

34  
2 ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"



## SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN PACIENTES CON CANCER CERVICOUTERINO

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MARTHA F. MARTINEZ ZUNIGA



MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1989



## **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.

## CONTENIDO

1.	ABREVIATURAS	1
2.	INTRODUCCION	3
	La respuesta inmune.	3
	Cáncer Cérvico-Uterino.	9
	Vigilancia inmunológica.	13
3.	FUNDAMENTACION DEL PROBLEMA	20
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5.	OBJETIVOS	24
6.	HIPOTESIS	25
7.	MATERIAL Y METODOS	26
	Material biológico.	26
	Equipo de laboratorio.	26
	Material de consumo.	27
	Reactivos.	28
	Obtención de linfocitos.	31
	a) Linfocitos totales.	31
	b) Linfocitos T.	32
	c) Linfocitos NoT.	33
	Inmunofluorescencia.	34
	Sensibilización de eritrocitos de carnero.	34
	Cuenta diferencial.	39
	Cuenta de leucocitos.	39
	Formación de rosetas.	40
	a) Rosetas T.	40
	b) Rosetas Teet.	40
	Preparación de cubreobjetos con naranja de acridina.	41

8.	RESULTADOS	43
9.	DISCUSION DE RESULTADOS	81
10.	CONCLUSIONES	86
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88

A B R E V I A T U R A S

Ab = Anticuerpo.

Ag = Antígeno.

Ab-FITC<sup>+</sup> = Anticuerpos policlonales de cabra, anti-anti cuerpo de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína.

Mab = Anticuerpo monoclonal.

CaCU = Cáncer cérvico-uterino.

FIGO = Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.

CN = Controles normales.

PC = Pacientes con cáncer.

PCi = PC que inician tratamiento de radiación.

PCt = PC que terminan tratamiento de radiación.

Con-A = Concanavalina-A.

Leu = Leucoaglutinina.

PHA = Fitohemaglutinina.

PWM = Mitógeno de Pokeweed.

LPS = Lipopolisacáridos.

SRBC = Eritrocitos de carnero.

SRBC-AET = SRBC sensibilizados con 2-aminoetilisotio-uronio.

E<sup>+</sup> = Rosetas espontáneas o directas.

Taet = Rosetas formadas con SRBC-AET.

B = Linfocitos B. (LcB)

T = Linfocitos T. (LcT)

Tc = Linfocitos T cooperadores.

Ts = Linfocitos T supresores.

Tp = Linfocitos T precursores.

Te = Linfocitos T efectores.

Tci = Linfocitos T citotóxicos.

Tm = Linfocitos T de memoria.

Tc/Ts = Relación linfocitos Tc y Ts.

PMN = Polimorfonucleares.  
MAC = Macrófagos.  
CP = Células plasmáticas.  
NK = Células NK (asesinas naturales).  
K = Células K (asesinas).  
NoT = Linfocitos no T.  
CI = Complejos inmunes.  
FB = Factores bloqueadores.  
LIF = Factor inhibidor de la migración de leucocitos.  
FQ = Factores quimiotácticos.  
MAF = Factor activador de macrófagos.  
FT = Factor de transferencia.  
LT = Linfotóxica.  
IL-1 = Interleucina-1.  
I = Interferón.  
SSA = Solución salina amortiguada.  
SSA-HSA 0.2 = SSA con albúmina sérica humana al 0.2%.  
PLL = Poli-L-lisina.  
PBS = Solución buffer de fosfatos.  
F/H = Ficoll-Hypaque.  
MC = Medio de cultivo.  
RIA = Radioinmunoensayo.  
ELISA = Inmunoensayo enzimático.

## INTRODUCCIÓN.

La respuesta inmune: El término de inmunidad se refirió en un principio a la resistencia de los individuos frente a las infecciones microbianas. Actualmente esta definición engloba al conjunto de reacciones dirigidas a la eliminación de sustancias extrañas. Por consiguiente podemos decir que se conoce como sistema inmune al conjunto de factores humorales y celulares, específicos o no que protegen al organismo contra las agresiones infecciosas y parasitarias y contra las proliferaciones malignas. Se puede decir también que la respuesta inmune tiene como propósito fundamental el preservar la integridad del individuo, para lo cual los mecanismos de reconocimiento de lo propio y de lo extraño juegan un papel primordial. Si hablamos de la respuesta inmune específica podemos decir que para cumplir con su cometido, el sistema inmune dispone de dos tipos de células que son estimuladas con la aparición de antígenos (Ag) que son reconocidos como elementos extraños (Fig.1).

La respuesta inmune del tipo humoral es aquella en la que existe la aparición de moléculas de naturaleza proteica llamadas anticuerpos (Ab), los cuales se unen específicamente con el Ag para eliminarlo del organismo. Estos anticuerpos son sintetizados por las células linfoides "B" que provienen de la diferenciación celular de las células progenitoras del tejido hematopoyético, hasta convertirse en células plasmáticas.

La respuesta inmune celular está representada por los linfocitos "T" los cuales son linfocitos que maduran en el timo y no dan origen a células secretoras de anti-

cuerpos sino a células efectoras, productoras de linfocinas. En el transcurso de su proliferación, los timocitos producen algunas subpoblaciones que se constituyen en dos categorías funcionales principales: a) Linfocitos T reguladores: Pueden ampliar (cooperadores) o suprimir (supresores) la respuesta de células accesorias y linfocitos T o B (Fig. 2). b) Linfocitos T efectores: Los cuales causan reacciones inmunitarias medidas por células, como las respuestas de hipersensibilidad retardada (cutánea), el rechazo de injertos y de tumores, así como la eliminación de células infectadas por virus. Los linfocitos T citotóxicos (Tci) participan en éste último tipo de respuestas en las cuales son importantes las células T que proliferan en cultivos mixtos de linfocitos<sup>(28)</sup>.

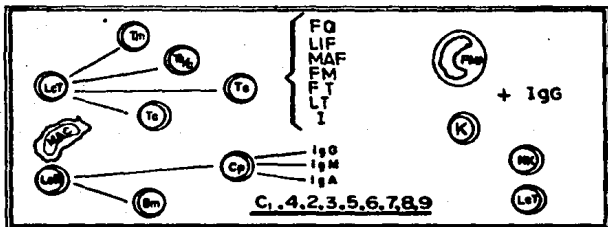


Fig. 1 Esquema simplificado de la Respuesta inmune. LcT: linfocito timo dependiente, Tm: linfocito T de memoria, Tc: linfocito T cooperador/inductor, Ts/ci: linfocito T supresor citotóxico, Te: linfocito T efector, Mac: macrófago, LcB: linfocito B, Bm: linfocito B de memoria, Cp: células plasmáticas, PMN: polimorfonucleares, FQ: factor quimiotáctico, LIF: factor inhibidor de la migración de leucocitos, MAF: factor activador de macrófagos, FM: factor mitogénico, FT: factor de transferencia, LT: linfotoxina, I: interferón.

Tomado de: Aguilar-Santelises, M. Inmunología de tumores. Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología. 2:29-35 (1984).



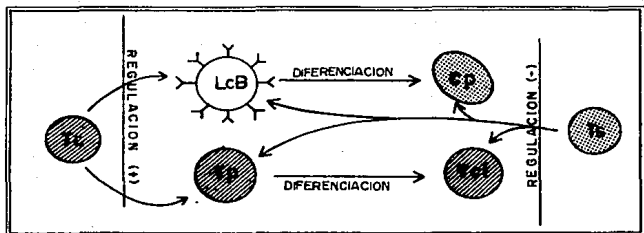


Fig. 2 Influencias reguladoras de los linfocitos T sobre el sistema inmune. LcB: linfocitos B, CP: célula plasmática, Tc: linfocito T cooperador, Tp: linfocito T precursor, Tci: linfocito T citotóxico, Ts: linfocito T supresor.

Tomado de: Katz, D.H., El sistema inmune; Generalidades. En: Fundenber (Ed) Inmunología Básica y Clínica (Ed. El Manual Moderno, 4a. ed.) pp. 13-21 (1983).

Las células linfoides presentan marcadores de superficie sobre su membrana que son susceptibles de identificación gracias a técnicas como la formación de rosetas o detección por anticuerpos monoclonales (Mabs) que los hacen evidentes mediante microscopía óptica o técnicas de inmunofluorescencia respectivamente.

La presencia de receptores en los linfocitos T humanos para eritrocitos de carnero (SRBC) permite determinar el porcentaje de linfocitos T entre los linfocitos totales al mezclar estos últimos con los SRBC, incubarlos a 37°C durante 15' y centrifugar a 250 x g durante 5' e incubar nuevamente a 4°C durante toda la noche, para lograr la formación de rosetas T directas o espontáneas (E<sup>+</sup>). - El estudio de este fenómeno se inició cuando Brain y col.

describieron en 1970 que hasta un 30% de los linfocitos humanos de sangre periférica podía hacer rosetas con SRBC, afirmando que dicha formación de rosetas no estaba relacionada con los niveles séricos de aglutininas (3,10). Posteriormente Froland se convirtió en uno de los primeros investigadores que propusieron la formación de rosetas con SRBC como marcador para linfocitos T, encontrando porcentajes variables de rosetas en pacientes con hipogammaglobulinemia de tipo Brutten en quienes el porcentaje de linfocitos B era menor de 0.1% (3,19). Más adelante, Jondal analiza las poblaciones de linfocitos confirmando en 1972 que prácticamente toda la población de timocitos tienen la capacidad de formar rosetas E<sup>+</sup> y asegura que el receptor para SRBC es retenido en linfocitos T periféricos transformados en blastos (3,25). Estos estudios dieron lugar a una gran cantidad de trabajos en relación a los receptores y otros Ag de superficie presentes en poblaciones y subpoblaciones de linfocitos humanos.

Ahora bien; las células linfoides del sistema inmune también pueden ser clasificadas y divididas dentro de subpoblaciones identificando los determinantes antigénicos sobre su superficie celular mediante el uso de Mabs.

Los Mabs dirigidos contra un determinante específico para una subpoblación dada son obtenidos por técnicas de hibridación celular. Tales técnicas se basan en la fusión de células de mieloma de ratón con células esplénicas de ratón inmunizado contra células humanas de sangre periférica, líneas celulares o preparaciones antigénicas apropiadas, dando lugar al desarrollo de una clona de células híbridas que continuamente secretan Mabs fitamente

específicos. Así, ese Mab puede efectuarse el reconocimiento de estructuras de superficie y hacerse evidente mediante la participación directa o indirecta de un compuesto fluorescente que brilla de una forma característica al ser excitado por luz ultravioleta. Además los Mabs también encuentran aplicación en otras técnicas como por ejemplo: El radioinmunoensayo (RIA) y el inmunoensayo enzimático (ELISA).

Se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales que reaccionan con las células T humanas y sus subpoblaciones. Así se pueden delimitar subpoblaciones de linfocitos cooperadores (Tc), supresores (Ts) y citotóxicos (Tci). Estos reactivos se han usado en la investigación de las subpoblaciones y poblaciones en diversos padecimientos clínicos donde se han podido demostrar alteraciones importantes<sup>(28)</sup> (Tabla 1).

Con respecto a la respuesta a mitógenos por células T cabe mencionar lo siguiente en relación a la funcionalidad de subpoblaciones celulares; La transformación linfoblástica puede ser inducida por numerosas sustancias conocidas comúnmente como mitógenos. Estos estimulan la proliferación de determinadas subpoblaciones linfocitarias. La fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (Con-A) estimulan los linfocitos T. Los lipopolisacáridos (LPS) estimulan los linfocitos B, y el mitógeno de pokeweed (PWM) o extracto purificado de Phytolacca americana, estimula a la vez los linfocitos B y T<sup>(7)</sup>. Todos ellos son considerados como activadores de otras funciones potenciales de las células que estimulan.

Los mitógenos más utilizados (PHA, Con-A y PHA) son lectinas, sustancias de origen vegetal que se fijan selectivamente (del griego lego= elijo) a azúcares de la membrana linfocitaria<sup>(7)</sup>. La transformación linfoblástica puede observarse al microscopio o bien evaluarse mediante la cuantificación de la incorporación de precursores del DNA marcados, como la timidina tritiada.

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio.

Mab	Reactividad	CD <sup>†</sup>	PA <sup>‡</sup>	Ig <sup>§</sup>	Rango <sup>¶</sup>
OKT3 <sup>•</sup> BMA030 <sup>•</sup> TORT-3 <sup>•</sup>	Linfocitos T maduros; 95% de linfocitos T; reconoce timocitos - fetales.	3	22-23K	IgG <sub>2a</sub>	70±10%
OKT4 <sup>•</sup> BMA040 <sup>•</sup>	Linfocitos T cooperadores/inductores; 60% de linfocitos T.	4	55K	IgG <sub>2b</sub> IgG <sub>1</sub>	50±15%
OKT8 <sup>•</sup> BMA031 <sup>•</sup>	Linfocitos T supresores/citotóxicos; 35% de linfocitos T.	8	32-43K	IgG <sub>2a</sub>	20±10%
OKM1 <sup>•</sup>	Monocitos, granulocitos y células NK.	11	ND	IgG <sub>2b</sub>	30±5%
OKT11 <sup>•</sup>	Formación de rosetas E <sup>+</sup> ; fijación de complemento.	2	45-50%	IgG <sub>2a</sub>	30±5%

- Anticuerpos monoclonales Ortho-mune. • Institute Behring.
- Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, La Habana Cuba. ND = No determinado, † Del anticuerpo.
- † Cluster determinant (Ag determinante del grupo).
- ‡ Clase del Mab.
- ¶ Del porcentaje celular encontrado entre los linfocitos totales.

Dado que con el presente trabajo se pretende evaluar aspectos numéricos y funcionales de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica de pacientes con Cáncer Cérvico Uterino es necesario señalar algunos puntos de importancia de este padecimiento.

Cáncer Cérvico Uterino (CaCU): Dentro de las neoplasias que se observan con mayor frecuencia en la mujer en los países en vías de desarrollo, el CaCU es considerado como una de las primeras causas de muerte. Dos de cada 100 mujeres presentan esta enfermedad hacia la edad de 40 años<sup>(6)</sup>. Estudios realizados para el pronóstico de sobrevivida de pacientes jóvenes han demostrado que las personas de mayor edad tienen una mejor posibilidad de sobrevivida a 5 años. El CaCU en pacientes menores de 35 años de edad presenta una frecuencia menor que el 10% del total de la población y solamente del 2 al 6% son jóvenes de 30 años<sup>(29)</sup>.

Tabla 2. Distribución del estadio clínico de un grupo de pacientes con CaCU en relación a su edad.

Estadio	No. total	Edad					
		18-34		35-54		55-89	
		No.	%	No.	%	No.	%
IA	147	16	11	107	73	24	16
IB	792	75	9	523	66	194	24
IIA	371	28	8	192	52	151	41
IIB	374	11	3	176	47	137	50
III	224	6	3	85	38	133	59
IV	94	3	3	37	39	54	57

Tomado de: Kjörstad, K.E. Carcinoma of the cervix in the young patient. Obst. Gynecol. 50:28-30 (1977).

Se han propuesto varias hipótesis que relacionan estudios experimentales con ciertos factores que son comunes en las mujeres que presentan displasias o carcinoma. La más aceptada es que varios factores se asocian y potencializan para producir el proceso neoplásico, siendo estos:

1. Grupo racial.
2. Inicio de vida sexual a temprana edad.
3. Multiparidad (No. de embarazos).
4. Edad al cual se presenta el primer embarazo.
5. Infecciones virales (Herpes virus tipo II y virus del papiloma humano).
6. Factores generales: Educación deficiente, bajo nivel socioeconómico y hábitos dietéticos e higiénicos deficientes.

El carcinoma de células escamosas del cérvix usualmente se origina en la unión del tejido escamoso y columnar en el canal endocervical u hoz externa; la extensión del tumor primario raramente es simétrica y frecuentemente envuelve el parametrio. Ahora bien; el tumor puede infiltrar tempranamente y aparecer inicialmente como una placa dura, o la mucosa puede ulcerarse y causar un efecto necrótico del cérvix y la cúpula vaginal. El tumor puede proliferar de modo específico en la superficie del cérvix y se puede observar la formación de columnas papilares resultantes del tumor que se presentan paralelamente en el orificio vaginal y causan necrosis con infección y sangrado.

Dadas las características de diseminación y evolución del CaCU la Federación Internacional de Ginecoba-

tricia (FIGO) ha elaborado una clasificación en diferentes estadios de acuerdo a las condiciones clínicas que presenta el tumor en las pacientes. Esta clasificación es muy útil para establecer el tratamiento, y tiene además implicaciones en el pronóstico.

Estadio 0. Carcinoma preinvasivo, también llamado "in situ". Todas las lesiones en las cuales no hay evidencia de infiltración.

Estadio I. Carcinoma confinado estrictamente al cérvix, presentando induración o ulceración del mismo.

Estadio Ia. Casos con mínima invasión estromal (carcinoma preclínico invasivo, esto es en los cuales no pueden ser diagnosticados por exámenes clínicos de rutina).

Estadio Ib. Todos los otros casos clínicos incluidos en el estadio I. (Los casos de cáncer oculto indicados como "OCC").

Estadio II. El carcinoma se extiende más allá del cérvix pero no alcanza la cavidad pélvica o se extiende a la vagina pero no más abajo de un tercio.

Estadio IIa. Carcinoma sin infiltración del parametrio.

Estadio IIb. Carcinoma con infiltración del parametrio.

Estadio III. El carcinoma se extiende a la pared pélvica. Al examen rectal no hay espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica. El tumor llega al tercio inferior de la vagina. (Los casos en que los métodos auxiliares de exploración demuestran hidronefritis o riñón no funcionando).

Estadio IIIa. No hay extensión a la pared pélvica.

Estadio IIIb. Extensión a la pared pélvica y/o hidronefritis o riñón no funcionando.

Estadio IV. Carcinoma diseminado más allá de la pelvis o que envuelve la mucosa de la vagina o del

recto. No obstante la presencia de un edema bulo-  
so no es suficiente evidencia para clasificar el  
tumor en estadio IV.

Estadio IVa. Extensión de la neoplasia a los órga-  
nos adyacentes (vejiga o recto).

Estadio IVb. Metástasis a órganos distantes.

Dentro de los métodos más usuales para el diagnósti-  
co del CaCU el que se emplea en la actualidad con más -  
frecuencia es el llamado Papanicolaou, que consiste en -  
un estudio citológico de la descamación cérvico vaginal (6).

Por lo que respecta a la terapia de CaCU se tiene -  
que la dosis de radiación requerida para el control pri-  
maria de las lesiones cervicales es muy variable. La do-  
sis óptima es establecida tomando en cuenta la tolerancia  
del recto, vejiga e intestino delgado. Por otro lado, Pa-  
terson reporta que la aplicación de 7,600 rads es la me-  
jor; como indica la técnica de Estocolmo (38).

En la irradiación de tumores de la cabeza o de cue-  
llo uterino la radiosensibilidad de la metástasis de nó-  
dulos linfáticos varía de acuerdo al sitio primario, aun-  
que dicha lesión primaria sea en ambos casos del tipo car-  
cinomatosa celular escamosa. El hecho de que el carcinoma  
del cérvix es usualmente de células escamosas no implica  
la misma radiocurabilidad de sus metástasis asociadas -  
con nódulos linfáticos. Por esta razón, es esencial un a-  
nálisis cuidadoso de la relación tiempo-dosis-volumen de  
radiación en los reportes evaluadores de la radiocurabi-  
lidad de pacientes con metástasis de nódulos linfáticos.

Las radiaciones provocan la disminución del número  
de nódulos entre los que se pueden encontrar algunos con  
metástasis. En cambio, la resección quirúrgica de nódulos



linfáticos puede resultar insuficiente. Así pues, es importante adecuar el tratamiento de acuerdo a las condiciones físicas y clínicas de cada paciente. Como principio general se deberá tomar en cuenta que la dosis necesaria es mayor en estadios avanzados, y que por ello se asocia con un mayor número de secuelas.

Habiendo descrito de manera general algunos aspectos sobre el CaCU es importante considerar y señalar los puntos inmunológicos de esta neoplasia.

Vigilancia Inmunológica: En 1970 Burnet desarrolló la teoría de vigilancia inmunológica que se conceptúa actualmente como una respuesta inmune que participa en la prevención de tumores (2,5). Aparte de los linfocitos T, las células K son capaces de lisar células tumorales gracias a la presencia de anticuerpos. Otros tipos de células con actividad antitumoral son las células NK y los macrófagos que también pueden provocar su lisis.

Algunos estudios realizados sobre inmunidad tumoral han demostrado que los linfocitos de pacientes con tumores pueden destruir un cultivo de células neoplásicas con origen histológico semejante al del tumor de los linfocitos donadores. Tal actividad se ha demostrado independientemente de que los donadores tengan o no síntomas de crecimiento del tumor. Además se ha observado en algunos casos un efecto bloqueador medido por suero cuando las células tumorales, linfocitos y suero provienen del mismo paciente al igual que cuando linfocitos y suero son tomados de diferentes donadores con el mismo tipo de tumor. Este bloqueo no se observó en esos estudios cuando el suero fué tomado de pacientes con tumores de diferente estirpe histológica (20).

Al investigar si la transformación blástica de linfocitos se modificaba añadiendo al cultivo plasma de individuos normales o de pacientes con carcinoma se encontró que el plasma de los pacientes inhibió significativamente la transformación "in vitro" de los linfocitos en -- comparación a la proliferación observada en cultivos con controles en presencia de plasma normal. La adición de PHA a los cultivos de linfocitos resultó también en una transformación blástica disminuida en los cultivos de células de pacientes en comparación a las de los controles normales<sup>(48)</sup>.

Otros datos sugieren la circulación de ciertos antígenos en un alto porcentaje de pacientes con neoplasias mientras que dichos antígenos son raramente encontrados en pacientes que no tienen cáncer<sup>(39)</sup>.

En CaGU no se denota la presencia de complejos inmunes (CI) circulantes en sangre periférica de pacientes -- con o sin tratamiento radiante. Sin embargo; se observan niveles elevados de IgM en pacientes con estadios primarios sin tratamiento y  $C_3$  y  $C_4$  elevados en todas las pacientes excepto en aquellas en estadios avanzados que recibieron más de 3000 rads y tenían niveles normales de  $C_3$ <sup>(39)</sup>.

Eliber y Morton que han estudiado la respuesta en cultivo de linfocitos provenientes de pacientes con cáncer y la han comparado con respuestas normales han demostrado que por lo general la proliferación de linfocitos estimulados con PHA es significativamente menor en el caso de los primeros<sup>(10)</sup>. Sin embargo una alta actividad linfocítica en presencia de tumores puede indicar un buen

pronóstico después de la resección quirúrgica del tumor, ya que dicha actividad es evidencia de una respuesta inmune favorable.

En otro estudio fué determinada la proporción de -- linfocitos T y B en sangre periférica de pacientes con cáncer mamario y otros tipos de malignidades pélvicas. En pacientes con cáncer estudiadas antes de la irradiación los porcentajes de células que forman rosetas E<sup>+</sup> o rosetas EAC fueron similares a los encontrados en controles normales. Posteriormente se observó una marcada linfopenia como resultado de la terapia con radiación<sup>(41)</sup>.

El sistema hematopoyético e inmune de personas sanas quienes accidentalmente son expuestas a altas dosis de radiación o de pacientes que son irradiados por razones terapéuticas, es severamente dañado. Los estudios -- concernientes a los efectos de irradiación 'in vivo' sobre los linfocitos humanos son muy complicados debido en parte a la presencia de numerosas subpoblaciones que reaccionan juntas para producir una respuesta inmune.

El reconocimiento de distintos tipos funcionales de linfocitos implica la pregunta acerca de si la linfopenia inducida por irradiación refleja una disminución amplia o selectiva de una o varias subpoblaciones celulares. Aproximadamente el 65% de los linfocitos en sangre periférica son células T, que a su vez son generalmente más afectadas por la linfopenia que presentan los pacientes con cáncer. Se han estudiado niños con leucemia linfoblástica aguda que han recibido irradiación del cráneo y de la médula ósea exhibiendo una disminución de la respuesta a la PHA y un déficit selectivo de células T, que apa

rentemente no esta relacionado con irradiación tímica. - Por otro lado, se ha demostrado que la radioterapia es seguida por una alta proporción de linfocitos periféricos que llevan anomalías cromosómicas lo cual puede resultar en una división celular anormal y en una depresión funcional de las células T, como reflejo del daño<sup>(11)</sup>.

En ocasiones la cuenta de linfocitos T después del tratamiento es menor que el 60% de la que había antes - del mismo. Sin embargo; en cualquier caso, se observa una tendencia a la recuperación. Las cuentas de células B, K, y NK muestran una rápida recuperación después del tratamiento con irradiación<sup>(42)</sup>.

El efecto de la irradiación sobre las células in vitro ha sido estudiado por Moretta y col.<sup>(36)</sup> quienes encontraron que las células T con receptores para IgG disminuían su actividad supresora de la producción de Ig al recibir una dosis de 3000 rads, razón por la cual fueron consideradas radiosensibles.

Estudios recientes realizados por Aguilar-Santelises y col.<sup>(4)</sup>, demuestran que en pacientes con  $Ca^{60}$  irradiados hay una marcada leucopenia y una linfopenia que se hace evidente por los porcentajes determinados por biometría hemática. Sin embargo; la linfopenia observada no mostró relación con la dosis de radiación y se consideró por lo tanto como una característica de las pacientes en relación a su situación inmunológica inicial. Las cuentas porcentuales de linfocitos T de las pacientes no difieren significativamente a los controles normales, pero sí se observa un incremento porcentual de células T con receptores para Fc de IgG en pacientes que han recibido altas

dosis de radiación. Así también, las proporciones de células formadoras de rosetas Taet difieren significativamente entre los controles normales y los subgrupos de pacientes que recibieron mayores dosis de radiación. Dichas células Taet han sido reportadas exhibiendo una acción más eficaz como células efectoras o mediadoras de linfólisis.

El CaCU es una entidad donde resulta interesante estudiar y tratar de relacionar los cambios de los niveles del complemento con la extensión del tumor. Con el método de inmunodifusión radial la concentración del 3er. componente del complemento ( $C_3$ ) resulta normal en comparación a los controles, incrementándose significativamente en el suero de pacientes en estadio III y disminuyendo en estadio IV. Por el contrario, el nivel del 4o. componente ( $C_4$ ) fué estable y prácticamente igual al valor normal. La actividad total hemolítica del complemento en las pacientes excedió el valor normal (40).

Estudios realizados han demostrado que el anticuerpo monoclonal (Mab) OKT3 que reconoce las células T maduras es un potente mitógeno para linfocitos T, en presencia de monocitos. También se han producido otros Mabs como el OKT4 y el OKT8, que identifican las subpoblaciones cooperadoras y supresoras respectivamente, las cuales son capaces de regular la proliferación de las células B en respuesta al mitógeno PWM. Los monocitos juegan un papel esencial en el proceso de activación, contribuyendo a la respuesta proliferativa en dos formas diferentes: 1) como células presentadoras de Ag y 2) como células secretoras de interleucina-1 (IL-1).

Se ha observado por ejemplo que al cocultivar las células irradiadas E<sup>+</sup>, OKT4 y OKT8 con monocitos autólogos no irradiados hubo una corrección del daño causado por la irradiación, y que el sobrenadante derivado de los cultivos de macrófagos (IL-1) puede conferir un alto grado de radioprotección sobre las células E<sup>+</sup>. Por otro lado, cuando la sensibilidad de las subpoblaciones linfocíticas T en sangre periférica a la radiación por Co<sup>60</sup> fué investigada sobre los valores dosis-respuesta para la población celular E<sup>+</sup>, linfocitos T cooperadores y T supresores se observó que la irradiación modifica la transformación blástica de células T cuando se estimula con el Mab OKT3; mientras que no hubo diferencias significativas en estimulación de células E<sup>+</sup>, Tc y Ts al irradiarlas y usar PHA como mitógeno<sup>(32)</sup>.

Las investigaciones realizadas por Mexori y col.<sup>(33)</sup> cultivando y estimulando linfocitos de pacientes con cáncer y donadores normales con PHA demostraron que: en pacientes con neoplasias localizadas los linfocitos reaccionan a la PHA del mismo modo como los linfocitos de donadores normales, pero en casos inoperables avanzados hay una depresión significativa en relación a la reactividad de los linfocitos. En los pacientes tratados con radioterapia se observa después del tratamiento depresión de la respuesta linfocitaria a los estímulos proliferativos. Posiblemente algunos factores relacionados con el suero de los pacientes pueden inhibir la proliferación. Otra explicación que sugieren es que el número de células T sensibles a la PHA está más reducido después del tratamiento. En los pacientes tratados con quimioterapia, una su-

presión de la respuesta blastogénica linfocítica a la PHA se presenta al final del tratamiento.

Se ha reportado también la presencia de factores bloqueadores (FB) en el suero de pacientes con CaCU que disminuyen la incorporación de timidina tritiada en cultivos celulares. Esto último resulta de interés en cuanto a que se observó simultáneamente pruebas "in vivo" (reacción intradérmica) negativas y pruebas "in vitro" (LIF en ausencia de suero autólogo) positivas del mismo individuo frente a un cierto antígeno, lo cual habla precisamente de la acción "in vivo" de FB que podrían estar así colaborando en la patogenia de la enfermedad y que pueden también bloquear la expresión del factor inhibidor de la migración de leucocitos humanos (LIF)<sup>(18)</sup>.

## FUNDAMENTACION DEL PROBLEMA.

El cáncer cérvico uterino como padecimiento de alta frecuencia en los países en vías de desarrollo como el nuestro es favorecido epidemiológicamente por diversos factores externos característicos de la población afectada, tales como: bajo nivel socioeconómico, cultural, higiénico y alimenticio, así como factores ginecológicos - tales como múltiples gestaciones e inicio de vida sexual activa a edad temprana, entre otros.

Los numerosos estudios realizados para mejorar las posibilidades de detección, prevención y tratamiento de este padecimiento han sido enfocados a disminuir su incidencia y progresión.

El aspecto inmunológico es especialmente importante puesto que solo el conocimiento adecuado de los mecanismos involucrados y la definición de lo que sería una buena respuesta nos permitirá intervenir para modificar favorablemente la evolución clínica de las pacientes.

Frecuentemente los estudios de laboratorio de rutina practicados a las pacientes a quienes se ha diagnosticado CaCU, muestran casos de anemia leve o grave, fundamentalmente debido a las hemorragias que llegan a suscitarse durante el progreso del padecimiento y a la alimentación deficiente. Tal anemia es tratada comunmente por la transfusión de paquete eritrocitario. Por otro lado - se observa de manera general una leucopenia, linfopenia y granulocitosis que se presentan en grado variable según el estado clínico en que se encuentran las pacientes y el tratamiento al que se han sometido durante un tiempo determinado.



Por lo anterior es importante considerar que si la respuesta inmune dada por las células linfoides se vé disminuida en este padecimiento, la evaluación inmunológica de las pacientes permitirá saber en que forma se encuentran alteradas las subpoblaciones celulares linfocíticas en cuanto a cantidad y funcionalidad, y esto nos llevará eventualmente a un mayor conocimiento y a un mejor manejo de la enfermedad.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los linfocitos T humanos poseen la capacidad de reconocer antígenos específicos gracias a lo cual se inicia su activación, dando lugar a proliferación y división celular, regulando de esta manera el tipo y la intensidad de la respuesta inmune celular y humoral. Dos subpoblaciones funcionalmente distintas han sido definidas por heteroantisueros y anticuerpos monoclonales dirigidos -- contra ciertos antígenos de superficie celular. Tales subpoblaciones son independientemente programadas durante -- su diferenciación intratímica para efectuar funciones inductoras/cooperadoras o supresoras/citotóxicas.

Muchas anomalías inmunológicas resultan de alteraciones en las subpoblaciones de células T. La homeostasis inmune resulta de un delicado balance de subpoblaciones inductoras/cooperadoras y supresoras/citotóxicas en el torrente sanguíneo y los órganos linfoides por lo que, cualquier perturbación en este equilibrio puede iniciar una variedad de desordenes inmunopatológicos.

En el presente trabajo se hace uso de técnicas inmunológicas que involucran la obtención y purificación de linfocitos T y NoT de sangre periférica, la identificación de las subpoblaciones de linfocitos T por sus receptores de superficie con la formación de rosetas  $E^+$  e inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales. De esta manera se podrá visualizar en el grupo de pacientes analizados (con diferentes estadios clínicos de la neoplasia, con o sin tratamiento) la manera en que se ven afectadas las poblaciones y subpoblaciones linfocíticas,

como forma de evaluar el avance o disminución de la respuesta inmune de las pacientes. Así mismo se podrá comparar el resultado de dichas pruebas con el obtenido analizando un grupo de personas sanas (control), con el objeto de hacer evidentes las alteraciones encontradas.

OBJETIVOS.

1. Aislar y purificar los linfocitos de sangre periférica de pacientes con CaCU.
2. Separar las subpoblaciones de linfocitos T y NoT e identificar sus subpoblaciones.
3. Determinar el No. total y relativo de leucocitos, linfocitos T y NoT y subpoblaciones de ellos.
4. Hacer determinaciones en pacientes con CaCU antes y después de recibir su tratamiento - con radiación con el fin de buscar modificaciones a la cantidad y funcionalidad de linfocitos T inducidos por el mismo.
5. Buscar si existe una relación entre la concentración de alguna subpoblación de linfocitos T en el estadio en que se encuentran las pacientes al momento del estudio.
6. Comparar los datos obtenidos de pruebas similares realizadas con células provenientes de personas sanas.

## HIPOFESIS.

La inmunidad celular es responsable primordialmente de mantener la integridad del organismo humano mediante mecanismos de eliminación de células aberrantes que se escapan de los mecanismos normales de control y pueden llegar a constituir una masa tumoral.

Los linfocitos T son los representantes de inmunidad celular y en las pacientes con CaCU puede estar afectada la concentración de alguna de sus subpoblaciones. Así mismo es posible que la cantidad y funcionalidad de estas células esté más o menos alterada de acuerdo al estadio clínico y/o a la intensidad del tratamiento radiante que reciben las pacientes.

MATERIAL Y REPOSOS.

Material biológico:

Anticuerpos policlonales anti-anticuerpo de  
ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína.  
Anticuerpos monoclonales de ratón.  
Eritrocitos de carnero.  
Sangre periférica heparinizada de pacientes con  
CaCU y de personas sanas.

Equipo de Laboratorio:

Agitador de pipetas de Thoma.  
Autoclave.  
Balanza analítica mono plato "Mettler".  
Balanza granataria.  
Bomba de vacío "Kobler" (0.249 KW).  
Centrifuga clínica "Solbat 115".  
Contador de centelleo.  
Incubadora a 37°C "Thelco".  
Incubadora con atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> "Napco 302".  
Microscópio de epifluorescencia "Zeius".  
Microscópio óptico "Zeius".  
Piano  
Picnómetro (10 ml) "Super-rrior".  
Refrigerador de 0 a 4°C "Riessa".  
Vortex "Genie".

Material de consumo:

Aceite de inmersión.

Ahujas (21 x 22 mm).

Bulbos para pipetas pasteur.

Cámara de Neubauer.

Cubreobjetos (22 x 22 mm y 100 - 50 x 24 mm).

Espátula de cromo-níquel.

Frescos para desechos.

Gradilla.

Imán.

Jeringas desechables (20 ml).

Ligadura.

Mechero bunsen.

Micropipetas Gilson (20, 50, 250 y 1000 microlitros).

Papel pH (0 - 14) o potenciómetro.

Papel contac

Papel watman No. 3.

Pipetas graduadas (1, 5 y 10 ml).

Pipetas pasteur (2" de largo).

Pipeta de Thoma (glóbulos blancos).

Portaobjetos (26 x 76 mm).

Puntas para micropipetas.

Torundas con alcohol.

Tubos de ensaye (13 x 100 mm).

Reactivos:

Agua destilada y bidestilada.

Alsever: Glucosa 20.5 g, citrato de sodio dihidratado 3.0 g, ácido cítrico monohidratado 0.55 g, - cloruro de sodio 4.20 g y agua destilada cbp 1000 ml.

Azul tripano ; Colorante al 0.4% en solución salina isotónica.

Bicarbonato de sodio al 7.5%.

Bromuro de 2-amino-etilsiotioronio (set): 0.4018 g - de set en 10 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 9.0 con NaOH 4M.

Carbonil-Iron.

Colorante de Wright: Colorante 2 g en 40 ml de glicerina, sfornar a 1000 ml con metanol. Reposar durante toda la noche, filtrar y almacenar.

Ficoll-Hypaque: Ficoll al 9% (24 partes), Hypaque 34% (10 partes). Densidad 1.077±0.001.

Formaldehído al 1%: 1 ml de formaldehído en 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Glicerol al 50%: 50 ml de glicerol, 50 ml de SSA.

Heparina sódica: 1000 UI/ml.

Medio de cultivo: RPMI 1640 (10X) 10%, suero fetal de ternera 10%, glutamina 1%, antibióticos (estreptomicina 100 microgramos/ml y penicilina 100 UI/ml) 1%, bicarbonato de sodio al 7.5% - hasta alcanzar un pH 7.2 y agua destilada cbp.

Metanol absoluto.

Naranja de acridina: 1 mg del colorante en 1 ml de agua bidestilada (sol. stock). 0.1 ml de sol. stock, 9.9 ml de PBS (sol. de trabajo a una concentración de 10 microgramos/ml).

Poli-L-Lisina: Solución stock de 10 mg/ml, en solución salina amortiguada. Sol. de trabajo a una concentración de 2 microgramos/ml.



Solución buffer de fosfatos (PBS): 10X. Cloruro de sodio 8.10 g, fosfato ácido de potasio 0.51 g, fosfato ácido de sodio ( $\cdot 12 H_2O$ ) 4.03 g, y agua destilada 100 ml.

Solución salina amortiguada (SSA): Mezclar las siguientes soluciones.

SOL. A: NaCl 8.0 g, KCl 0.4g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g,  $Na_2HPO_4$  0.045 g,  $KH_2PO_4$  0.060 g, en 500 ml de agua destilada.

SOL. B:  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.147 g en 500 ml de agua destilada.

SOL. C: Glucosa 1.0 g en 10 ml de sol. A.

SOL. D: Rojo de fenol 0.002 g en 10 ml de sol. B.

SOL. E: Tris 19.1 g en 500 ml de agua destilada. Aforar a 1000 ml con agua destilada después de ajustar el pH a 7.4 con HCl 1 N.

Solución salina amortiguada-Seroalbúmina humana 0.2%:  
SSA-HSA 0.2: 0.2 g de seroalbúmina en 100 ml de SSA.

Diluciones de los anticuerpos monoclonales:

Las siguientes diluciones pueden ser sometidas a variación dependiendo del grado de fluorescencia que presenten las laminillas de estudio al ser vistas al microscópio, de tal forma que estas no muestren dificultad para ser leídas. Las diluciones de los anticuerpos se hacen utilizando Solución salina amortiguada (SSA).

OKT3 o BMAO30 dilución final 1:30

OKT4 o BMAO40 dilución final 1:10

OKT8 o BMAO81 dilución final 1:20

OKM1 dilución final 1:30

OKT11 dilución final 1:20

IORT-3 dilución final 1:20

Conjugado FITC dilución final 1:50

Nota: Todos los anticuerpos monoclonales han de conservarse a una dilución máxima de 1:10 en refrigeración, de tal forma que al utilizarse se haga la dilución correspondiente al momento de realizar el ensayo.

### Sujetos de estudio.

Se analizaron 52 muestras obtenidas de pacientes con CACU así como 30 muestras de mujeres normales, con inicio de vida sexual temprano y con número de gestaciones y hábitos higiénicos y dietéticos semejantes a los de las pacientes.

### Obtención de linfocitos.

Linfocitos totales. - Tomar 20 ml de sangre periférica de cada paciente y/o normal con jeringa desechable estéril a la cual previamente se le adiciona heparina (250 UI) como anticoagulante. Colocar la jeringa en posición vertical durante 45' a 37°C para permitir la sedimentación de los eritrocitos. Extraer el plasma rico en leucocitos, desechar las primeras gotas, vertirlo en un tubo de ensaye y añadir hierro coloidal (0.4 g/ml) para después homogeneizar en el vórtex e incubar a 37°C durante 30' en baño María y con agitación constante. Eliminar las partículas de hierro mediante un magneto, decantar el sobrenadante que se deposita sobre 2 ml de Ficoll-Hypaque y centrifugar a temperatura ambiente a 400 x g por 30'. Posteriormente tomar la capa de linfocitos y lavar tres veces siendo la primera con solución de Alsever a 500 x g durante 10' y dos más con solución celular amortiguada (CSA) a 500 x g y a 400 x g respectivamente. Ajustar la concentración a  $4 \times 10^6$  células/ml, diluir una pequeña alícuota con el colorante vital Azul tripano para contar en la cámara de Neubauer y chequear al mismo tiempo la viabilidad celular que debe ser cercana al 100%. Después de ajustar esta concentración se procede a la formación de rosetas con eritrocitos de carnero (SRBC) al 1% y a la tinción con anti-

cuerpos monoclonales (Yabs) según los procedimientos que se describen en esta misma sección (esquema No. 1).

Linfocitos T. - Ajustar la suspensión de linfocitos totales purificados a una concentración de  $10 \times 10^6$  células/ml. Añadir entonces un volumen proporcional de SRBC-AET, homogeneizar, incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 15', centrifugar a  $250 \times g$  por otros 5' e incubar durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Pasado este tiempo se debe eliminar un poco de sobrenadante, homogeneizar suavemente y tomar una alícuota de aproximadamente 0.1 ml con el fin de colocarla entre porta y cubreobjetos y leer el porcentaje de rosetamiento de linfocitos Tact entre los linfocitos totales.

Posteriormente se procede a añadir Ficoll-Hypaque a la suspensión y centrifugar a  $400 \times g$  durante 30' para eliminar el sobrenadante, resuspender nuevamente el botón de rosetas y SRBC, que sedimentó, homogeneizar y realizar un shock osmótico con 2 ml de agua destilada durante 30" e inmediatamente después aferrar el tubo con medio de cultivo (MC).

Centrifugar entonces por 10' a  $400 \times g$ , desechar el sobrenadante y lavar el paquete celular tres veces con Alsever y con SSA como se indicó en la obtención de linfocitos totales. El paso siguiente es realizar el ajuste de concentración y verificar la viabilidad para proseguir con la purificación.

Una vez hecho lo anterior se debe añadir un volumen equivalente de SRBC-AET al 5%, incubar 15' a  $37^\circ\text{C}$  y centrifugar a  $250 \times g$  durante 5'. Incubar nuevamente a  $4^\circ\text{C}$  por 1 hora y pasado ese tiempo resuspender para homoge-

neizar, añadir Ficoll-Hypaque en la cantidad adecuada y centrifugar a 400 x g otros 30'. Desechar entonces el sobrenadante y trabajar con el botón celular sedimentado; tomar una pequeña alícuota del botón resuspendido homogeneizando para leer y obtener el porcentaje de rosetas Taet formadas. Realizar otro shock osmótico como se indicó con anterioridad, hasta llegar a obtener nuevamente los linfocitos lavados, realizar el ajuste de concentración y verificar la viabilidad celular que debe ser nuevamente superior al 95% para que se considere adecuada - como para poder hacer la tinción con anticuerpos monoclonales. (Esquema No. 3).

Linfocitos Not. - A la suspensión de linfocitos totales purificados con una concentración aproximada de  $10 \times 10^6$  células/ml añadir un volumen proporcional de SRBC-AET homogeneizar suavemente e incubar a 37°C durante 15'. -- Luego centrifugar a 250 x g durante 5' e incubar durante toda la noche a 4°C. Eliminar un poco de sobrenadante, - homogeneizar y tomar una pequeña alícuota (0.1 ml) para obtener el porcentaje de rosetas Taet entre los linfocitos totales, posteriormente colocar la solución de Ficoll Hypaque y centrifugar a 400 x g durante 30'.

Remover la interfase que contiene los linfocitos -- Not pasándolos a otro tubo para lavarlos con Alsever y SSA como se indicó para los linfocitos totales. Ajustar la concentración a  $4 \times 10^6$  células/ml y verificar la viabilidad celular antes de realizar la tinción con los Mabs correspondientes.

### Inmunofluorescencia.

Realizar todo el procedimiento a temperatura ambiente. (Esquema No. 2)

En cada pozo de la laminilla de pruebas múltiples colocar 1 gota de Poli-L-lisina (2 microgramos/ml) y dejar reposar 45'. Se debe entonces lavar tres veces con aproximadamente 50 microlitros de SSA y añadir 20 microlitros de la suspensión de linfocitos purificados ( $4 \times 10^6$  células/ml). Dejar reposar otros 30' y lavar tres veces con SSA (50 microlitros), añadir 50 microlitros de formaldehído al 1% e incubar 5'. Posterior a esto lavar nuevamente tres veces con SSA + Seroalbúmina Humana al 0.2% (SSA-HSA 0.2) y añadir 20 microlitros de la suspensión de Mabs diluidos tal y como se indica en la sección de reactivos.

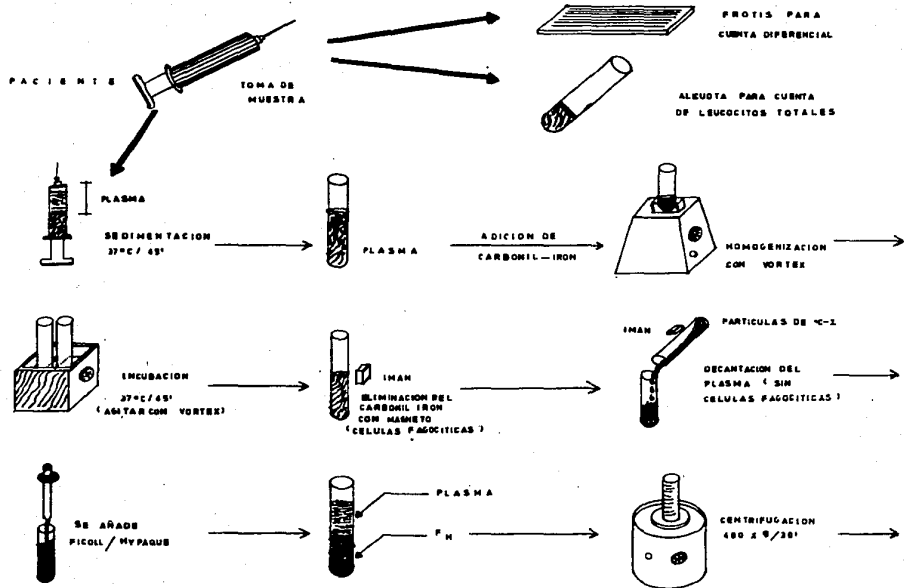
Incubar 30', lavar tres veces con SSA-HSA 0.2% y añadir 20 microlitros de conjugado. Incubar nuevamente por 30' y después lavar tres veces con SSA-HSA 0.2%. Adicionar 50 microlitros de glicerol al 50%, colocar el cubreobjetos y cuidadosamente eliminar el exceso de glicerol con papel absorbente.

Leer el No. de linfocitos marcados en el microscópio de epifluorescencia con el objetivo de 100X a inmersión.

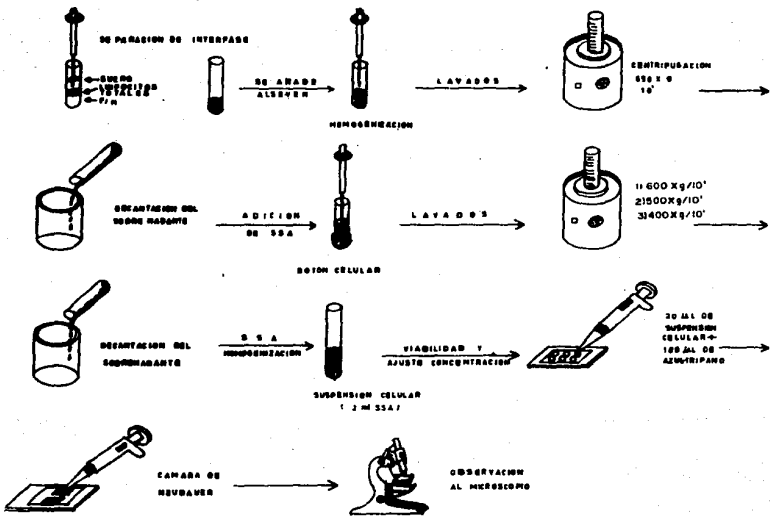
### Sensibilización de eritrocitos de conejo (SRBC) con bromuro de 2-aminoetilisotiocuronio (AET).

Mezclar una solución de 10 ml de AET con el pH recién ajustado, a 9.0 con NaOH 4M, con 0.5 ml de paquete de SRBC lavados. Homogeneizar e incubar a 37°C durante 20' en agitación, posteriormente lavar hasta que el sobrenadante quede completamente limpio con SSA (4 veces aprox.) y ajo

# ESQUEMA No. 1 "OBTENCION DE LINFOCITOS TOTALES"



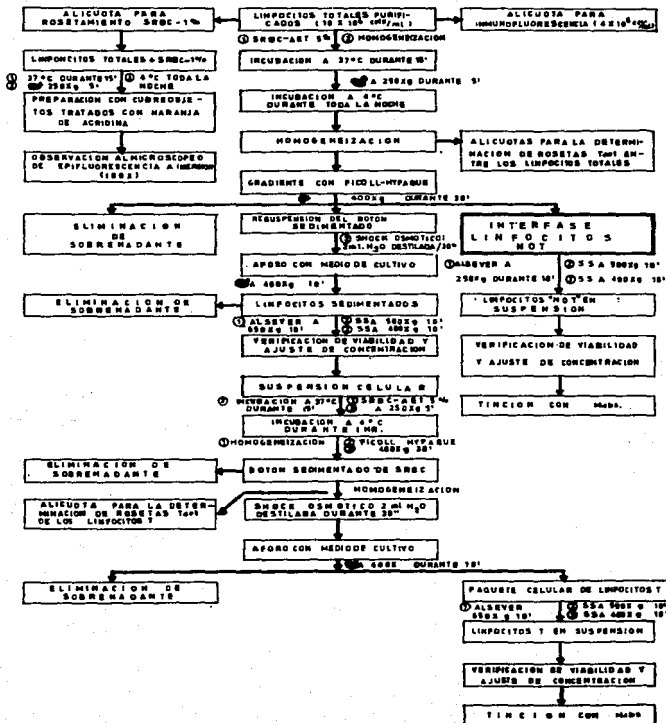
...continuacion







**ESQUEMA No 3 "OBTENCION DE LINFOCITOS T Y NOT"**



rar hasta 10 ml con SSA para obtener una concentración del 5%. Almacenar en refrigeración (4°C) mientras no se use; los eritrocitos así preparados pueden ser usados en el término de 5 días.

#### Cuenta diferencial

Llevar a cabo una tinción de Wright por duplicado con frotis de sangre sin heparina.

Fijar el frotis con alcohol metílico durante 5 min., cubrir el frotis con el colorante diluido de Wright durante 15' y enjuagar la preparación con agua de la llave. - Dejarla secar en posición vertical y observar al microscopio óptico a inmersión (objetivo de 100X). Contar al menos 100 células.

#### Cuenta de leucocitos.

Tomar una alícuota de 1 ml de sangre heparinizada para efectuar la cuenta de leucocitos totales.

Usando una pipeta de Thoma, tomar sangre heparinizada hasta la marca de 0.5 y completar con líquido de Turk hasta la marca de 11, cuidando de no formar burbujas. Agitar la pipeta para homogeneizar con ayuda de un agitador mecánico durante 40" y llenar la cámara de Neubauer con la sangre ya diluida y dejar reposar 2'.

Contar al microscopio usando el objetivo 10X con abertura reducida del condensador, contar las células en un área de 4 mm<sup>2</sup> usando los cuatro cuadros grandes de las esquinas.

Cálculos: No. Células/mm<sup>3</sup> = (No. células contadas en 4 cuadros) 50.

### Formación de rosetas.

Rosetas T.- Mezclar volumen a volumen la suspensión de linfocitos totales ( $4 \times 10^6$  células/ml) con SRBC lavados y ajustados al 1%. Resuspender, homogeneizar suavemente e incubar durante 15' a 37°C. Centrifugar a 250 x g durante 5' e incubar a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente, eliminar un poco de volumen del sobrenadante y resuspender el botón de células. Tomar una pequeña alícuota con pipeta Pasteur y depositarla sobre un portaobjeto y cubrir con un cubreobjeto tratado con naranja de acridina y observar al microscopio de epifluorescencia con el objetivo de inmersión (100X). Contar al menos 200 células entre las cuales estarán las que formaron rosetas y las que no las formaron. Se toma como criterio el considerar una roseta a aquel linfocito que tenga adheridos a su superficie tres o más eritrocitos de carnero.

Rosetas Taet para linfocitos totales.- A la suspensión ajustada de linfocitos totales añadir un volumen equivalente de SRBC-AET al 5%, resuspender y homogeneizar. Incubar durante 15' a 37°C, centrifugar a 250 x g por 5' e incubar nuevamente a 4°C durante toda la noche. Al término de esto, eliminar un poco del sobrenadante y resuspender el botón sedimentado para leer como se indicó para las rosetas T.

Rosetas Taet para linfocitos T.- Se procede de la misma forma que indica la sección de rosetas Taet para linfocitos totales hasta el término de la incubación a 4°C durante toda la noche. Posteriormente hay que resuspender

el botón sedimentado, homogeneizar y añadir Ficoll-Hypaque.

Centrifugar a 400 x g durante 30', eliminar el sobrenadante, resuspender el botón de SRBC que sedimentó y realizar un shock osmótico añadiendo 2 ml de agua -- destilada y resuspender durante 30" para después aforar el tubo con medio de cultivo.

Centrifugar de inmediato a 400 x g durante 10', -- desechar el sobrenadante y lavar el paquete celular -- tres veces con Alsever y SSA como se indicó en la sección de linfocitos totales. Ajustar nuevamente la concentración de los linfocitos obtenidos y añadir por segunda ocasión un volumen equivalente de SRBC-ABT al 5% para que posteriormente se homogenizen suavemente. Incubar por 15' a 37°C, centrifugar a 250 x g durante 5' e incubar a 4°C durante 1 hora.

Pasado este tiempo resuspender para homogeneizar el botón sedimentado de SRBC, añadir Ficoll-Hypaque y centrifugar a 400 x g durante 30'. Desechar el sobrenadante, resuspender el botón en un poco de solución salina amortiguada y tomar una alícuota con pipeta Pasteur para proceder a continuación como se indica en la sección de rosetas T.

#### Preparación de cubreobjetos con naranja de acridina.

Sumergir los cubreobjetos en la solución de trabajo, extraerlos de la solución inmediatamente y dejarlos secar inclinados a 37°C procurando que haya un contacto mínimo con la superficie del cubreobjetos. Secar en la obscuridad a 37°C durante 45' y colocarlos en una -

caja sobre aplicadores o soportes de madera, procurando que los aplicadores o soportes tengan contacto solamente con las orillas de los cubreobjetos para no dañar la superficie central del mismo. Almacenar los cubreobjetos dentro de una caja cerrada y en la obscuridad para poder utilizarlo posteriormente.

NOTA: El reactivo naranja de acridina es una sustancia cancerígena por lo que se recomienda manejarlo con cuidado durante su manipulación y usar guantes desechables y pinzas.

Los resultados serán analizados empleando la prueba "T" de Student para datos paramétricos<sup>(3)</sup>, así como la prueba "U" de Mann-Whitney para datos no paramétricos<sup>(47)</sup>.

## RESUMEN.

Se estudió el número y funcionalidad de linfocitos T y sus subpoblaciones haciendo determinaciones en su grupe periférica de pacientes con cáncer cérvico uterino (PC) y se comparó con valores normales obtenidos al -- practicar las mismas pruebas simultáneamente a un grupo de mujeres sanas (CN) con edad, número de gestaciones y condiciones socioeconómicas similares a las de las pa-  
cientes.

### Linfocitos totales.

Comparando los datos de CN con los del grupo completo de PC, independientemente de las condiciones de estas últimas, respecto a estadio y/o tratamiento, se pudieron observar algunas diferencias. Así, al practicar las determinaciones en poblaciones totales de linfocitos totales periféricos se pudo demostrar una disminución significativa en los valores porcentuales de células CD3 ( $p \leq 0.005$ ) y CD4 ( $p \leq 0.01$ ) de las PC. Así mismo se observa una disminución en los valores absolutos de CD3 y CD4 ( $p \leq 0.001$ ) y de CD8 ( $p \leq 0.01$ ) tal como se puede apreciar en las tablas 1 y 2 donde se muestran los datos individuales de ambos grupos. Además se observa que la relación cooperación/supresión o CD4/CD8 guarda una proporción semejante en CN (1.71) y en PC (1.57) -- por lo que no aparecen diferencias significativas entre ellas (tabla 3).

A pesar de haber grandes diferencias en algunos -- datos individuales de PC cuyas cifras se encuentran de-

finalmente alejadas de los valores normales de células CD2, estudiando tanto valores porcentuales como valores absolutos, (tablas 4 y 5). Tales diferencias no alcanzan significancia al analizarlas como grupo compig to de PC, excepto en el segundo caso.

Lo mismo sucede al referirnos a las células identi ficadas por el anticuerpo IORT-3 que identifica también células CD3 en su superficie.

Adicionalmente se realizaron determinaciones de cé lulas CD11 entre los linfocitos totales de PC y se pre sentan valores relativos y absolutos obtenidos en la ta bla 6. Desafortunadamente no se realizaron determinacio nes simultáneas con el mismo anticuerpo (OKM1) en el gru po de CN.

Las cuentas de rosetas practicadas con SRBC 1% o con SRBC-ABT al 5% no permiten apreciar diferencias como grupo entre CN y PC (tabla 7).

Con las tablas 8 a 14 se pretende mostrar indivi dualmente los datos de las PC al inicio y término de su tratamiento, haciendo evidencia cuando ambos datos pertenecen a una misma paciente para que se pueda apreciar los cambios que se presentan. Respecto a los datos por centuales podemos decir que hay una tendencia general a la disminución de número de células en las distintas sub poblaciones y que las diferencias que alcanzan signifi cancia estadística son aquellas observadas con células identificadas por OKT3 ( $p \leq 0.006$ ) y OKT4 e IORT-3 ( $p \leq 0.01$ ) así como las observadas en la relación cooperación/ supresión ( $p \leq 0.03$ ) que varió de 1.77 a 1.31.



En cuanto a los datos de los valores absolutos podemos observar que mientras en el grupo de inicio sólo las células identificadas por el anticuerpo OKT4 están disminuidas ( $p \leq 0.005$ ), en el grupo de término, todos los valores están bajos y las diferencias por abajo de  $p \leq 0.001$ .

Si comparamos datos de inicio contra término entre sí en lugar de comparar cada uno de ellos contra valores normales, como anteriormente, se confirman diferencias relativas en células identificadas por OKT3 e IORT-3 ( $p \leq 0.01$ ) así como en la formación de rosetes ( $p \leq 0.002$ ). Siguiendo la misma forma de comparación para revisar los valores absolutos, hay diferencias significativas ( $p \leq 0.001$ ) en todos los parámetros estudiados y ellas reflejan, como anteriormente, una disminución en cada una de las subpoblaciones celulares del tratamiento.

Adicionalmente se analizaron los datos de células T obtenidos con los anticuerpos OKT3, IORT-3 y OKT11 para ver si había diferencias en el número de células detectadas por cada uno de ellos dentro de los diferentes grupos de CN y PC y se encontró que no las había, tanto en lo que se refiere a los valores relativos como a los absolutos. Tampoco se encontraron diferencias significativas dentro de los diferentes grupos en cuanto se refiere a las rosetas formadas con SRBC al 1% o al SRBC-AET al 5%.

- 46 -  
TABLA No. 1

subpoblaciones de linfocitos totales en pacientes con CACH.						
PC	OKT3		OKT4		OKT8	
	%	Abs	%	Abs	%	Abs
1	82	1,036	55	570	40	414
2	-	-	41	-	17	-
4	11	-	4	-	6	-
5	9	--	2	-	5	-
6	46	482	41	198	10	48
8	74	1,870	-	-	-	-
9	-	-	39	-	48	-
10	54	1,136	15	170	23	261
11	-	-	35	-	37	-
12	47	1,311	30	393	28	367
14	49	183	26	48	13	24
15	43	134	10	13	9	12
17	26	81	9	7	14	11
18	13	95	12	11	7	7
19	33	407	16	65	13	53
20	13	197	4	87	10	20
22	32	518	1	5	27	140
24	22	777	6	47	16	124
25	32	380	6	23	32	122
26	40	112	22	25	16	18
28	71	2,909	31	902	20	582
29	10	62	11	7	7	4
30	49	316	34	107	10	32
32	62	1,295	27	350	19	246
33	39	1,095	18	197	23	252
34	33	891	14	125	11	98
35	34	239	9	22	9	22
36	64	2,419	17	411	29	702
37	53	1,544	22	340	29	448
38	50	1,097	31	340	8	88
40	56	962	35	337	12	115
41	69	1,103	27	298	29	320
42	71	2,454	45	1,104	33	810
43	81	1,089	44	478	24	261
44	95	578	59	341	29	168
45	73	1,017	49	498	25	254
46	66	567	40	227	24	136
47	74	497	42	209	21	154
48	61	-	24	-	37	-
49	76	1,110	52	577	25	278
50	77	686	29	189	37	254
51	55	558	36	201	44	245
52	70	554	43	338	12	66
$\bar{x}$	50	872	27	264	21	136
$\pm$ SD	22	687	16	321	13	136

subdistribuciones de los edificios totales en controles						
Tabla 1.5.						
CEN	OPT3		OPT4		OPT8	
	%	abs	%	abs	%	abs
1	58	1,520	27	412	25	323
2	63	2,560	53	1,486	16	410
3	75	327	15	322	31	195
4	80	1,306	25	327	13	170
5	25	539	16	86	10	54
6	53	1,062	20	214	18	102
7	59	1,076	32	344	18	194
8	65	1,248	30	374	31	387
9	69	2,460	32	787	25	615
10	64	1,021	57	532	17	174
11	69	300	32	364	21	168
13	52	1,135	-	-	-	-
14	67	1,361	27	367	28	381
15	91	2,140	54	1,156	23	492
16	94	2,872	56	1,608	35	1,005
17	64	1,252	31	397	23	295
18	55	622	42	261	19	118
20	63	1,927	27	295	21	167
21	72	1,927	42	309	32	617
22	60	1,800	45	810	20	360
23	81	1,386	45	624	36	499
24	65	858	31	266	12	103
25	66	-	35	-	22	-
26	62	1,250	29	488	12	150
27	48	657	34	223	37	243
28	77	1,312	35	420	34	466
29	66	1,571	42	676	38	527
30	82	1,395	28	391	28	391
$\bar{x}$	66	1,369	36	538	24	339
$\pm SD$	14	598	11	391	8	215

- 48 -  
 TABLA No. 3

Relación entre linfocitos Tcooperadores/Tsupresores en  
 pacientes con GAGU y controles normales.

CN	Tcoop/Tsup.	FC	TCoop/Tsup.
1	1.08	1	1.38
2	3.62	2	2.41
3	1.19	4	0.66
4	1.92	5	0.40
5	1.60	6	4.10
6	1.11	9	0.81
7	1.77	10	0.65
8	0.96	11	0.94
9	1.28	12	1.07
10	3.35	14	2.00
11	1.80	15	1.11
14	0.96	17	0.64
15	2.34	18	1.71
16	1.60	19	1.23
17	1.34	20	0.40
18	2.21	22	0.03
20	1.76	24	0.37
21	1.31	25	0.18
22	2.25	26	1.37
23	1.25	28	1.55
24	2.58	29	1.57
25	1.59	30	3.40
26	3.25	32	1.42
27	0.91	33	0.78
28	1.02	34	1.27
29	1.13	35	1.00
30	1.00	36	0.58
		37	0.75
		38	3.87
		39	8.00
		40	2.91
		41	0.93
		42	1.36
		43	1.83
		44	2.03
		45	1.96
		46	1.66
		47	1.35
		48	0.64
		49	2.08
		50	0.78
		51	0.81
		52	3.58
$\bar{x} \pm SD$	1.71 $\pm$ 0.76		1.57 $\pm$ 1.39

Tabla No. 4

Linfocitos totales en pacientes con CaCU.

PC	OKT11		IORT-3	
	%	Abs.	%	Abs.
17	30	94	-	-
18	32	233	-	-
19	24	296	-	-
20	15	223	-	-
22	23	258	-	-
25	25	217	-	-
26	40	112	29	81
28	67	2,745	66	2,704
29	17	106	29	131
30	54	348	45	290
32	53	1,107	48	290
33	53	1,483	47	1,320
34	20	540	28	750
35	27	130	23	162
36	63	2,331	58	2,192
37	53	1,690	61	1,778
38	43	943	50	1,097
39	45	1,247	36	998
40	45	773	43	739
41	65	1,093	82	1,311
42	73	2,523	82	2,534
43	84	1,130	-	-
44	94	572	-	-
45	75	1,044	-	-
46	61	524	-	-
47	30	537	-	-
48	67	-	-	-
49	32	1,197	-	-
50	31	722	-	-
51	80	311	-	-
52	93	776	-	-
$\bar{x} \pm SD$	54 $\pm$ 24	865 $\pm$ 712	48 $\pm$ 19	1,163 $\pm$ 884

TABLA no. 5

Linfocitos totales en controles normales.

C.N	OK11		LUD-3	
	%	Abs.	%	Abs.
1	53	1,703	54	1,553
2	49	1,992	57	2,318
3	68	840	74	915
4	49	303	36	1,404
5	35	755	45	370
6	14	232	64	1,290
7	45	321	61	1,113
8	63	1,210	60	1,152
9	63	2,424	61	2,175
10	64	1,021	45	713
11	61	703	70	312
13	56	1,096	69	1,350
14	65	1,320	49	995
15	37	2,046	85	1,999
16	93	2,341	-	-
17	65	1,302	-	-
18	53	656	-	-
20	57	721	-	-
21	67	1,769	-	-
22	76	2,230	-	-
23	84	1,437	-	-
24	67	884	-	-
25	77	-	-	-
26	63	1,371	-	-
27	63	362	-	-
28	74	1,313	-	-
29	30	1,904	-	-
30	85	1,446	-	-
$\bar{x} \pm SD$	64 $\pm$ 16	1,326 $\pm$ 621	63 $\pm$ 13	1,341 $\pm$ 506

TABLA No. 6

Linfocitos totales en pacientes con CnCU.		
OAM		
PC	%	Abs.
1	27	371
2	34	1,170
4	10	-
5	1	-
6	66	691
7	55	1,343
3	96	2,426
9	53	614
10	45	946
11	67	244
12	49	1,307
14	47	133
15	19	59
$\bar{x} \pm SD$	59 $\pm$ 27	917 $\pm$ 75,

TABLA no. 7

Linfocitos totales en pacientes con CeGU y en controles normales. % de Rosetas formadas.				
No. de Muestra	Pacientes		Normales	
	E <sup>+</sup>	Tnet	E <sup>+</sup>	Tnet
1	76	-	-	65
2	72	-	-	-
3	-	-	-	13
4	26	-	31	47
5	37	-	-	-
6	36	-	26	60
7	47	-	-	-
8	61	69	-	-
9	-	-	-	59
10	71	40	-	43
12	68	-	-	39
13	40	-	81	90
14	32	-	71	80
15	65	-	58	35
16	-	-	15	92
17	30	-	-	38
18	51	-	20	47
19	77	-	-	82
20	86	-	-	-
21	83	-	17	83
22	70	63	-	42
24	31	64	67	34
25	83	-	64	73
26	12	24	29	84
27	-	-	65	74
28	-	33	82	-
29	12	14	79	71
30	80	92	66	71
32	64	73	-	-
33	89	91	-	-
34	83	37	-	-
35	-	30	-	-
36	35	77	-	-
37	34	75	-	-
38	-	54	-	-
39	62	32	-	-
40	56	73	-	-
43	33	83	-	-
44	-	95	-	-
45	-	53	-	-
46	8	55	-	-
47	24	-	-	-
48	39	82	-	-
49	76	83	-	-
50	81	-	-	-
51	50	-	-	-
X SD	54 24	64 23	57 25	67 21



TABLA NO. 8

Subpoblaciones de linfocitos totales en pacientes con - caCU que inician y terminan tratamiento de radiación.							
PCI	%K3	%K4	%K8	Pct	%K3	%K4	%K8
1	82	55	40	-	-	-	-
2	-	41	17	-	-	-	-
-	-	-	-	4	11	4	6
-	-	-	-	5	9	2	5
-	-	-	-	6	46	41	10
8	74	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	9	-	39	48
10	54	15	23	26	40	22	16
-	-	-	-	11	-	35	37
12	47	30	28	29	10	11	7
-	-	-	-	14	49	26	13
-	-	-	-	15	43	10	9
-	-	-	-	17	26	9	14
-	-	-	-	18	13	12	7
19	33	16	13	35	34	9	9
20	13	4	10	-	-	-	-
-	-	-	-	22	32	1	27
24	22	6	16	-	-	-	-
-	-	-	-	25	32	6	32
28	71	31	20	-	-	-	-
30	49	34	10	14	95	59	29
32	62	27	19	-	-	-	-
33	39	18	23	-	-	-	-
34	33	14	11	-	-	-	-
36	64	17	29	-	-	-	-
37	53	22	29	-	-	-	-
38	50	31	8	51	55	36	44
39	50	48	6	-	-	-	-
40	56	35	12	-	-	-	-
41	69	27	29	-	-	-	-
42	71	45	33	48	61	24	37
43	81	44	24	-	-	-	-
45	73	49	25	-	-	-	-
46	66	40	24	-	-	-	-
49	76	52	25	-	-	-	-
50	77	29	37	-	-	-	-
-	-	-	-	52	70	43	12
$\bar{X}$	57	30	21		41	23	21
SD	19	14	9		25	17	14

Tabla No. 9

Subpoblaciones de linfocitos totales en porcentajes con JACU que inician y terminan su tratamiento de radiación*							
PCT	INICIO			PCT	FINAL		
	OKP3	OKT4	OKP5		OKP3	OKT4	OKP5
1	1,036	570	414	-	-	-	-
-	-	-	-	6	432	198	48
3	1,370	-	-	-	-	-	-
10	1,136	170	261	26	112	25	18
12	1,311	393	357	23	62	7	4
-	-	-	-	14	183	48	24
-	-	-	-	15	134	13	12
-	-	-	-	17	31	7	11
-	-	-	-	13	95	11	77
13	407	65	53	35	239	22	22
20	137	3	20	-	-	-	-
-	-	-	-	22	513	5	140
24	771	47	124	-	-	-	-
-	-	-	-	25	330	23	122
23	2,203	302	122	-	-	-	-
30	315	107	32	44	573	341	163
32	1,295	350	246	-	-	-	-
33	1,095	137	252	-	-	-	-
34	331	125	98	-	-	-	-
36	2,419	411	702	-	-	-	-
37	1,544	342	443	-	-	-	-
38	1,517	340	33	51	553	201	240
39	1,336	665	33	-	-	-	-
40	362	337	115	-	-	-	-
41	1,103	298	320	-	-	-	-
42	2,434	1,104	310	-	-	-	-
43	1,033	473	261	-	-	-	-
45	1,315	493	254	-	-	-	-
46	567	227	136	-	-	-	-
-	-	-	-	47	497	200	154
49	497	209	273	-	-	-	-
50	636	133	254	-	-	-	-
-	-	-	-	52	554	233	66
$\bar{x} \pm SD$	1,159 ±679	350 ±268	249 ±200		320 ±207	36 ±115	74 ±77

\* Valores absolutos

TABLA No. 10

Relación entre linfocitos Tco. maduros/Tsus. Tco. en -  
 pacientes con SIDA que inician y terminan tratamiento de  
 zidovudina.

Pct	Inicio		Pct	Termino	
	Tcoop/Tsus.			Tcoop/Tsus.	
1	1.33		-	-	
2	2.41		-	-	
-	-		4	0.66	
-	-		5	0.40	
-	-		6	4.10	
-	-		9	0.31	
10	0.65		26	1.37	
-	-		11	0.94	
12	1.07		29	1.57	
-	-		14	2.00	
-	-		15	1.11	
-	-		17	0.64	
-	-		13	1.71	
19	1.23		25	1.00	
20	0.40		-	-	
-	-		22	0.03	
24	0.37		-	-	
-	-		25	0.18	
28	1.55		-	-	
30	3.40		44	2.03	
32	1.42		-	-	
33	0.73		-	-	
34	1.27		-	-	
36	0.53		-	-	
37	1.75		-	-	
38	3.33		51	0.31	
39	3.00		-	-	
40	2.91		-	-	
41	0.93		-	-	
42	1.36		43	0.64	
43	1.33		-	-	
45	1.96		-	-	
46	1.66		-	-	
-	-		47	1.35	
49	2.03		-	-	
50	1.73		-	-	
-	-		52	3.53	
$\Sigma$	1.77(1.5)			1.31(1.05)	

TABLA No. 11

Linfocitos totales en pacientes con SAcU que inician y terminen sus tratamiento de radiación.					
Pci	OKMI INICIO		Pct	OKMI Final	
	%	Abs.		%	Abs.
1	27	341	-	-	-
2	34	1,370	-	-	-
-	-	-	4	100	-
-	-	-	5	100	-
-	-	-	6	66	691
7	55	1,348	-	-	-
3	96	2,426	-	-	-
--	-	-	9	53	614
10	45	946	---	-	-
-	-	-	11	67	244
12	49	1,367	-	-	-
-	-	-	14	43	133
-	-	-	15	19	59
$\bar{x} \pm SD$	51 $\pm$ 14	1,333 $\pm$ 719	$\bar{x} \pm SD$	66 $\pm$ 29	353 $\pm$ 278

TABLA No. 12

Linfocitos totales en pacientes con OUCU que inician y terminan su tratamiento de radiación.					
PCI	OCTIL INICIO		PCI	OCTIL TERMINO	
	%	Abs		%	Abs
-	-	-	17	30	34
-	-	-	13	32	233
19	24	296	35	27	190
20	15	223	-	-	-
-	-	-	22	23	253
-	-	-	25	25	297
-	-	-	26	40	112
23	67	2,745	-	-	-
-	-	-	29	17	106
30	54	343	44	34	572
32	53	1,127	-	-	-
33	53	1,433	-	-	-
34	20	540	-	-	-
36	63	2,331	-	-	-
37	53	1,690	-	-	-
38	43	943	51	30	311
39	45	1,247	-	-	-
40	45	773	-	-	-
41	65	1,039	-	-	-
42	73	2,523	43	67	-
43	34	1,130	-	-	-
45	75	1,044	-	-	-
46	61	-	-	-	-
-	-	-	47	30	537
49	32	1,147	-	-	-
50	31	722	-	-	-
-	-	-	52	13	170
MISD	56180	1,1591733		51130	3731204

Tabla No. 13

Linfocitos totales en pacientes con CAGU que inician y terminan su tratamiento de radiación.					
PCI	ICRP-3 INICIO		PQt	ICRP-3 PERMISO	
	%	Abs		%	Abs
-	-	-	26	29	31
23	66	2,704	-	-	-
-	-	-	29	29	131
30	45	290	-	-	-
32	43	1,002	-	-	-
33	47	1,320	-	-	-
34	23	750	-	-	-
-	-	-	35	23	162
36	58	2,192	-	-	-
37	61	1,778	-	-	-
38	50	1,097	-	-	-
39	36	993	-	-	-
40	43	739	-	-	-
41	32	1,311	-	-	-
42	32	2,334	-	-	-
$\bar{x} \pm SD$	54 $\pm$ 17	1,413 $\pm$ 730		27 $\pm$ 3	141 $\pm$ 53

TABLA No. 14

Linfocitos totales en pacientes con CaGU que inician y terminan tratamiento de radiación. % de Rosetas formadas.

Pci	ROSETAS INICIO		ROSETAS TERMINO		
	E <sup>+</sup>	Tact	Pct	E <sup>+</sup>	Tact
1	76	-	-	-	-
2	72	-	21	83	-
-	-	-	4	26	-
-	-	-	5	37	-
-	-	-	6	36	-
7	47	-	25	83	-
8	61	69	-	-	-
10	71	40	26	12	24
12	68	-	29	12	14
-	-	-	14	32	-
-	-	-	15	65	-
-	-	-	18	51	-
19	77	-	35	-	30
20	86	-	-	-	-
-	-	-	22	70	63
24	31	64	-	-	-
28	-	33	-	-	-
30	30	92	-	-	-
31	73	41	-	-	-
32	64	73	-	-	-
33	89	91	-	-	-
34	83	37	-	-	-
36	35	77	-	-	-
37	34	75	-	-	-
33	-	54	51	50	-
39	62	82	-	-	-
40	56	73	-	-	-
43	-	83	-	-	-
-	-	-	44	-	95
45	-	59	-	-	-
46	8	55	-	-	-
-	-	-	47	24	-
-	-	-	43	39	82
49	76	83	-	-	-
50	61	-	-	-	-
$\bar{X} \pm SD$	62 22	68 18		41 24	51 33

### Linfocitos T.

Con el fin de analizar los cambios que podrían presentarse al determinar porcentajes de subpoblaciones en una población celular enriquecida de linfocitos T, es que se hizo la purificación tal y como se describe en la sección de material y métodos hasta la obtención de una población linfóide formadora de rosetas en un porcentaje muy cercano al 100%. En las tablas 15 a 20 se pueden observar los resultados correspondientes a los datos relativos y absolutos cuando se hizo esta purificación y se tiñó las células T provenientes tanto de CN como de PC. Aunque se trata de un número reducido de datos que no permiten obtener significancia estadística alguna es interesante señalar el incremento de las células CD3 en relación a CD4, lo cual conduce obviamente a un desbalance en las cifras representativas de cooperación/supresión a favor de esta última.

Los datos obtenidos de poblaciones de T purificadas de PC se refieren exclusivamente a PC que iniciaban su tratamiento debido a la mínima cantidad de sangre -- que se tomó como muestra de trabajo ya que la leucopenia ha sido también acentuada en las PC que terminan su tratamiento radiante.



Tabla No. 15

Sub poblaciones de linfocitos T en pacientes con ChCU.						
* PC	OKT3		OKT4		OKT8	
	%	Abs	%	Abs	%	Abs
1	97	1,005	39	392	57	573
2	91	-	23	-	47	-
31	61	-	36	-	50	-
37	53	396	20	179	44	394
39	93	1,160	1	12	67	777
49	77	922	26	240	64	590
$\bar{x} \pm s$	79 $\pm$ 18	996 $\pm$ 119	25 $\pm$ 14	206 $\pm$ 157	55 $\pm$ 9	584 $\pm$ 157

TABLA 10.16.

Subpoblaciones de Linfocitos T en controles normales.							
GT	OKT3			OKT4		OKT8	
	%	Abs		%	Abs	%	Abs
1	60	1,022		36	363	22	225
3	35	2,035		33	792	41	355
24	59	737		32	252	21	155
27	74	635		17	103	53	370
30	37	1,403		30	421	59	363
$\bar{x} \pm SD$	$81 \pm 1.4$	$1,137 \pm 579$		$31 \pm 8$	$383 \pm 250$	$42 \pm 21$	$517 \pm 370$

TABLA No. 17

Anticuerpos T en pacientes con SncU

FC	OK-1		OK-11		IORT-3	
	%	Abs	%	Abs	%	Abs
1	40	414	-	-	-	-
2	32	-	-	-	-	-
31	34	-	99	-	53	-
37	-	-	97	1,339	59	997
39	75	935	93	1,222	73	973
49	69	326	83	1,053	-	-
$\Sigma$	50±20	725±275	96±5	1,323±331	63±13	985±17

TABLA No. 18

Linfocitos T en controles normales.

Edad	OKF11		OKF11	
	%	Abs	%	Abs
1	44	749	97	1,652
9	50	1,212	90	2,132
24	67	392	97	357
27	74	333	93	353
30	33	1,200	96	1,333
$\bar{x} \pm SD$	$64 \pm 16$	$573 \pm 305$	$96 \pm 3$	$1,336 \pm 563$

TABLA No. 19

Linfocitos T en pacientes con SAGU y en controles normales. % de rosetas Formadas con SRBC-ANT.			
CN	% Roquetas	PC	% Roquetas
1	96	31	31
9	97	37	15
24	95	39	92
27	96	40	57
30	95		
$\bar{x} \pm SD$	96 $\pm$ 1		34 $\pm$ 3

TABLE No. 20

Linfocitos T en pacientes con SAGU y en controles normales. Relación  $T_{coop}/T_{sup}$ .

CI	$T_{coop}/T_{sup}$	PC	$T_{coop}/T_{sup}$
1	1.63	1	0.68
9	0.92	2	0.59
24	1.52	31	0.72
27	0.29	37	0.45
30	0.43	39	0.01
		49	0.40
$\bar{x} \pm SD$	$1.00 \pm 0.61$		$0.43 \pm 0.26$

Linfocitos NoT.

Las porciones de células NoT fueron también analizadas buscando confirmar su pureza y la ausencia de Ag identificados característicamente sobre linfocitos T. Así, los datos correspondientes a CD3, CD4 y CD8 estuvieron en cero o muy cercanos. Cabe destacar valores de OKM1 distribuidos en un amplio rango desde 12 hasta 98% entre las células NoT de PC. Aunque solamente 3 datos de CN fueron analizados en esta forma se aprecia un gran contraste con los valores de células CD11 (OKM1) positivas que se encuentran en cero, junto con los del CD3, CD4 y CD8 (tablas 21 a 23).

Adicionalmente, la cantidad de células CD11 positivas parece ser mayor entre NoT de PCi que entre NoT de CN pero los datos son insuficientes para asegurarlo. De cualquier modo, si esto se confirma puede tener real significancia clínica como la manifestación incrementada de una respuesta en contra del tumor.

TABLE No. 21

Linfocitos totales en pacientes con SIDA.					
NO	CONT3	CONT4	CONT5	CONT6	T. A. S. (mm <sup>3</sup> )
1	0	1	1	93	1,375
2	1	0	0	87	3,947
7	0	0	0	96	3,206
8	6	4	2	98	2,476
30	1	0	1	18	102
34	0	0	0	10	459
38	0	0	1	41	1,151
34	0	0	0	42	1,134
338	0	0	0	63	1,382
39	4	1	2	36	908
$\bar{x} \pm SD$				59±35	1,612±1,211



TABLE No. 22  
Linfocitos NOT en controles normales.

DN	% ORT3	% ORT4	% ORTR	% ORM1
1	2	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

TABLE No. 23

Linfocitos NOT en pacientes con GCMV y en controles normales.  
% Rosetas form. c. s.

DN	% Rosetas	PC	% Rosetas
1	3	10	4
9	5	30	2
10	0		

Cuenta total de leucocitos y cuenta diferencial.

En las tablas 24 a 27 se presentan individualmente los datos porcentuales y absolutos de CN y PC con relación a la cuenta total de leucocitos y cuenta diferencial de los mismos, en sangre periférica. Estos datos resultan importantes cuanto que se ellos derivan otros acerca de las subpoblaciones que fueron identificadas posteriormente por medio de anticuerpos monoclonales. Podemos apreciar en general la tendencia a leucopenia, neutrofilia y eosinofilia que sin ser un rasgo constante en el paciente si confirma las características generales de otros grupos de PC estudiados anteriormente.

Al analizar las características de PC separadas de acuerdo a si el estudio de sus células se hizo al inicio o término de su tratamiento, podemos apreciar que algunas diferencias basadas en leucopenia, linfopenia, neutrofilia y eosinofilia se acentúan como resultado aparente del tratamiento radiante que han recibido (tablas 28 a 31). Estos efectos se observan principalmente con relación a los números absolutos de las células que to que la influencia de la radiación no afecta por igual a las diferentes poblaciones y subpoblaciones de células. Debido a ello es que la relación  $Tc/Ts$  se mantuvo cercana a lo normal a pesar de los valores individuales muy alejados, al final del tratamiento se tienen de los más definitivamente normales, aún como grupo, pero es debido a estos efectos de radiosensibilidad diferencial que resulta especialmente interesante el comparar los datos de PC antes y después de recibir la radiación.

TABLE No. 24

Cuenta diferencial en pacientes con CACU<sup>1</sup>

PC	Linf.	Mon.	Eos.	Bas.	Neut.
1	25	0	3	0	72
2	45	1	4	0	50
3	24	3	9	0	64
4	7	5	16	0	72
5	30	1	2	0	30
6	13	2	6	0	79
7	30	0	6	2	66
8	38	2	3	0	57
9	23	1	7	0	69
10	37	0	9	0	57
11	14	1	1	0	84
12	31	0	2	1	66
13	6	1	1	0	92
14	17	0	5	1	77
15	13	2	0	0	85
17	13	0	2	0	85
18	26	2	2	1	69
19	11	2	6	0	81
20	23	1	9	0	67
21	7	3	11	0	79
22	27	1	3	0	69
23	6	1	11	0	82
24	31	0	9	2	58
25	27	2	2	0	69
26	10	0	10	0	80
27	35	0	0	1	64
28	17	0	1	0	82
29	12	0	2	0	86
30	4	1	11	0	84
31	54	0	4	0	82
32	36	0	1	1	62
33	29	0	0	0	61
34	21	0	33	0	46
35	22	0	2	0	76
36	45	1	0	0	54
37	47	0	2	0	51
38	34	0	2	0	64
39	33	2	0	0	65
40	12	0	0	0	83
41	41	0	2	0	51
42	54	0	2	0	44
43	10	1	5	0	84
44	16	0	12	0	72
45	23	0	1	0	76
46	17	1	6	0	76
47	11	0	5	0	84
48	16	0	3	0	81
49	40	0	3	0	57
50	33	1	6	0	60
51	12	0	1	0	87
52	33	0	5	0	62
<b>ΣSD</b>	<b>2413</b>		<b>56</b>		<b>7012</b>

ΣΣ Valores porcentuales. Escala de Wright.

TABLA No. 25

## Cuenta diferencial en Controles Normales††

Control Nº.	Linf.	Mon.	Eos. %	Bas.	Neut.
1	39	1	1	1	53
2	47	0	2	0	51
3	24	0	1	0	75
4	43	0	1	0	51
5	28	0	6	0	66
6	23	2	2	0	63
7	24	2	1	0	73
8	24	0	2	0	74
9	46	0	1	0	53
10	24	1	1	0	74
11	53	1	1	0	40
12	54	0	4	0	42
13	43	0	0	0	57
14	31	0	13	0	51
15	42	0	0	0	55
16	47	0	4	0	49
17	45	0	0	0	55
18	29	0	1	0	70
19	47	1	3	0	49
20	23	0	1	0	76
21	55	0	3	0	42
22	50	2	3	0	45
23	53	0	4	0	33
24	44	0	1	0	55
26	42	1	0	0	57
27	36	2	1	1	60
28	54	0	3	0	43
29	70	2	3	0	25
30	63	0	1	0	36
<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>	$\bar{X} = 42 \pm 13$		$\bar{X} = 2 \pm 3$		$\bar{X} = 55 \pm 13$

†† Tinción de Wright.

TABLA No. 26

Número total de leucocitos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en pacientes con CACU**				
PC	Leucocitos (Células/mm <sup>3</sup> )	Linfocitos	Neutrófilos	Eosinófilos
			Abs	
1	5,050	1,263	3,636	152
2	8,950	4,028	4,475	358
3	2,950	703	1,888	263
6	8,050	1,047	6,360	483
7	11,200	3,360	7,392	672
8	6,650	2,527	3,791	200
9	4,600	1,058	3,174	322
10	6,200	2,103	3,534	558
11	2,600	364	2,184	26
12	9,000	2,790	5,940	180
13	13,000	780	11,960	130
14	2,200	374	1,694	110
15	2,400	312	2,040	00
17	2,400	312	2,040	48
18	2,800	728	1,932	56
19	11,200	1,232	9,072	672
20	6,600	1,518	4,422	594
21	6,400	448	4,288	704
22	6,000	1,620	4,140	180
23	2,200	132	1,804	242
24	11,400	3,334	6,612	1,026
25	4,400	1,188	3,036	88
26	2,800	280	2,240	280
27	5,950	2,083	3,808	00
28	24,100	4,097	19,762	241
29	5,200	624	4,472	104
30	16,100	644	13,524	1,771
31	5,200	2,808	4,264	208
32	5,800	2,088	3,596	58
33	7,200	2,808	4,392	00
34	12,850	2,699	5,911	4,241
35	3,200	704	2,432	64
36	8,400	3,780	4,536	00
37	6,200	2,914	3,162	124
38	6,450	2,193	4,128	129
39	8,400	2,772	5,460	00
40	13,650	1,718	12,012	00
41	3,900	1,599	1,989	78
42	6,400	3,456	2,816	128
43	13,450	1,345	11,298	673
44	3,800	608	2,736	456
45	6,050	1,392	4,598	61
46	5,050	859	3,838	303
47	6,100	671	5,124	305
49	3,650	1,460	2,081	110
50	2,700	891	1,620	162
51	8,450	1,014	7,352	85
52	2,400	792	1,438	120
$\bar{x}_{SD}$	6,869	1,619	4,876	349
	4,325	1,123	3,625	657

\*\* Tinción de Wright.

TABLA No. 27

Número total de Leucocitos, Linfocitos, Neutrófilos y Eosinófilos en Controles Normales.++				
Control No.	Leucocitos (cels./mm <sup>3</sup> )	Linfocitos	Neutrófilos Absolutos	Eosinófilos
1	7,400	2,836	429	74
2	3,650	4,066	4,412	173
3	5,150	1,236	3,863	52
4	3,400	1,632	1,734	34
5	7,700	2,156	5,082	462
6	7,200	2,016	4,896	144
7	7,600	1,324	5,548	76
8	3,000	1,920	5,920	160
9	7,750	3,565	4,103	73
10	6,650	1,596	4,921	67
11	2,000	1,160	800	20
12	4,200	2,263	1,764	163
13	4,550	1,957	2,594	0
14	6,550	2,031	3,341	1,179
15	5,600	2,352	3,030	0
16	6,500	3,055	3,135	200
17	4,450	2,003	2,443	0
18	3,900	1,131	2,730	39
19	3,250	1,523	1,593	93
20	5,500	1,005	4,213	55
21	4,800	2,640	2,016	144
22	6,000	3,000	2,700	130
23	2,950	1,711	1,121	113
24	3,000	1,300	1,050	30
25	4,300	2,016	3,078	0
26	3,300	1,368	2,830	43
27	3,300	1,732	1,419	114
28	3,400	2,330	950	99
29	2,700	1,701	972	34
30				
$\bar{X}$	5,205	2,054	2,374	135
$\pm$ SD	$\pm$ 1,356	$\pm$ 720	$\pm$ 1,542	$\pm$ 222

++ Tinción de Wright.

TABLA No. 28

Número total de Leucocitos, Linfocitos, Neutrófilos  
y Eosinófilos en Pacientes con CAGU que inician tra-  
tamiento.\*\*

Paciente No.	Leucocitos (cels/mm <sup>3</sup> )	Linfocitos	Neutrófilos V. Absolutos	Eosinófilos
1	5,050	1,253	3,636	152
2	8,950	4,028	4,475	353
7	11,200	3,360	7,392	672
3	6,550	2,527	3,791	200
10	6,200	2,103	3,534	558
12	9,000	2,790	5,940	180
19	11,200	1,232	9,072	672
20	6,300	1,513	4,422	594
24	11,400	3,534	5,612	1,026
27	5,050	2,033	3,903	00
28	27,100	4,077	19,762	241
30	16,100	044	13,524	1,771
31	5,200	2,308	4,264	208
32	5,300	2,032	3,596	58
33	7,200	2,308	4,392	00
34	12,800	2,692	5,011	4,241
36	3,400	3,730	4,550	00
37	5,200	2,914	2,162	124
38	5,450	3,193	4,125	129
39	3,400	2,772	5,460	00
40	13,650	1,713	12,612	00
41	3,000	1,500	1,230	75
42	6,400	3,450	4,116	123
43	11,450	1,245	11,245	673
45	6,050	1,230	4,508	61
46	5,050	353	3,803	303
49	3,650	1,460	2,111	110
50	2,700	321	1,520	162
$\bar{x}$	3,491	2,234	5,774	454
$\pm SD$	$\pm 4,525$	$\pm 1,000$	$\pm 1,035$	$\pm 333$

\*\* Técnica de Wright.

TABLE No. 29

Cuentas diferenciales en Precipitados con CaSO<sub>4</sub> que inician Tratamiento\*\*

Precipite No.	Inf.	Par.	Res.	Brn.	Neut.
1	25	0	3	0	72
2	45	1	4	0	50
7	30	0	6	2	63
5	33	2	0	0	57
10	37	0	3	0	57
12	31	0	2	1	66
19	11	2	6	0	31
20	23	1	9	0	57
24	31	0	9	2	53
27	35	0	0	.	64
28	17	0	1	0	32
30	4	1	11	0	34
31	54	0	4	0	32
32	36	0	1	1	32
33	39	0	0	0	61
34	21	0	3	0	46
36	45	1	0	0	54
37	47	0	2	0	51
38	34	0	0	0	64
39	33	2	0	0	65
40	12	0	0	0	33
41	41	0	2	0	51
42	54	0	2	0	44
43	10	1	5	0	34
49	23	0	1	0	76
48	17	1	0	0	73
49	10	0	0	0	57
50	33	1	6	0	60
<b>X</b>	<b>31</b>		<b>5</b>		<b>65</b>
<b>±SD</b>	<b>±12</b>		<b>±6</b>		<b>±12</b>

\*\* Tinción de Wright.



- 77 -  
 TABLA No. 30

Número total de Leucocitos, Linfocitos, Neutrófilos  
 y Eosinófilos en Pacientes con CrO<sub>2</sub> que terminan  
 tratamiento.

Paciente No.	Leucocitos (cels/mm <sup>3</sup> )	Linfocitos	Neutrófilos -V. absolutos-	Eosinófilos
2	2,850	793	1,133	263
3	3,350	1,047	3,260	455
9	4,300	1,053	3,174	322
11	1,100	364	2,134	26
10	1,500	730	11,980	130
14	1,200	374	1,694	110
15	1,400	312	2,040	90
17	1,200	312	2,040	48
18	2,300	726	1,932	56
21	6,400	448	4,288	704
22	6,300	1,620	4,140	130
23	2,200	132	1,804	242
25	4,400	1,183	3,036	88
26	2,300	280	2,240	230
29	5,200	624	4,472	104
35	3,200	704	2,432	64
44	3,300	1,599	2,736	456
47	6,100	671	5,124	305
51	8,400	1,014	7,352	35
52	2,400	792	1,438	120
X	4,533	738	3,619	203
±SD	± 2,739	± 418	± 2,552	± 131

↔↔ Técnica de Wright.

TABLA No. 31

Cuenta diferencial en pacientes con CaCU que terminan tratamiento. ++					
Paciente	% Linf.	% Mon.	% Eos.	% Bas.	% Neut.
3	24	3	9	0	64
4	7	5	16	0	72
5	30	1	2	0	30
6	13	2	6	0	79
9	23	1	7	0	69
11	14	1	1	0	84
13	6	1	1	0	92
14	17	0	5	1	77
15	13	2	0	0	85
17	13	0	2	0	35
18	26	2	2	1	69
21	7	3	11	0	79
22	27	1	3	0	69
23	6	1	11	0	32
25	27	2	2	0	69
26	10	0	10	0	30
29	12	0	2	0	86
35	22	0	2	0	76
44	16	0	12	0	72
47	11	0	5	0	84
48	16	0	3	0	81
51	12	0	1	0	87
52	33	0	5	0	62
<b>X±SD</b>	<b>17±8</b>		<b>5±4</b>		<b>77±8</b>

++ Tinción de Wright

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El resultado de analizar las diferencias entre las poblaciones celulares de linfocitos T purificados con las poblaciones de linfocitos totales, tanto de CN como de PC se presentan en las tablas 32 y 33. En ellas se pueden observar los resultados expresados por la media aritmética.

Como era de esperarse dada la naturaleza diferente de una población donde hay solo T con otra que contiene T y Not, la comparación de una y otra arroja diferencias significativas entre CD3, CD8 y CD2 que se enriquecen tanto en T de CN (vs totales de CN) como en T de PC -- (versus totales de PC) alterando por consiguiente la relación  $T_c/T_s$  ( $p \leq 0.05$ ). Lo anterior derivó también del hecho de que curiosamente, no hay diferencias significativas entre las cifras correspondientes a CD4, las cuales resultan muy semejantes en ambas poblaciones de un mismo grupo.

Otro hecho digno de notarse es que no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las subpoblaciones de T - CN y T-PC, incluyendo la relación  $T_c/T_s$  y las rosetas Taet.

Finalmente como era obvio esperar también se observó un notable enriquecimiento de CD3 ( $p \leq 0.0002$ ) y CD11 ( $p \leq 0.001$ ) en las T-PC al compararlas con totales de CN, esto sumado a que ahora no hay diferencias entre estos grupos, respecto a CD3 y CD4 (lo que refleja también -- un enriquecimiento de CD3) contribuye nuevamente a la notable diferencia en la relación  $T_c/T_s$  ( $p \leq 0.0002$ ) que se inclina en favor de CD3.

En cuanto a los resultados expresados como números absolutos hay un incremento de CD3 y CD11 ( $p \leq 0.001$ ) en T-PC. Y también al compararlas con totales de CN ( $p \leq 0.05$ ), lo cual resulta contrastante con los valores inferiores de totales al respecto a T-CN ( $p \leq 0-01$ ).

TABLA No. 32

Comparación entre determinaciones en linfocitos totales y linfocitos T purificados <sup>#</sup>				
	Totales CJ	Totales PC	T-CN	T-PC
OKT3	66±14	50±22	31±14	73±13
OKT4	36±11	27±16	31±8	25±14
OKT8	24±8	21±12	42±21	55±9
OKM1	--	59±27	64±16	50±20
OKT11	64±16	54±24	96±3	30±5
Tc/Ts	1.71±0.76	1.57±1.39	1±0.61	0.43±0.26

# Valores porcentuales.

TABLA No. 33

Comparación entre determinaciones en linfocitos totales y linfocitos T purificados <sup>&amp;</sup>				
	Totales CN	Totales PC	T-CN	T-PC
OKT3	1,369±593	372±637	1,137±573	936±119
OKT4	533±331	264±259	333±250	206±157
OKT8	339±215	195±136	517±370	534±157
OKM1	--	917±759	375±305	725±275
OKT11	1,326±621	369±712	1,336±503	1,303±331

& Valores absolutos.

## DISCUSION.

Existen diversas formas de analizar el presente trabajo en cuanto a que está compuesto por diversos aspectos que influyen en la determinación de una u otra subpoblación entre las que fueron estudiadas como se describió en Material y Métodos y por las razones expuestas en la introducción. Entre las variables que se han incluido está la presencia del Cáncer en un grupo de pacientes a quien se denomina inicialmente como un solo grupo (PC). Sin embargo, la introducción del tratamiento convencional que ha sido administrado en base a cobaltoterapia resulta una variable muy importante en cuanto a que nos permite suponer que los cambios observados en una misma persona, que ya padecía un tumor, características individuales, 5 semanas después de iniciar su tratamiento radiante se deben precisamente a que han sido inducidos por el tratamiento. Por supuesto, la evolución del tumor, el estadio en que se encuentra, y las condiciones generales del paciente además de la situación inmune propiamente dicha hacen muy compleja la interpretación de datos que sólo constituyen una pequeña parte de aquello que podría evaluarse. Por ello el grupo de PC se subdivide en PCi (que inician) y PCt (que terminan su tratamiento). Adicionalmente, se procuró que el grupo de controles normales (CN) fuera en verdad comparable y por ello se practicó las determinaciones en sangre periférica, de mujeres de edad, extracto socioeconómico y condiciones de sexualidad semejantes a la de las pacientes.

Se estudió la presencia de linfocitos T y subpoblaciones con una determinada funcionalidad (17, 25, 35, 49) - porque estas células son las que juegan un papel preponderante en la respuesta inmunológica contra tumores. -- Por la misma razón se incluyó la identificación de un marcador (CD11) de células NK cuya actividad e importancia han sido ya descritas en la introducción.

La forma de presentar los datos obtenidos también resulta importante por cuanto a que en números absolutos las diferencias son mucho más marcadas, lo que podría considerarse como efecto del padecimiento inicialmente, que se acentúa posteriormente por el tratamiento. Por ello teniendo esto en mente hablaremos fundamentalmente de los resultados en base a los datos porcentuales que permiten además, reconocer la forma en que podría influenciarse la regulación de la respuesta inmune. Si bien es innegable la importancia de una depresión generalizada en la población celular del sistema inmune, - se ha otorgado también una gran importancia a la proporción que guardan entre sí las subpoblaciones celulares de reconocida funcionalidad. Basta enfatizar lo importante que se ha considerado anteriormente si la población linfocitaria estaba compuesta fundamentalmente de T o B y las repercusiones que de ello derivan. Por supuesto, una vez que contamos con el conocimiento y la tecnología necesaria para reconocer subpoblaciones de T hemos considerado importante aplicarlo en nuestro modelo de estudio donde creemos resulta particularmente importante.

Así, al trabajar con linfocitos totales de sangre periférica pudimos constatar disminuciones significativas en células CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> de PC. Al subdividir PC, observamos que aunque en PCI había una tendencia general a tal disminución, era en sangre de PCt en donde los valores de CD3 (OKT3 e IORT-3) y CD4 (OKT4 ó BMAO4O) - estaban realmente disminuidos permitiendo inclusive una alteración ya significativa de Tc/Ts (1.31) en relación a CN.

Es conveniente notar que aunque CD2 es otro Ag -- marcador de células T no hubo diferencia significativa más que cuando se analizó los datos como números absolutos y no porcentuales. Así, resulta lógico que no exista tampoco diferencias con los CN en cuanto al % - de rosetas al 1% o al 5%.

Por otra parte las determinaciones hechas en poblaciones celulares T enriquecidas hasta un porcentaje cercano al 100% (>95%) por el método de rosetas resultaron en un porcentaje igualmente elevado de células CD2<sup>+</sup> puesto que como es sabido corresponden precisamente a células T con receptor para eritrocitos de conejo. Sin embargo, resulta inesperado la gran discrepancia en algunos valores individuales tanto de PCI como de CN en relación a la cuantificación de CD3, lo cual deberá ser verificado en futuras determinaciones pues si bien no se trate del mismo antígeno ni tienen que ser forzosamente encontrados al mismo tiempo en las células T, en algunos casos la diferencia resulta mucho más amplia de lo que cabría esperar.

Se observa también con este enfoque un nuevo enriquecimiento de células CD8<sup>+</sup> en relación a los valores de linfocitos totales y aún en estos T de PCI en contra de las T de CN. Ambos relatados concuerdan con diferentes caminos y eficiencias de activación a través de CD2 y CD3<sup>(9,16)</sup> así como un enriquecimiento en CD8<sup>(12,15)</sup> que se ha observado en algunos trabajos posterior a purificación de células CD2<sup>+</sup> por rosetamiento y gradientes repetidas. Como quiera que sea lo verdaderamente interesante es que esta técnica puede estar haciendo más evidente una alteración en la relación Tc/Ts que de otro modo no sería posible - tal vez observar. De cualquier manera, los resultados de estos experimentos han de ampliarse con mayor número de datos y pronto se podrá obtener conclusiones más concretas que habrán de definir la utilidad del procedimiento así como la importancia de los hallazgos obtenidos.

La población de linfocitos NoT estudiada derivó también de PCI solamente y de unos pocos CN. Sin embargo, - como se hace notar en la sección de resultados, es importante destacar que en CN las células CD11 están muy cercanas a un valor de cero mientras que en PCI se observa un rango muy amplio. Desafortunadamente aún no contamos con suficientes datos pero se está trabajando actualmente para ampliarlos y poder estar en condiciones de afirmar las diferencias que vendrían a mejorar nuestro conocimiento de la situación inmunológica en OAGU para poder entender también mejor la fenomenología involucrada.

Finalmente, los datos que se present a en cuanto a las cuentas totales y diferenciales de leucocitos, vienen a continuar lo reportado en otros artículos<sup>(4,11)</sup> en



relación a las condiciones generales de leucopenia, eosinofilia y neutrofilia observadas en PC. Tales condiciones se ven afectadas al final del tratamiento, como queda demostrado una vez más que no es aceptable una asociación directa y exclusiva entre respuesta inmune y leucopenia o linfopenia puesto que hay diversas variables involucradas concernientes tanto a la radiación de los pacientes (tipo, dosis, tiempo, etc.) como a las condiciones generales de los mismos (edad, nutrición, peso, obesidad, factores genéticos, etc.) y a las características particulares del tumor (localización, extensión, estirpe histológica, etc.).

Adicionalmente, consideramos haber añadido a las variables citadas otras más, dependientes del enfoque que personalmente hemos utilizado.

## CONCLUSIONES.

### 1) Generales.

a) Las PC presentan leucopenia, linfopenia, eosinofilia y neutrofilia, que por regla general, se acentúan con el tratamiento radiante que se les administra.

b) La interpretación de los datos es diferente conforme se analicen mediante números absolutos o porcentajes. Ambas formas de estudio requieren de atención adecuada.

c) Por lo general y dadas las condiciones iniciales de los pacientes, las diferencias se hacen más significativas al hablar de números absolutos de cualquiera de las subpoblaciones.

d) Las dosis tóxicas de radiación administradas localmente contribuyen a efectos depresivos sistémicos sobre el sistema inmune. Sin embargo, existe una radiosensibilidad diferencial de las subpoblaciones de linfocitos y ello puede ser importante en la posterior evolución clínica de la PC.

### 2) Particulares.

a) La población de células CD3 y CD4 está disminuida en el grupo de PC. Sin embargo, su verdadera disminución (relativa) se observa en PCt, afectándose también la relación  $Tc/Ts$  en favor de CD3.

b) Las determinaciones en poblaciones enriquecidas de CD2 permiten apreciar un enriquecimiento en CD3 que es más notable en PCi que en CH.

c) La población de células CD11<sup>+</sup> es aparentemente más reducida entre células NoT de CN que entre NoT de PC, T (de CN y PC) y totales (PC).

d) Es necesario continuar profundizando en los aspectos relacionados con la respuesta inmune de PC a fin de poder dilucidar mecanismos e interacciones que pueden estar involucrados y poseer significancia en el tratamiento y en una mayor oportunidad de supervivencia para los pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Aguilar-Santelises, M., López-Santiago, R., Santos-Argumedo, L. & Jiménez-Zamudio, L. Mitogen induced LIF--production in T-lymphocyte subpopulations. Rev. Lat-amer. Microbiol. 29:21-25 (1987).
2. Aguilar-Santelises, M. Inmunología de tumores. Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología. 2:29-35 (1984).
3. Aguilar-Santelises, M. Marcadores con función de receptores en linfocitos T humanos. Métodos de estudio. Rev. Lat-amer. Microbiol. 24:247-254 (1982).
4. Aguilar-Santelises, M., Santos-Argumedo, L., Rodríguez-Coqueiz, G., Jiménez-Zamudio, L. & García-García, G. Lymphocyte subpopulations from patients with cervical uterine carcinoma undergoing radiation therapy. Rev. - Lat-amer. Microbiol. 25:203-211 (1983).
5. Allison, A.C. Immunological surveillance of tumours. Cancer Immunol. Immunother. 2:151-155 (1977).
6. Andrade-Sánchez, A., Crespo, J.A. & Weingerz, S. Neoplasias malignas del cérvix uterino. Revista Promeco No.20.
7. Bach, J.F. Las células de la inmunidad. En: Bach, J. F. & Lesavre, Ph. Inmunología. (Ed. Masson, S.A.) pp. 7-9 (1983).
8. Bancroft, H. Introducción a la bioestadística. (Ed. Universitaria de Buenos Aires, 8a. ed.) pp. 204-214 (1974).
9. Berzins, T., Vargas-Cortés, M., Hammarström, M.L., -- Larsson, Å., Aguilar-Santelises, M., Andersson, G., - Hammarström, S. & Perlmann, P. Monoclonal antibodies - against leucoagglutinin reactive human T-lymphocyte - surface components. II. Studies on the mechanism of - K46M induced activation and determination of the ---- frequency of responding cells. Scand. J. Immunol. (En prensa).

10. Brain, P., Gordon, J. & Willets, W. A. Rosette ----  
formation by peripheral lymphocytes. Clin. Exp. --  
Immunol. 6:631-633 (1970).
11. Campbell, A. C., Wiernik, G. & Wood, I. -----  
Characteristics of lymphopenia induced by radiotherapy.  
Clin. Exp. Immunol. 23:200-298 (1976).
12. Chassagne, J., Chollet, Ph., Ferriere, J. P., Touzet,  
Cl., Ruse-Riol, F. & Plagne, R. Correlation between  
active E-rosettes and antigens defined on peripheral  
lymphocytes by OKT4 and OKT8 monoclonal antibodies. -  
Immunol. Letters 4:335-337 (1982).
13. Chee, C. A., Ilbery, P. T. & Rickinson, A. B. -----  
Depression of lymphocyte replicating ability in ----  
radiotherapy patients. Br. J. Radiol. 47:37-43 (1974).
14. Chretien, P. B., Crowder, W. L., Tertner, H. R., ----  
Sample, W. F. & Catalona, W. J. Correlation of ----  
preoperative lymphocyte reactivity with the clinical  
course of cancer patients. Surgery, Ginecol. Obst. -  
136:380-384 (1973).
15. Dickinson, A. M., George, S. & Proctor, J. T cell --  
subpopulations in CLL: methods of T cell enrichment -  
artificially alter proportions of OKT4 and OKT8 positive  
cells. Clin. Exp. Immunol. 54:525-531 (1983).
16. Dillner-Centerlind, M. L., Hellström, U., Robertson,  
E. S., Hammarström, S. & Perlmann, P. Mitogenic --  
responsiveness of human T-lymphocyte subpopulations:  
regulation by suppressive Fc-receptor-bearing T cells  
and influence of fractionation procedures. Scand. J.  
Immunol. 12:13-21 (1983).

17. Parcet, J. P., Tourdin, M. P., Celvo, C., Oudrhiri, N., Divine, M., Bouguet, J., Prodelizzi, D., Seuk, A. & Reyes, F. A subset of OKT4 peripheral T cells can generate colonies containing mixed progeny with OKT4<sup>+</sup> helper and OKT8 suppressor cells. *Eur. J. Immunol.* - 15:1067-1073 (1985).
18. Favila, L., Jiménez, L., Castro, M. E., García-----García, G., Gutiérrez, A. & Pulido. Blocking plasma factors of migration inhibition factor production in patients with cervical carcinoma. *J. Natl. Cancer - Inst.* 60:1279-1282 (1978).
19. Froland, S. S. Banding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A probable marker of T lymphocytes. -- *Scand. J. Immunol.* 1:269-280 (1972).
20. Hellström, I., Sjögren, H.O., Warner, G. & Hellström, K. E. Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasm. *J. Cancer.* 7:226-237 (1971).
21. Herrmann, P., Lochner, A., Philippen, H., Jauer, B. & Rühl, H. Imbalance of the cell subpopulations in patients with chronic lymphocytic leukaemia of the B cell type. *Clin. Exp. Immunol.* 49:157-162 (1982).
22. Holter, W., Majdic, O., Liszka, K., Stockinger, H. & Knapp, W. Kinetics of activation antigen expression by in vitro-stimulated human T lymphocytes. *Cell ---- Immunol.* 20:322-330 (1985).
23. Janosy, G. & Greaves, M. P. Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocytes to mitogens. *Clin. . Exp. Immunol.* 9:483-498 (1971).

24. Job, G., Pfreundschuh, M., Bauer, M., Winkel, K. & Hunstein, W. The influence of radiation therapy on T lymphocyte subpopulations defined by monoclonal antibodies. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 10:2077-2081 (1984).
25. Jordal, M., Holm, G. & Wigzell, H. Surface markers on human B and T lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non immune rosettes with -- sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* 136:207-215 - (1972).
26. Jonsdottir, I., Dillner-Centerlind, M-L., Perlmann, H. & Perlmann, P. Antibody dependent cellular -- cytotoxicity and mitogen responsiveness of human - peripheral blood lymphocytes differing in avidity for sheep erythrocytes. *Scand. J. Immunol.* 10:525--533 (1979).
27. Kaplan, M. E. & Clark, C. An improved rosetting - assay for detection of human T lymphocytes. *J. Immunological Methods.* 5:131-135 (1974).
28. Katz, D. H. El sistema immune. Generalidades. En: Fudenberg, H. H., Stites, D. P., Stobo, J. D. & - Wells, J. V. *Inmunología básica y clínica.* (Ed. El Manual Moderno, 4a. ed.) pp. 13-21,(1983).
29. Kjörstad, K. E. Carcinoma of the cervix in the -- young patient. *Obst. Gynaecol.* 50:23-30 (1977).
30. Koelsche, G. A. Immunologic factors in cancer: A review. *Proceedings of the Staff Meetings of The - Mayo Clinic.* 37:219-223 (1962).

31. Koss, L. G. Epidemiology of carcinoma of the uterine cervix. Proceedings XI International Cancer Congress. Florence 1974 Vol. 3.
32. Menori, I., Kushilevsky, A., Segal, S. & Weinstein, Y. Radiosensitivity of isolated subsets of human lymphocytes ( $E^+$ , OKT4, OKT8); Protective role of monocytes and monokines. Clin. Immunol. 59:453-461 (1984).
33. Mekori, T., Sher, S. & Robinson, E. Suppression of the mitogenic response to Phytohemagglutinin in -- malignant neoplasia: Correlation with clinic stage and therapy. J. Natl. Cancer Inst. 52:9-12 (1974).
34. Mills, K. H. G. & Cawley, J. C. Suppressor T cell in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: ----- Relationship to clinic stage. Leukaemia Research - 6:653-657 (1982).
35. Moore, K. & Nesbitt, A. M. Functional heterogeneity of  $CD4^+$  T-lymphocytes: Two subpopulations with the monoclonal antibodies WR16 and WR19. Immunol. 61: 159-165 (1987).
36. Moretta, L., Webb, S. R., Grossi, C. E., Lydyard, P. M. & Cooper, M. D. Functional analysis of two human T cell subpopulations: Help and suppression of B cell response by T cells bearing receptors for  $Ig^m$  or  $IgG$ . J. Exp. Med. 146:184-200 (1977).
37. Morimoto, C., Bores, Y., Schlossman, S. F. & ---- Reinherz, E. L. Communicative interactions between subpopulations of human T lymphocytes required for generation of suppressor-effector function in a - primary antibody response. J. Immunol. 128:1645---1650 (1982).



38. Moss, W. T. The cervix. Therapeutic Radiology: -- Rational technique results. 2a. ed. pp. 312-352.
39. Orozco- Cruz, R., Aguilar-Santelises, M., Rodriguez-Coquiez, G. & Estrada-Parra, S. Determinación de complejos inmunes circulantes y parámetros asociados en pacientes con cáncer cérvico-uterino. Rev. Lat-amer. Microbiol. 29:145-151 (1987).
40. Puley, A. T., Füst, G. & Csönör, A. Serum complement levels in patients with cancer of the uterine before and after radiation therapy. Neoplasia. 27:211-216 (1980).
41. Raben, M., Walach, N., Galili, U. & Schlesinger, M. The effect of radiation therapy on lymphocyte --- subpopulations in cancer patients. Cancer 37:1417-1421 (1976).
42. Rafia, S., Yang, S. J. & Meleka, P. D. Changes in cell-mediated immunity in patients undergoing --- radiotherapy. Cancer 41:1076-1086 (1978).
43. Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. & -- Schlossman, S. F. A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH<sub>2</sub>. J. Immunol. 124:1301-1307 (1980).
44. Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. The differentiation and function of human lymphocytes. Cell 13:821-830 (1983).
45. Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. Current ---- concepts in immunol. Regulation of the immune ---- response inducer and suppressor T lymphocyte ---- subsets in human beings. N. Engl. J. Med. 303:370-373 (1980).

46. Semenzato, G., Herrmann, F. & Mills, H.G. T cell - subpopulations in B cell lymphocytic leukaemias. -- Clin. Exp. Immunol. 57:752-754 (1984). -
47. Siegel, S. Estadística no paramétrica. (Ed. Trillas, 2a. ed.) pp. 143-154 (1974).
48. Silk, M. Effect of plasma from patients with ----- carcinoma on in vitro lymphocyte transformation. J. Natl. Cancer Inst. 12:2088-2089 (1970).
49. Suez, D. & Hayward, A.R. Phenotyping of proliferating cell in cultures of human lymphocytes. J. Immunol. Methods 78:49-57 (1985).