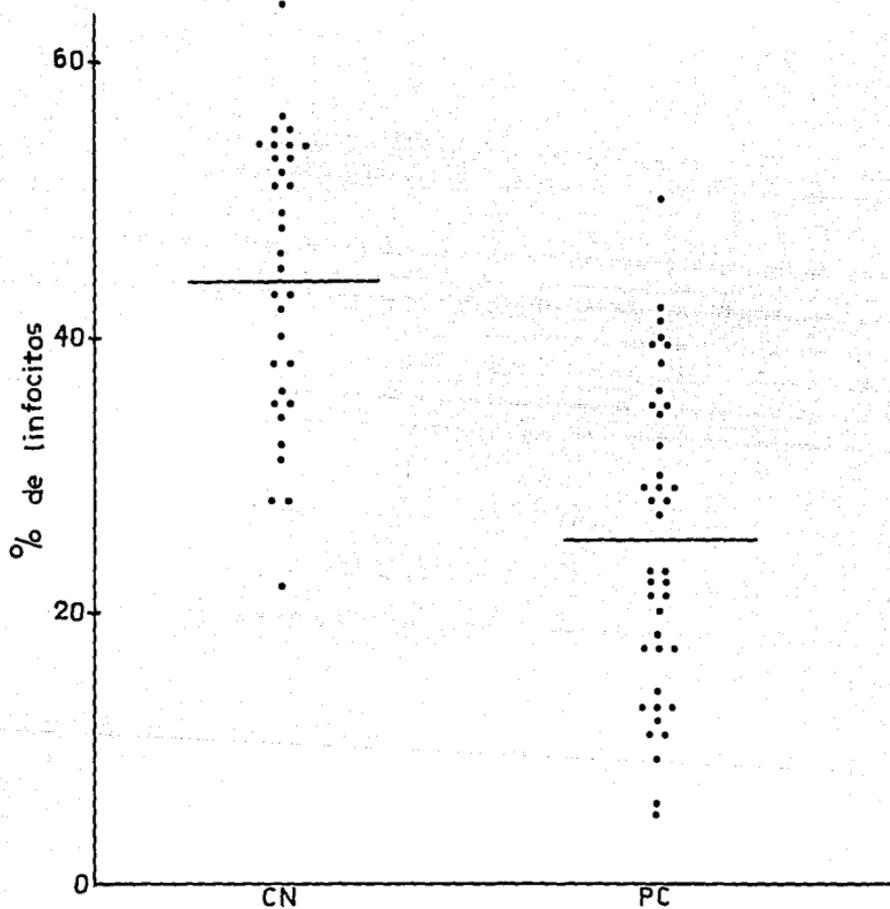
GRAFICA 5: Relación de cuentas totales de leucocitos de CN y PC.



CN: Controles Normales.

PC: Pacientes con CaCU.

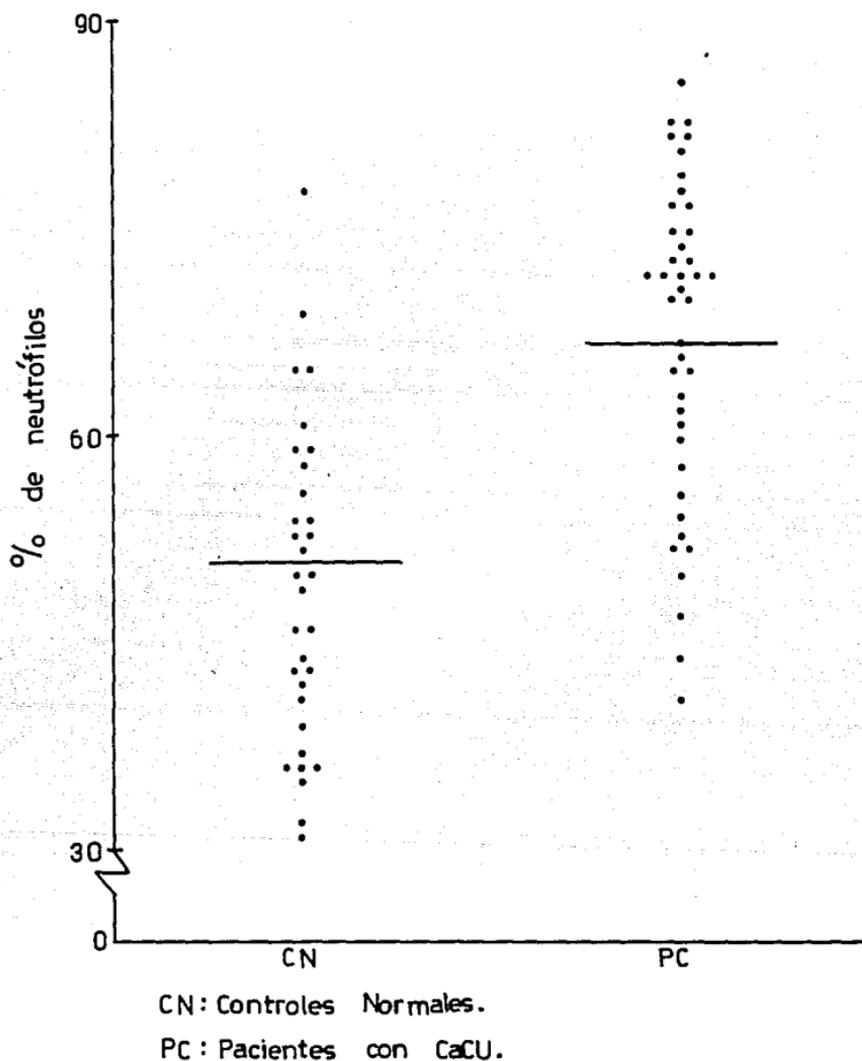
GRAFICA 7: Relación del porcentaje de linfocitos de CN y PC.



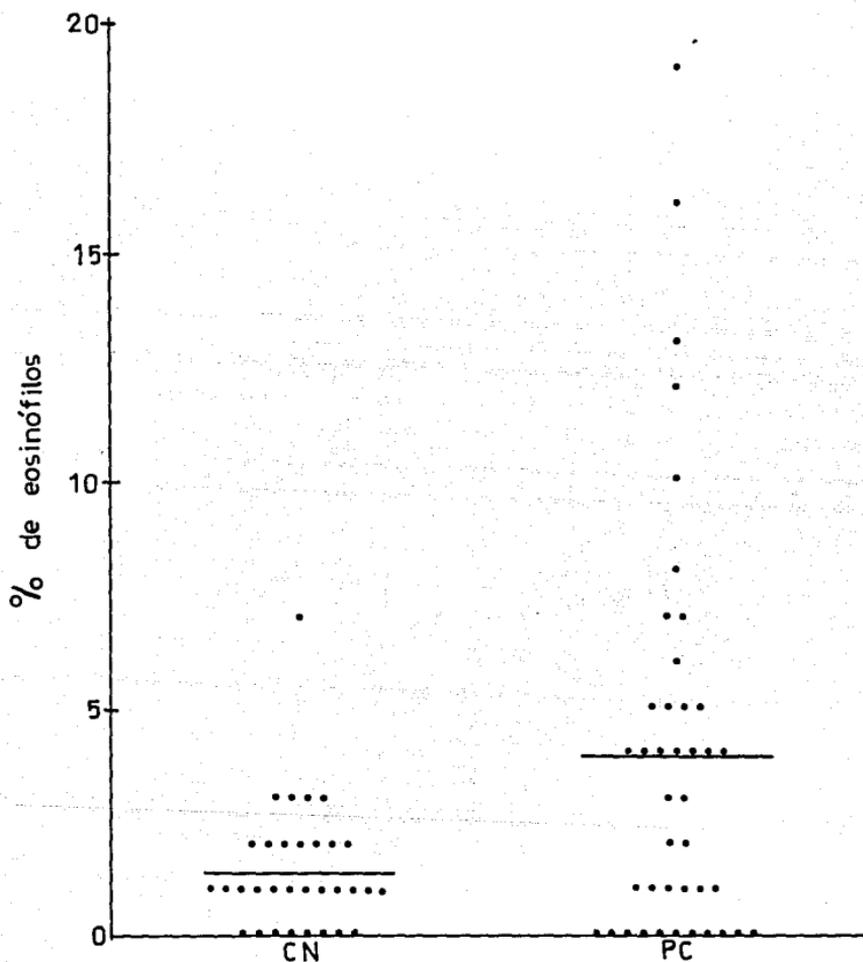
CN: Controles Normales.

PC: Pacientes con CaCU.

GRAFICA 8 : Relación del porcentaje de neutrófilos de  
CN y PC.



GRAFICA 9 : Relación del porcentaje de eosinófilos de CN y PC.



CN: Controles Normales.

PC: Pacientes con CaCU.

## DISCUSION DE RESULTADOS

Existen muchas formas diferentes de como un conjunto de células tumorales podrían escapar del control del huésped. En la actualidad el conocimiento de los diversos aspectos del equilibrio inmunitario entre el tumor y el huésped se van estudiando poco a poco. Por razones de morbilidad y mortalidad, los estudios inmunológicos siguen cobrando gran relevancia en nuestro país y resulta obvio la necesidad de incrementar los esfuerzos para mejorar nuestra visión del padecimiento, con el fin de poder brindar un mejor futura para la enferma.

Una consecuencia del progreso en el conocimiento de los mecanismos relacionados con el desarrollo del tumor, ha sido el avance en conceptos que sostienen que una respuesta inmune puede ser protectora en vez de destructiva. De ahí la importancia de analizar los factores que corresponden a la inmunidad humoral, e inmunidad celular así como aquello que constituye la respuesta inmune inespecífica y que es fundamental para eliminar a los organismos patógenos intracelulares y extra celulares, así como las células tumorales o extrañas al huésped.

Los resultados obtenidos indican que existe una comportamiento similar, tanto en las CN como en las PC, de la inhibición del crecimiento de la Escherichia coli invasiva al trabajar con sus leucocitos totales. Se observa que es fundamental la presencia del suero en el sistema, ya que este posee elementos que son capaces de opsonizar o lisar a la bacteria, siendo el efecto lítico el que se manifiesta en mayor proporción, ya que el sistema de complemento puede ser activado por

vía alterna o clásica. El efecto opsonizante no fué medido - ya que el suero por sí mismo tiene un efecto de la inhibición del crecimiento mayor del 90% ( ver gráfica 1 ). Se encontró un caso, PC 51 con estadio III en el término de su tratamiento, donde el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano - fué del 18% en la combinación suero activo con células, ello podría indicar que existe falla en los componentes microbicidas séricos. Sin embargo, como se trata de una sola paciente y no fué posible hacer una nueva determinación, no podemos elaborar conclusiones definitivas.

El suero inactivado por calentamiento no manifestó un efecto inhibitorio en el sistema. Es por tanto difícil sostener la afirmación de que el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano pudiera deberse a la presencia de agentes opsonizantes o agentes séricos termoestables. Probablemente por tratarse de una bacteria de tipo intracelular y agresiva es - que las células del huésped no pueden por sí solas influir en la inhibición de su crecimiento, requiriendo para ello de un agente opsonizante. En este momento cabe señalar que se realizó un trabajo experimental relacionado, donde se expuso a - los leucocitos totales de pacientes con enfermedad infecciosa aguda y como controles normales a leucocitos de sus familia- res, con Escherichia coli invasiva. Para ello se empleó como agente opsonizante al plasma AB Rh negativo el cual presentaba un efecto inhibitor del 90% ( plasma activo ) y que al inactivarlo por calor su efecto inhibitor disminuía hasta el - 0% ( plasma inactivo ). Para que este plasma pudiera servir

como agente opsonizante, hubo la necesidad de realizar una ci  
nética microbicida con el plasma en diferentes diluciones en  
solución salina 0.85%, encontrando la dilución óptima de 1:10  
que manifestó un efecto inhibitorio del 0%, pero que al aña--  
dir las células, bien fuesen del paciente problema o del con-  
trol normal, el efecto microbicida aumentaba al 52% para los  
pacientes y hasta al 60% para los controles normales. Debido  
a que este nuevo sistema nos determina más el efecto celular  
es tentativo aplicarlo a los pacientes con CaCU para así po--  
der observar una posible alteración celular ( ver tabla VIII )

Uno de los factores de tomar en cuenta es la necesidad -  
de las células cancerosas de obtener nutrientes a expensas -  
del huésped compitiendo con las células sanas, trayendo consig  
o la mala nutrición y desarrollo deficiente de éstas últimas,  
causando que se encuentren con baja cantidad del contenido -  
protéico incluyendo el equipo enzimático microbicida de los -  
polimorfonucleares y por lo tanto puede haber mal funciona--  
miento de ellos. Observando la gráfica 2, vemos que no exis-  
te diferencia en las Unidades de proteína celular en las PC y  
CN. Sin embargo, el aumento en las poblaciones celulares de  
neutrófilos y eosinófilos en las PC ( gráficas 8 y 9 ) hacen  
pensar que el verdadero contenido protéico está enmascarado -  
por estas elevaciones celulares indicando con ésto, que el -  
rango de proteína celular se normaliza.

Diversos mecanismos antimicrobianos han sido descritos -  
en los PMN's. Dentro de ellos, los de tipo oxidativo resul-  
tan de fundamental importancia puesto que dentro de la fagocil

tosis se generan productos de reducción del oxígeno que en presencia de la enzima mieloperoxidasa y un haluro originan un sistema muy potente con la formación de agentes tóxicos que atacan tanto a los microorganismos como a las células tumorales. Considerando que el método para la determinación de la mieloperoxidasa ha sido empleado en trabajos experimentales, y ha mostrado una sensibilidad adecuada presuimos que nuestros resultados indican una deficiencia de la actividad de la mieloperoxidasa en las células PMN's de las pacientes con CaCU. Sin embargo, esta deficiencia probablemente no se refleje en la evolución clínica ni necesariamente indique una falla en la eliminación de la bacteria, puesto que las células pueden emplear mecanismos de tipo oxidativo y no oxidativo además de que existe un incremento en la población de neutrófilos y eosinófilos en circulación de las pacientes.

El método empleado para la determinación de la actividad enzimática utiliza como donador de hidrógeno a la ortodiansidina ( 23 ) que también cuantifica la actividad de la mieloperoxidasa de los eosinófilos ( EPO ). Como se refleja en las cuentas diferenciales, conforme el estado canceroso avanza, la eosinofilia aumenta, y ello podría implicar un aumento de la enzima EPO. Si dicha enzima pudiera ser inhibida, la deficiencia de MFO sería más marcada. Una técnica realizada por Cramer y cols. en 1984 trabajando con pacientes deficientes en MFO y teniendo éste mismo problema, emplearon el reactivo químico 3-amino-1, 2, 4-triazol ( AMT ) que inhibe completamente la actividad de la EPO y lo hace sólo ligeramente

en la actividad catalítica de la MPO cuando esta se encuentra parcialmente purificada. Por lo tanto, sugerimos el uso de este reactivo.

En la determinación de la actividad enzimática de la MPO tuvieron que influir diversos factores para poder llegar a una estandarización adecuada, inicialmente se cuantificaba esta enzima en leucocitos totales. En la primera serie de muestras de PC y CN se encontró una paciente que mostró una actividad de 0.0428 U.E. que comparado con los mismos PC y CN presentaba una actividad muy baja; ello obligó el empleo de un agente químico que liberara el contenido enzimático en su totalidad, siendo éste el detergente bromuro de acetil trimetil amonio ( CTAB ) y si tomamos en cuenta que la MPO se localiza en el equipo enzimático de los PMN's, se optó el paso de los leucocitos totales a través de solución de Ficoll-Hypaque, procediendo a realizar una serie de determinaciones para tener la cantidad ideal de PMN's y del detergente CTAB. Debido a que el periodo de estandarización nos llevó tiempo, sólo se tuvieron dos series de muestras para PC y CN en la determinación enzimática.

TABLA VIII. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE Escherichia coli INVASIVA  
 POR LEUCOCITOS TOTALES DE CONTROLES NORMALES Y PACIENTES  
 CON ENFERMEDAD INFECCIOSA AGUDA.

	UFC X $10^{6\star}$	% de inhibición <sup>•</sup>
Control	7.07	
Plasma activo	0.98	87.40
Plasma diluido 1:10	21.14	0.00
Plasma inactivo*	29.14	0.00
Controles normales		
a) Plasma diluido 1:10 + 2 X $10^6$ leucocitos	9.05	60.36
b) 2 X $10^6$ leucocitos	42.30	0.00
Pacientes con enfermedad infecciosa aguda.		
a) Plasma diluido 1:10 + 2 X $10^6$ leucocitos	10.45	51.91
b) 2 X $10^6$ leucocitos	47.70	0.00

★UFC X  $10^6$ : Unidades formadoras de colonias en millones.

El plasma AB Rh ( - ) fué utilizado como agente opsonizante.

\*El plasma AB Rh ( - ) fué inactivado con calor a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30'.

•Indica el porcentaje de inhibición, en relación al control que tiene únicamente la bacteria.

Estadísticamente no se encontró diferencia significativa, entre los controles normales y los pacientes con una P mayor a 0.05.

## CONCLUSIONES

El sistema microbiciida utilizado nos permitió valorar como un todo a los factores de la respuesta inmune inespecifica de las pacientes con CaCU comparado con un grupo de controles normales. Ello se hizo empleando una bacteria para medir el control de crecimiento en función de la actividad de elementos celulares ( leucocitos de sangre periférica ) con o sin la presencia de suero de manera que nos reflejara en forma más cercana la función " in vivo ". Se encontró que es fundamental la presencia de elementos séricos microbicidas ( manifestándose en mayor proporción el efecto lítico ) para la eliminación de la bacteria. La fase de opsonización dentro del proceso de fagocitosis no fué posible medirla propiamente debido al porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano tan alto que presentaba el suero. En vista de que la cepa bacteriana utilizada actúa de forma intracelular y es muy agresiva, la célula del huésped no logra eliminarla por sí misma, aparentemente. Se llevó a cabo un proceso de estandarización de esta fase, logrando establecerla en pacientes con enfermedad infecciosa aguda donde se observó el efecto celular deseado. Se recomienda el uso de este nuevo sistema en las pacientes con CaCU, para observar una posible alteración celular.

En el método empleado para la determinación enzimática de la MPO se logró establecer la cantidad ideal de PMN's, así como la cantidad del detergente CTAB que nos liberara más completamente el contenido enzimático de éstos. De acuerdo a la sensibilidad de éste método y su aplicación en otros trabajos

experimentales consideramos que se demostró una baja en dicha actividad enzimática de la MPO en las pacientes con respecto a los controles, siendo significativos de acuerdo al análisis de datos realizado por medio de la prueba " t " de Student. Estudios citoquímicos realizados en otras pacientes que sufren esta enfermedad, realizado por otros investigadores ( 5, 6,10 ) concuerdan con nuestros resultados.

La correlación entre el ensayo microbicida y la actividad enzimática de la MPO de los leucocitos PMN's no se logró hacer evidente debido al efecto del suero y el poco efecto celular en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Como simple observación, las cuentas diferenciales reflejan que conforme el estado canceroso avanza, el porcentaje de población de eosinófilos se eleva. Esta elevación se manifiesta antes y después del tratamiento. Nuestros resultados además indican disminución en el porcentaje de población de linfocitos y aumento del porcentaje de población de neutrófilos así como de eosinófilos, siendo estadísticamente significativo respecto a los controles normales de acuerdo al análisis de datos realizado por medio de la prueba " U " de Mann Whitney.

Los resultados obtenidos coinciden en algunos aspectos con los reportes de otros autores. Sin embargo, la no diferencia encontrada en la cuenta de leucocitos totales, quizá se deba a las condiciones metodológicas empleadas por cada grupo de investigadores, así como diferencias entre los grupos de pacientes .

## A N E X O

### Preparación de reactivos.

#### Solución salina al 0.85%

- 1.- Se disolvieron 0.85 g. de cloruro de sodio en agua bi destilada.
- 2.- Se llevó a un volumen de 100 ml con agua bidestilada.
- 3.- Se esterilizó a 15 lb de presión / 15'.

#### Dextrana al 6%

- 1.- Se pesó 6 g de dextrana y se disolvió en 50 ml de so lución de Alsever.
- 2.- Se aforó a 100 ml con solución de Alsever.
- 3.- Se esterilizó a 10 lb de presión / 10'.

#### Solución de Alsever

- 1.- Se pesaron los siguientes reactivos:

Glucosa	20.5 g
Citrato de sodio dihidratado	8.0 g
Acido cítrico monohidratado	0.55 g
Cloruro de sodio	4.2 g
- 2.- Los anteriores reactivos se disolvieron en agua bi- destilada.
- 3.- Se aforó a un litro.
- 4.- Se esterilizó a 10 lb de presión / 10'.

#### Carbonato de sodio al 0.7%

- 1.- Se pesó 0.7 g de carbonato de sodio, se disolvió y - se llevó a un volumen de 100 ml con agua bidestilada.

2.- Esta solución se esterilizó a 15 lb de presión /15'.

Solución de Ficoll-Hypaque (  $d = 1.077 + 0.001 \text{ g/ml}$  ).

1.- Se pesó 9 g de Ficoll ( Type 70 No. F-2878. ) y se agregaron 100 ml de agua bidestilada. Se homogeneizó.

2.- Se midió 38.94 ml de Hypaque ( solución al 50% ) y se se adicionó 19.85 ml de agua bidestilada.

3.- Se mezcló 24 partes de la solución de Ficoll con 10 partes de la solución de Hypaque.

4.- La solución resultante se esterilizó empleando filtro millipore.

5.- La densidad fué determinada por un picnómetro.

Medio Mínimo Esencial o Medio TC 199 10x.

1.- De la solución concentrada se realizó una dilución 1:10 con agua bidestilada estéril.

2.- Se ajustó el pH aproximadamente a 7 con carbonato de sodio al 0.7% estéril, el vire a color canela fué indicativo de la neutralidad.

3.- Esta solución se usó para cultivo celular.

Agar soya tripticaseína.

1.- Se pesaron 40 g del medio de cultivo y se disolvieron en un litro de agua bidestilada.

2.- La mezcla se hirvió durante 15'.

3.- Se vertió en tubos con tapón de rosca de 15 x 150 mm y se esterilizó a 15 lb de presión / 15'.

Caldo soya tripticaseina.

- 1.- Se pesaron 30 g del medio de cultivo y se disolvieron en un litro de agua bidestilada.
- 2.- La mezcla anterior se hirvió durante 15'.
- 3.- Se esterilizó a 15 lb de presión / 15'.

Líquido de Turk.

- 1.- Se disolvió el equivalente a 1 g de ácido acético -glacial en 100 ml de agua destilada.
- 2.- Se pesó 1 g de cristal violeta y se disolvió en un poco de la solución anterior, y se llevó a un volumen de 100 ml.
- 3.- Esta solución se diluyó 1:10 para su uso.

Colorante de Giemsa.

- 1.- Se disolvió 2 g de Giemsa en 125 ml de metanol absoluto y 125 ml de glicerol.
- 2.- Se agitó durante 15' cuatro veces diarias durante 3 días.
- 3.- La solución finalmente se filtró y se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.
- 4.- Esta solución se diluyó 1:10 en agua destilada para su uso.

Colorante de May-Grünwald.

- 1.- Se pesaron los siguientes reactivos:  
Ácido cítrico 0.1 M ( 21.0 g / Lt )  
Fosfato monoácido de sodio 0.2 M ( 28.39 g / Lt )
- 2.- Se mezcló 85 ml del ácido cítrico 0.1 M con 115 ml de fosfato monoácido de sodio 0.2 M y 1 g del colorante May-Grün

wald ajustando el pH a 5.7.

3.- Se aforó a 1 lt.

4.- Se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

5.- Esta solución se diluyó 1:2 con agua destilada para su uso.

Colorante azul tripano.

1.- Se pesó 0.1 g de azul tripano y se disolvió en solución salina 0.85%.

2.- Se llevó a un volumen de 100 ml y se almacenó a temperatura ambiente para su uso.

Ortodianisidina 0.02 M.

La preparación se realizó en el momento de la determinación de la actividad enzimática.

1.- Se pesaron 15.85 mg de ortodianisidina ( SIGMA No. D 3252 ).

2.- Se disolvió en 2.5 ml de agua destilada.

Peróxido de hidrógeno 0.03 m.

La preparación se realizó en el momento de la determinación de la actividad enzimática.

1.- Se midió 0.145 ml de la solución original de peróxido de hidrógeno.

2.- Se adicionó 4.85 ml de agua destilada y se mezcló.

Hidróxido de sodio 0.1 N

- 1.- Se pesó 4 g de hidróxido de sodio y se disolvió en - agua destilada.
- 2.- Se aforó a 1 lt.

Tartrato de sodio y potasio al 2%.

- 1.- Se pesaron 2 g de tartrato de sodio y potasio.
- 2.- Se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Sulfato de cobre pentahidratado al 1%.

- 1.- Un gramo de sulfato de cobre pentahidratado se pesó.
- 2.- Se disolvió en 100 ml de agua destilada.

Bromuro de acetil trimetil amonio al 0.6%.

- 1.- Se pesaron 300 mg y se disolvieron en 50 ml de agua destilada.
- 2.- Se mezcló y se almacenó a 4°C.

Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.

- 1.- Se pesaron los siguientes reactivos:

Fosfato monoácido de sodio	53.72 g
Fosfato diácido de sodio	20.69 g
- 2.- Se añadió una parte del fosfato monoácido de sodio a 0.12 partes del fosfato diácido de sodio.
- 3.- Se corroboró el pH.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Aguilar-Santelises, M. Inmunología de tumores. 1984. Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología. II: 29-35.
- 2.- Allison, A. C. 1977. Immunological surveillance of tumors. Cancer Immunol. Immunother. 2: 151-155.
- 3.- Babior, B. M. 1978. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N. Engl. J. Med. 298: 659-668, 721-725.
- 4.- Baehner, R. L. & Boxer, L. A. 1979. Morphological and biochemical alterations of polymorphonuclear neutrophil (PMN) leukocytes from patients with in born errors of phagocytic function; a comprehensive review. En: Inborn errors of - immunity and phagocytosis. Güttler, F., Seakins, T. J. W. & Harkness, A. R. University Park Press Baltimore. 1a. Edición. p. 201.
- 5.- Becker, J., Behem, J., Lioning, T., Reichart, P. & Geerlings, H. 1985. Quantitative analysis of immunocompetent - cells in human normal oral and uterine cervical mucosa, - oral papillomas and leukoplakias. Arch. Oral. Biol. 30: - 257-264.
- 6.- Blicharski, J., Wolska, T., Zdvinczyk, A., Bodzoin, A., - Lisiewicz, J., Piotrowski, J. & Klimczyk, K. 1980. Enzymes of neutrophil in women with malignant tumors of reproductive organs. Folia. Histochem. Cytochem. 18: 173-182.
- 7.- Cech, P., Schneider, A. & Bachmann, F. 1982. Partial myelo peroxidase deficiency. Acta Haemat. 67: 180-184.
- 8.- Currie, G. A. 1975. El Cáncer y la respuesta inmunológica. Ed. El Manual Moderno S. A., 5a. Edición.
- 9.- David, R. J. 1975. Macrophage activation by lymphocyte me-

- diators. Federation Proc. 34: 1730-1736.
- 10.- Gierak, T., Lisiewicz, P., Moszczyński, J., Pilch & Namyśkowski, G. 1975. Enzymatic deficiencies of the immune system cells in patients with cancer of the larynx and other malignancies. *Auris Nasus Larynx*. 12: 47-51.
  - 11.- Henderson, W. R., Chi, E. Y., Jong, E. C. & Klebanoff, S. J. 1981. Mast cell-mediated tumor-cell cytotoxicity. Role of the peroxidase system. *J. Exp. Med.* 153: 520-533.
  - 12.- Hellstrom, J., Sjogren, H. O., Warnes, G. & Hellstrom, K. E. 1971. Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasm. *Int. J. Cancer*. 7: 226-237.
  - 13.- Hill, E. C. 1978. Disorders of the uterine cervix. In: Current Obstetric and Gynecologic diagnosis and treatment. Edited by R. C. Benson. Lange Medical Publications. Los Altos California.
  - 14.- Jong, E. C., Henderson, W. R. & Klebanoff, S. J. 1980. - Bactericidal activity of eosinophil peroxidase. *J. Immunol.* 124: 1378-1389.
  - 15.- Kjørstad, K. E. 1977. Carcinoma of the cervix in the young patients. *Obstet. Gynecol.* 50: 28-29.
  - 16.- Klebanoff, S. J. 1980. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.* 93: 480-489.
  - 17.- Klebanoff, S. J. 1967. Iodination of bacteria: A bactericidal mechanism. *J. Exp. Med.* 126: 1063-1078.
  - 18.- Koss, L. G. 1974. Epidemiology of the carcinoma of the uterine cervix. *Proceedings XI International Cancer Congress* 3: 307-313.

- 19.- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-268.
- 20.- Mathé, G. 1977. Immune status and Cancer chemotherapy efficacy. *Cancer Immunol. Immunoth.* 2: 81-83.
- 21.- Mckhann, F. C. & Yarlott, A. M. 1975. Tumor immunology. *J. Clin. Cancer.* 25: 187-197.
- 22.- Novak, R. M. 1982. *Patología Ginecología y Obstetricia*. Editorial Panamericana, 8a. Ed. Buenos Aires.
- 23.- Parry, M. F., Root, R. K., Metcalf, J. A., Delaney, K. K. Kaplow, L. S. & Richar, W. J. 1981. Myeloperoxidase deficiency. *Ann. Inter. Med.* 95: 293-301.
- 24.- Peterson, B. 1982. *Oncología*. Ed. Mir Moscú.
- 25.- Remington, R. D. & Schork, M. A. 1977. *Estadística Biométrica y Sanitaria*. Ed. Prentice / Hall Internacional.
- 26.- Rocklin, E. R., Bendtzen, K. & Greineder, D. 1980. Mediators of immunity. Lymphokines and monokines. *Adv. Immunol.* 29: 55-127.
- 27.- Rosenthal, A. S., Lipsky, P. E. & Sherach, E. M. 1975. Macrophage-lymphocyte interaction and antigen recognition. *Federation Proc.* 34: 1743-1748.
- 28.- Rotkin, I. D. & Cameron, J. R. 1968. Clusters of variables influencing risk of cervical cancer. *Cancer* 21: 663-671.
- 29.- Rozenberg, A. M., Salters, M. E. C., Strijp, A. G., Geuzc, J. J. & Verhoef, J. 1985. Electron microscopic study of phagocytosis of *Escherichia coli* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity.* 50: -

852-859:

- 30.- Seth, N. P., Balachandran, N., Malaviyal, A. N. & Kumar, R. 1979. Circulating immune complexes in carcinoma of - uterine cervix. *J. Exp. Immunol.* 38: 77-82.
- 31.- Stendahl, B. O., Cable, C. & Hed, J. 1984. Myeloperoxidase modulates the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophil leukocytes. Studies with cells from a myeloperoxidase-deficient patient. *J. Clin. Invest.* 73: 366-373.
- 32.- Stites, D., Stobo, J. & Fudenberg, H. 1985. *Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno, México.* 5a. Ed.
- 33.- Velázquez, L. J., Molina, E. J., Guillen, G. R. y Rodríguez, R. E. 1978. Radioterapia en cáncer cérvico uterino IIA y IIB. *Rev. Mex. Radiol.* 32: 167-176 y 189-194.
- 34.- *Worthington Enzyme Manual.* 1972. Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey, p. 43.