

30
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

**EVIDENCIAS DE QUE LOS LEUCOCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER CERVICOC
UTERINO CONSERVAN SU CAPACIDAD DE PROLIFERAR
EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA 2 RECOMBINANTE
Y DE QUE EL SUERO DE ESTAS PACIENTES NO
CONTIENE UN FACTOR INHIBIDOR
DE TAL RESPUESTA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

LETICIA ROCHA ZAVALETA

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
I. Cultivo de Tejidos	2
II. La Sangre	6
III. El Sistema Inmune	9
IIIa. Los Sistemas de Protección	9
IIIb. Composición Celular del Sistema Inmune	13
IIIc. Inmunoglobulinas	17
IIId. Desarrollo y Maduración de las Células Linfoideas	18
Linfocitos B	18
Linfocitos T	21
IIIe. Cooperación y Desarrollo de la Respuesta Inmune	24
IV. Inmunología Tumoral	27
V. Cáncer Cérvico Uterino	30
METODO	35
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFIA	62
APENDICES	78

RESUMEN

Uno de los problemas de salud pública más graves en nuestros días es, sin duda alguna, el cáncer. En nuestro país el tipo de cáncer más frecuente en la población femenina es el cérvico uterino (CaCu), al cual se le ha asociado con una posible etiología viral. Esto último le ha hecho aparecer como un buen candidato para ser tratado por Inmunoterapia Adoptiva, la cual se basa en la producción de células citotóxicas específicas. *In vitro*, en un número suficientemente grande para que al ser transferidos *in vivo* puedan ejercer su actividad citolítica contra el tumor. Se plantea, por otra parte, la posibilidad de que el rechazo inmune hacia las neoplasias *in vivo* no se lleve a cabo con eficacia por la presencia de daños en las células linfocíticas que les impidan responder ante el estímulo mitogénico ejercido por la interleucina-2 (IL-2), o bien por la existencia a nivel sérico de algún factor inhibidor de esta respuesta secretado por las mismas células tumorales.

Con la finalidad de saber si los LSP de pacientes con CaCu presentan algún daño en su capacidad de responder ante el estímulo proliferativo de la IL-2, y de conocer si en el suero de estas pacientes existe algún factor capaz de inhibir tal respuesta, se cultivaron LSP de pacientes con CaCu y de donadores sanos en presencia de rhlL-2, con sueros de las pacientes, de donadores normales y fetal de caballo. Se pudo observar que los LSP de las pacientes proliferaron en presencia tanto de los sueros de donadores sanos como del fetal de caballo, lo cual indica que no presentan daño alguno que les impida proliferar ante la activación por IL-2. Por otra parte, los LSP, tanto de las pacientes como de los donadores sanos, que fueron cultivados en presencia del suero de las pacientes mostraron proliferación, lo cual nos hace sospechar que no existe un factor inhibidor de la respuesta mitogénica ante la presencia de la IL-2. pacientes.

Para finalizar, se discute la importancia de los datos obtenidos ya que permiten conocer que la capacidad responsiva de los LSP de pacientes con CaCu a estímulos proliferativos naturales se conserva y permite así su aplicación en el desarrollo futuro de una Inmunoterapia Adoptiva.

INTRODUCCION

I. CULTIVO DE TEJIDOS.

En 1878 *St. Semard* apuntó sobre la importancia del ambiente interno (*milieu interieur*) en la regulación de las actividades de los tejidos vivos. De acuerdo con su concepción, el ambiente no es solamente los productos del metabolismo del tejido, sino las reacciones en torno a las cuales este se desarrolla y regula su actividad^(1,2).

La veracidad de la idea acerca de las interacciones célula-ambiente ha sido plenamente comprobada en nuestros días a través de estudios de las propiedades funcionales de las células, y de como estas afectan y son afectadas por su ambiente inmediato. El área clave utilizada por los estudiosos para la obtención de este conocimiento, ha sido el cultivo de tejidos o cultivo de células *in vitro*, técnica que permite el aislamiento de tipos celulares a partir de un individuo y su conservación y propagación dentro de medios nutritivos de cultivo, bajo condiciones controladas de laboratorio.

Uno de los problemas esenciales con el que se enfrentaron los pioneros en el cultivo de tejidos fue la falta de un medio nutritivo adecuado para el mantenimiento de las diferentes estirpes celulares. En 1941 *J. Fickes*⁽³⁾ propuso el uso de un medio de cultivo sintético. El desarrollo de éste corrió por cuenta de *M. Fogel*⁽⁴⁾ quien en 1955 elaboró la fórmula para un medio mínimo esencial, que está constituido por 15 aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y una fuente de Carbono (Glucosa), el cual era capaz de sostener la supervivencia y proliferación de ciertas células de mamífero, sin necesidad de algún tipo de suplemento.

La obtención de un medio de cultivo sintético representó un gran paso en el avance de las técnicas de cultivo de tejidos sin embargo, la multiplicidad de factores que influyen sobre el crecimiento de los diversos tipos celulares (a sólo hubo de manifestarse al momento de intentar el cultivo *in vitro*), traduciéndose en requerimientos específicos de acuerdo a la especie celular a tratar. Así se

hizo necesario el empleo de suplementos, y con esto, se enriqueció el medio esencial propuesto por *E. Eagle*, ya con hormonas indicadas, ya con metabolitos especiales y, de una manera más generalizada, con el uso de sueros de caballo, fetal de bovino o humano, sinceos que poseen de importantes promotores del desarrollo celular al medio que las soporta.¹⁸⁸

Los sueros son sustancias de una complejidad, no existiendo una definición completa y precisa de su composición. Se conoce, a grosso modo, la presencia de hormonas, factores y cofactores que intervienen, ya sea como estimuladores o como inhibidores, en el desarrollo celular. Su presencia, sin embargo, no resulta constante y varía de lote a lote, situación que debe ser tomada en cuenta cuando se realizan estudios sobre las propiedades de componentes en el medio de cultivo.

El establecimiento de las condiciones globales que deben ser cubiertas para la generación de cultivos *in vitro*, resultado de la recopilación hecha por *E. Man¹⁸⁹* a partir de 1965, de estudios realizados por *G. Zaid¹⁹⁰* y *K. Vavra¹⁹¹*, tales condiciones pueden ser resumidas de la siguiente manera:

- sustrato o superficie de crecimiento
- sales inorgánicas en el medio de cultivo, O_2 y CO_2 disueltos
- variables fisicoquímicas, como la temperatura (37°C), pH (6.8-7.2), osmolaridad, potencial redox y un sistema amortiguador en el medio de cultivo
- nutrientes esenciales para la biosíntesis y el metabolismo, entre estos los azúcares, aminoácidos, vitaminas, componentes nucleicos y elementos traza
- factores reguladores y hormonales para la multiplicación celular
- el uso de antibióticos como Penicilina y Estreptomicina para reforzar la esterilidad del medio
- humedad saturante en el medio de cultivo (100%) y
- las técnicas de manejo de células durante el cultivo y el subcultivo.

Una vez establecidas las condiciones básicas para el cultivo de células *in vitro* se ha podido dar un uso extensivo a esta técnica, siendo actualmente aplicada dentro de un campo amplísimo de la investigación científica y tecnológica; algunas de las disciplinas que han adoptado esta práctica como una herramienta útil para su desarrollo son: Genética, Diferenciación, Inmunología, Endocrinología, Virología, Citotoxicología, Cultivo de Tejidos Vegetales y en la obtención de productos del metabolismo celular (moléculas recombinantes, sustancias con aplicaciones farmacéuticas, etc.)¹⁹².

Cada una de estas especialidades del quehacer científico posee objetivos y métodos particulares, sin embargo todas corren hacia una meta común: el bienestar humano. De aquí se desprende el hecho de que una gran parte del esfuerzo de los investigadores en cultivo de tejidos sea dedicado a la obtención de cultivos celulares provenientes de tejido humano; de tal forma, a la fecha, se ha logrado el establecimiento de un número muy elevado de líneas celulares a partir de diversos tipos de tejido humano. Uno de ellos, el tejido conectivo, ha sido motivo para el estudio y obtención de líneas de un tipo celular de origen sanguíneo, importantísimo desde el punto de vista del buen desarrollo fisiológico de los organismos, los leucocitos.

La historia del cultivo de células leucocíticas se remonta al siglo XIX, cuando fueron realizados los intentos primarios para lograr mantener vivas las células fuera del organismo. Uno de los ejemplos clásicos lo constituye J. D. von Recklinghausen⁽¹²⁶⁾, quien en 1866 logró conservar vivas células sanguíneas de anfibio dentro de un contenedor estéril bajo una variedad de condiciones a lo largo de 33 días.

Ya en este siglo, J. Kelly⁽⁷⁷⁾ completó una serie extensiva de observaciones sobre la división de leucocitos de anfibio cultivados fuera del organismo por un mes. Tres años más tarde, S. Suda y J. Suda⁽⁸¹⁾ cultivaron un linfosarcoma infeccioso de un perro en la sangre de animales susceptibles y resistentes.

Fue a partir de 1975 que se inició la descripción de diversas técnicas para el crecimiento en cultivo de colonias de células leucocíticas a partir de la extracción de las células mononucleadas de sangre periférica humana⁽⁴⁰⁾. Algunos de los primeros intentos fueron realizados en medios de cultivo semisólidos⁽¹³⁰⁾. Sin embargo, el avance de la investigación en esta área requirió del empleo de medios de cultivo que permitieran una mayor facilidad en el control de las condiciones ambientales a evaluar. De tal forma, el uso de los medios de cultivo líquidos se ha generalizado y, dependiendo de las necesidades de cada trabajo, se utilizan modificaciones del Medio de Eagle⁽¹⁰⁷⁾, o RPMI⁽⁷⁸⁾.

La posibilidad de obtener poblaciones coloniales a partir de un tipo celular determinado facilita la labor del investigador, al proveerle de un número elevado de células que le permiten realizar diversos ensayos. El caso de las células linfoides es especial, ya que se ha observado que requieren de la presencia de ciertos factores de crecimiento o modificadores biológicos para su clonación^(63,69).

El cultivo *in vitro* de células linfoides a permitido conocer algo más acerca de la participación de este tipo celular dentro de la respuesta inmune. Gracias a esto se ha logrado el diseño de innovadoras terapias médicas, basadas en el poder que estas células poseen para la eliminación de cuerpos extraños en el organismo, para el tratamiento de enfermedades tan graves como el cáncer^{1003.44.004.140}. Asimismo, el mantenimiento e inmortalización de células linfoides se conserva como un importante legado, tanto para los actuales como para los futuros investigadores de los misterios que guarda el funcionamiento conjunto de los componentes de la sangre así como del poderoso ejército de defensa del organismo, el sistema inmune.

II. LA SANGRE.

El ser humano al través del tiempo ha podido percatarse de lo importante y esencial que resulta la sangre para la vida. La historia nos habla acerca de la antigua creencia en la que se establece que "sangre es igual a vida". Parte de esta actitud mística hacia la sangre persistió aun por mucho tiempo, y la encontramos reflejada en un amplio número de actividades humanas. Un ejemplo claro lo tenemos en una de las obras maestras de la literatura alemana, el Fausto de W. Goethe ⁽¹⁸⁰⁸⁾, donde un personaje muy peculiar (Meistófeles) hace alusión al fluido sanguíneo al decir "Blut ist ein ganz besonderes Saft" -la sangre es un fluido muy singular-.

Hoy sabemos que tales concepciones son en gran parte verdad, ya que conocemos que la sangre es el infatigable sistema de tránsito del organismo, y que cuenta con dispositivos especiales para llevar oxígeno de los pulmones a las células y el bióxido de carbono de las células a los pulmones; para conducir desperdicios nitrogenados a los riñones y los productos de la digestión al hígado; para transportar azúcares, lípidos y proteínas a todas las células; para llevar iones, hormonas y vitaminas adonde sean necesarios y para traer a las reservas de defensa a los lugares de invasión por peligros externos ⁽²⁾.

Cada una de estas funciones es desempeñada por algún componente específico de la sangre. El fluido sanguíneo está constituido por una matriz líquida, conocida como plasma sanguíneo y por una serie de células, muchas veces llamadas "elementos figurados de la sangre", a saber: leucocitos, eritrocitos y trombocitos o plaquetas. Los elementos figurados constituyen aproximadamente el 45% del volumen sanguíneo y el plasma líquido el 55% restante ⁽³⁾.

Uno de los descubrimientos más importantes que se han hecho en este siglo con respecto de las propiedades de la sangre fue el realizado en 1901 por el fisiólogo austriaco K. Landsteiner, quien observó la presencia de factores de aglutinación específicos para los eritrocitos en el plasma sanguíneo, y sus variantes en distintos donadores. Tales factores dan lugar a lo que hoy conocemos como grupos sanguíneos ⁽⁴⁾.

Los grupos sanguíneos están determinados por estructuras antigénicas sobre la superficie de los eritrocitos y son detectados por reacciones con anticuerpos específicos. El

fenotipo antigénico está bajo control genético y se mantiene relativamente constante a lo largo de la vida¹⁰. Se habla de relatividad porque existe la posibilidad de que se presente en el individuo alguna enfermedad que provoque desórdenes a nivel de las membranas celulares, y que propicien cambios en los fenotipos antigénicos.

Los anticuerpos para los antígenos de los grupos sanguíneos se encuentran en el suero de los individuos y se conocen con el nombre de isohemaglutininas naturales, se trata de inmunoglobulinas del tipo IgM que tienen un efecto hemolítico¹¹.

Se han reportado a la fecha un gran número de grupos sanguíneos, sin embargo el de mayor importancia clínica es el descrito por K. Landsteiner, que de acuerdo a sus observaciones clasificó a los seres humano dentro de cuatro grupos, que dieron forma al sistema ABO (Tabla 1).

SISTEMA ABO.

GRUPO SANGUÍNEO	ANTIGENO SOBRE CELULAS ROJAS	ANTICUERPO EN SUERO
O	Ninguno	Anti-A y Anti-B
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A y B	Ninguno

Tabla 1. Se muestran los grupos sanguíneos que dan forma al sistema ABO, propuesto por K. Landsteiner, así como los antígenos presentes en los eritrocitos y los anticuerpos que se encuentran en el suero de los individuos para cada grupo sanguíneo. (tomado de Mack. E. W. 1967).

De acuerdo con la tabla anterior y dada la presencia de anticuerpos y antígenos específicos en la sangre se puede establecer un patrón de compatibilidad entre seres humanos aplicable en el proceso de la transfusión sanguínea (Figura 1).

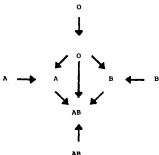


Figura 1. DIAGRAMA DE COMPATIBILIDAD SANGUÍNEA.

El esquema de compatibilidad sanguínea puede resumirse en este sencillo diagrama, en el cual se indica, mediante la dirección de las flechas, los grupos entre los que pueden realizarse transfusiones. (tomado de: Aarimov, I. 1968).

Como se ha visto, el organismo puede rechazar un paquete celular sanguíneo que no le sea compatible. De manera similar, posee la capacidad de reconocer agentes externos potencialmente dañinos y de eliminarlos a través de la serie de mecanismos que dan forma al sistema de protección natural de los individuos, conocido como Sistema Inmune.

III. EL SISTEMA INMUNE.

Antes de que el sistema inmune de los vertebrados evolucionara hasta ser lo que hoy conocemos, existía un grupo de células especializadas en el desalojo de partículas extrañas. En las grandes especies estas células jugaron un papel vital en la inducción de la inmunidad¹¹¹⁰.

Los actuales vertebrados contamos con un mecanismo que nos protege contra algunos factores causales de enfermedades, tales como microorganismos patógenos (filicenses bacterias o virus), parásitos y células que sufren alguna transformación maligna. Dicha defensa se desarrolla mediante el reconocimiento específico y eliminación selectiva de invasores extraños a través de un proceso conocido como Respuesta Inmune¹¹¹¹.

La respuesta inmune posee tres grandes características:

1. responde adaptativamente contra los invasores extraños,
2. exhibe una especificidad exquisita, y
3. manifiesta una memoria a largo plazo a partir de contactos tempranos con patógenos específicos.

El desarrollo de la Inmunología (estudio del Sistema Inmune) ha contribuido significativamente con la medicina moderna en áreas como la transfusión sanguínea, la vacunación, el trasplante de órganos y el tratamiento de alergias, enfermedades autoinmunes y cáncer, una vez que nos permite conocer como la función de los Sistemas de Protección natural del organismo y como es ejercida.

IIIa. Los Sistemas de Protección.

El proceso de protección y vigilancia del organismo se requiere como un imponente complejo de actividades bioquímicas y celulares, llevadas a cabo bajo estricta cooperación y armonía de sus partes. La complejidad que encierra la concepción holística de semejante portento biológico llevó a su separación en dos fragmentos funcionales, para lograr así, dar un cauce de mayor sencillez a los estudios en este campo. Así fueron designados y diferenciados dos conceptos, primero, el Sistema Inmune Innato y segundo, el Sistema Inmune Adaptativo.

El Sistema Innato o No Adaptativo para la defensa del organismo, lo protege contra infecciones. Los elementos de este sistema incluyen la piel, células defensivas internas y proteínas circulantes (Figura 2). Colectivamente, estos

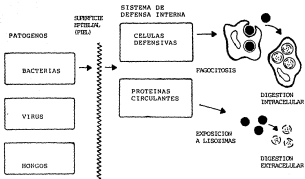


Fig. 2. SISTEMA DE DEFENSA NO ADAPTATIVO.

En esta figura se ilustran la barrera epitelial y dos reacciones de defensa contra bacterias. (Tomado de: Hoed, 1984)

elementos deben servir como la primera línea de defensa contra invasores externos ya que el Sistema Inmune, en su forma Adaptativa, requiere de tiempo para responder al ataque de patógenos.

El primer elemento del sistema inmune no adaptativo es la piel, que está compuesta por células epiteliales queratinizadas que se constituyen en una barrera pasiva para la penetración de patógenos. Sin embargo, dicho obstáculo es muchas veces salvado por agentes externos, quienes penetran al organismo y son interceptados, inmediatamente, por células defensivas de respuesta inespecífica. Estas incluyen a los fagocitos¹, los cuales digieren la gran mayoría de los organismos invasores y a las células asesinas naturales (NK)², las cuales reconocen y eliminan rápidamente muchos tipos de células parasitadas y células transformadas. Dentro del grupo de células fagocitarias encontramos a los monocitos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares; al igual que las NK, todas estas tienen su origen en la médula ósea y desarrollan su ataque a través de procesos líticos (citólisis) o inhibidores del crecimiento (citostasia)¹⁹⁸⁹ (Figura 3).

Otro de los elementos formadores del sistema de defensa no adaptativo son los factores humorales circulantes, estos incluyen proteínas como la lisozima, la proteína C-reactiva y algunas otras con el papel de ligar las superficies bacteriales e iniciar las reacciones de eliminación. Algunas de estas proteínas humorales están siempre presentes, mientras que otras son rápidamente inducibles cuando es necesario atacar¹⁹⁹¹.

La protección inmune adaptativa es un sistema dual, esto es, se mantiene a través de dos bases de defensa, que de manera específica responden contra muchas substancias extrañas. Una de ellas, conocida como respuesta inmune celular, dada por los diferentes tipos de células de la línea linfóide, resulta particularmente efectiva contra hongos, parásitos, infecciones virales extracelulares, células transformadas (cancerosas) y tejido extraño; mientras que la segunda, la respuesta inmune humoral, defiende en primera instancia contra fases extracelulares de infecciones bacteriales y virales. La inmunidad humoral está dada por proteínas llamadas anticuerpos, que circulan contenidas en dos fluidos corporales: el suero, que es el componente

¹ Fagocitos: del griego *phagein*, comer y *kutos*, celda.

² Del Inglés Natural Killier.

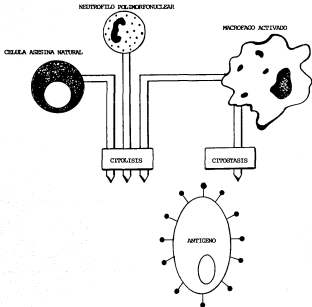


FIGURA 3. Esquematisación de las células que dan forma al proceso de inmunidad natural o humoral. Los neutrófilos, macrofagos y células NK o asesinas naturales tienen efecto sobre el antígeno produciendo citolisis o citostasis. En este tipo de respuesta inmune no se requiere anticuerpos y no se presenta especificidad de ataque. (Tomado de : Roitt, 1985)

líquido remanente de la sangre una vez que se han eliminado las células y el fibrinógeno, y la linfa que es el fluido que baña todos los espacios tisulares⁽¹⁴⁾. Cada uno de los procesos de inmunidad antes descritos involucran una serie de células con funciones y características morfológicas específicas que, en su conjunto son las que dan forma al sistema inmune.

IIIb. Composición Celular del Sistema Inmune.

El sistema inmune está caracterizado por una diversidad de tipos celulares que interactúan entre sí⁽¹⁵⁾. Un conjunto de ellas son conocidas como células accesorias, este grupo está conformado por monocitos y macrófagos⁽¹⁶⁾. Estas células se originan en la médula ósea a partir de un precursor que sufrirá una serie de cambios transicionales que lo llevará a una total maduración^(17,18,19,20). El continuo naturalmente establecido para el desarrollo de estos blastos es acompañado por cambios en composición y metabolismo celular, así como en su arquitectura.

Dentro de la médula ósea el monoblasto (célula precursora) se transforma en pronocito, para dar lugar, posteriormente, al monocito, que ya se encuentra en la sangre, este sufre nuevas transformaciones para dar lugar a un macrófago inmaduro, el cual, ya dentro de los tejidos alcanza su madurez total (conocidos como macrófagos tisulares o maduros) (Figura 4), estos se encuentran en los espacios peritoneal y pleural así como en las cavidades alveolares y en los tejidos.

Uno de los sucesos más importantes que transcurre a lo largo de esta secuencia de cambios es el incremento de enzimas lisosomales, que incluyen, fosfatasa ácida, β -glucuronidasa, catépsina, lisozima y aril-sulfatasa^(21,22,23), lo cual provee al macrófago maduro de un poderoso arsenal de enzimas hidrolíticas.

Las células accesorias tienen dos funciones de importancia primordial, la primera de ellas es la posibilidad de capturar y romper microorganismos y moléculas antigénicas solubles en pequeños fragmentos moleculares de una medida apropiada para que se lleve a cabo la reacción con receptores sobre la superficie de los linfocitos. La segunda es la capacidad de sostener fragmentos antigénicos sobre su superficie y mantenerlos, por largos periodos de tiempo, accesibles a los linfocitos que migran hasta los sitios donde han de llevarse a cabo las reacciones de defensa. Algunas células accesorias tienen glicoproteínas especializadas, como integrantes de sus proteínas membranales, llamadas moléculas

la, que son muy importantes para la actividad inmune¹⁴⁴⁰.

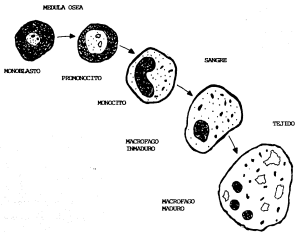


Figura 4. Secuencia del desarrollo de células de la serie - fagocítica mononuclear. (Tomado de : Cline, 1970)

El otro grupo celular que da forma al sistema inmune es el de la familia linfóide, que está a su vez integrada por una serie de dos poblaciones de linfocitos que comparten características morfológicas, pero que poseen diferentes funciones, ciclos de vida y metabolismos. Estas poblaciones son conocidas como linfocitos B y linfocitos T¹.

La línea de células linfoides traza su origen a partir de células tallo pluripotentes en la médula ósea. Estas son células hematopoyéticas que se auto-repican y son capaces de diferenciarse a células unipotentes comprometidas⁽¹⁵⁰⁾. Así, la generación de células del grupo linfóide se desarrollada por células precursoras linfoides comprometidas (Figura 5). La adquisición de compromiso por parte de las células precursoras, es probablemente determinado por el microambiente en el cual se desarrollan⁽¹⁵⁰⁾.

Los linfocitos T y B, se generan, maduran y accionan dentro de un sistema de órganos y circuitos llamado sistema linfóide.

El sistema linfóide está compuesto por órganos linfoides primarios (la médula ósea y el timo), y una colección de órganos linfoides secundarios que se encuentran en sitios donde la respuesta inmune es iniciada, y que están interconectados por un sistema circulatorio compuesto por dos redes de flujo, el torrente sanguíneo y el sistema linfático (Figura 6). Este sistema de circulación tiene tres funciones principales:

- a) filtrar y atrapar antígenos, de todas las partes del cuerpo, en los órganos linfoides secundarios,
- b) promover la circulación de las poblaciones de linfocitos a través de esos órganos, para que los antígenos sean expuestos ante el repertorio de linfocitos antígeno-específicos del organismo en un corto periodo de tiempo y,
- c) transportar los productos de la reacción inmune, células efectoras T antígeno-específicas y anticuerpos humorales al torrente sanguíneo y a los tejidos⁽¹⁵¹⁾.

Los órganos linfoides secundarios son: los nódulos linfáticos, el bazo, las amígdalas, glándulas adenoides, placas de Peyer y el apéndice⁽¹⁵²⁾. Todos ellos son análogos en cuanto a la posesión de ciertas estructuras especializadas que hacen las veces de puertos, a través de los cuales los linfocitos pueden entrar desde el torrente sanguíneo,

¹ Linfocito B por Bursa, órgano del que derivan en los aves.

Linfocito T por Timo, órgano en el cual ocurre su maduración.

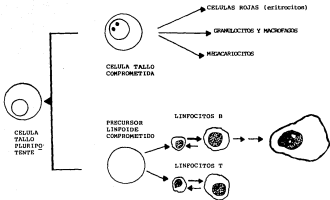


Figura 5. RELACION DE LAS CELULAS LINFOIDES CON OTRAS LINEAS CELULARES HEMATOPOYETICAS.

Las células linfoides, eritrocitos, granulocitos, macrófagos y megacariocitos se derivan de precursores que provienen de una célula tallo pluripotente común. (Tomado de: Cline, 1970)

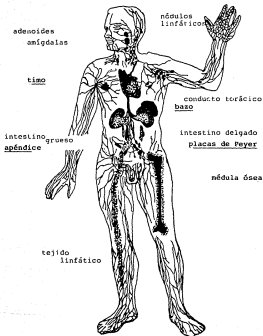


Figura 6. DIAGRAMA DEL SISTEMA LINFÁTICO HUMANO.

El sistema consiste de linfocitos circulantes y órganos linfoides, los cuales incluyen al árbol de vasos linfáticos y nódulos, la médula ósea - en los huesos largos, el timo, el bazo, adenoideas, amígdalas, las placas de Peyer y el apéndice. (Tomado de : Hood, 1984)

dominios discretos que son especiales para células B o T y una arquitectura elaborada para maximizar la interacción de los linfocitos con las células accesorias transportadoras de antígenos⁽⁴⁰⁾.

Como hemos visto, los antígenos y anticuerpos son elementos fundamentales para el desarrollo de la respuesta inmune, por tal motivo resulta pertinente que antes de tratar sobre el desarrollo de las células inmunológicas conozcamos algo acerca de lo que son y como están constituidos los anticuerpos, conocidos molecularmente como, Inmunoglobulinas.

III. Inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas (Ig) son moléculas producidas por los linfocitos B y representan la llave para el entendimiento del reconocimiento inmune, son moléculas protéicas que portan actividad de anticuerpo, es decir, la propiedad de combinarse específicamente con la sustancia que provocó su formación (antígeno)⁽⁴¹⁾.

Con excepción de los anticuerpos naturales, los anticuerpos se originan como respuesta a las sustancias extrañas que se introducen al organismo. Las Ig son moléculas bifuncionales y se ligan de manera específica con el antígeno, iniciando toda una gama de fenómenos secundarios, como la fijación del complemento y la liberación de histamina por las células cebadas, que son independientes de su especificidad por el antígeno⁽⁴²⁾.

A pesar de su gran heterogeneidad, todos los anticuerpos presentan ciertas similitudes estructurales, todos consisten de una subunidad básica compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Dos tienen un peso molecular de 53,000 a 75,000 daltones, dependiendo del tipo de inmunoglobulina, y son conocidas como cadenas pesadas o cadenas H⁴; las otras dos tienen un peso molecular de 22,500 daltones y son denominadas cadenas ligeras o cadenas L⁴⁽⁴³⁾.

Teniendo como base sus propiedades generales, así como las características fisicoquímicas e inorgánicas de sus cadenas H, las inmunoglobulinas pueden ser subdivididas en cinco clases principales: IgG, IgM, IgD, IgE e IgA.

⁴ Cadenas H, del Inglés heavy, pesado.

² Cadenas L, del Inglés light, ligero.

Gracias a estudios realizados con la molécula γ -globulina fue posible la observación de fragmentos funcionales de enorme relevancia⁽¹²⁴⁾. Uno de ellos conocido como Fab², tiene la importante función de ser la pieza de unión entre la Ig y el antígeno. Otro de los fragmentos, el Fc, regula la fijación de la molécula a las células (cebadas, linfocitos y macrófagos, y la fijación del complemento⁽¹²⁵⁾.

El sistema del complemento, es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo. Esta constituido por proteínas séricas diferentes químicamente e inmunológicamente, que son capaces de actuar de manera recíproca, tanto una con otra como con el anticuerpo y con las membranas celulares. Su actividad consiste en la lisis de diferentes clases de células, bacterias y virus, y la mediación directa de los procesos inflamatorios. También induce la migración dirigida de los leucocitos, la fagocitosis y la liberación de los constituyentes lisosómicos de los fagocitos⁽¹²⁶⁾.

III. Desarrollo y Maduración de las Células Linfoides.

LINFÓCITOS B.

El proceso de desarrollo y maduración de los linfocitos B y T involucra dos fases de diferenciación, la primera se caracteriza por ser antígeno-independiente, la segunda por ser dependiente de antígenos (Figura 7).

Los eventos diferenciadores que ocurren en el feto o en órganos como la médula ósea y el timo, en los cuales no existe filtración de antígenos, son considerados como antígeno-independientes. Los linfocitos que se diferencian en estos ambientes se conocen como linfocitos inmaduros; en estos sitios las células en desarrollo adquieren receptores membranales antígeno-específicos y la maquinaria celular para responder ante la estimulación antigénica, estas células se conocen como linfocitos vírgenes. La diferenciación antígeno-dependiente de estos linfocitos resulta eventualmente en la generación de células de memoria y efectoras celulares, probablemente, a través de una clase de células inmaduras intermedias⁽¹²⁷⁾.

² Fab, del Inglés Fraction antigen binding.

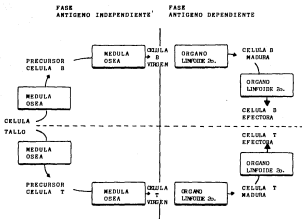


Figura 7. Fases antígeno-independiente y antígeno-dependiente en la maduración de linfocitos T y B. (Tomado de: Hood, 1984)

El término células pre-B se refiere a los precursores del linfocito B. Las células pre-B más inmaduras no expresan cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas⁽¹²⁰⁾. Las células pre-B maduras son capaces de sintetizar cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas^(120,121,122). Asimismo, estas células, en la médula ósea, expresan, por vez primera, proteínas celulares de superficie, como es el caso del antígeno de diferenciación Lyb-2 en el ratón⁽¹²³⁾. La expresión de inmunoglobulinas enlazadas a la membrana es el factor común de los linfocitos B, cuando estos no han alcanzado su madurez expresan moléculas de inmunoglobulina tipo M (IgM), con el tiempo, inician la expresión de anticuerpos o inmunoglobulinas tipo D (IgD) y otras glicoproteínas enlazadas a la membrana, como son los receptores para los componentes del complemento en la porción Fc de los anticuerpos IgG⁽¹²⁴⁾.

Uno de los más importantes componentes superficiales expresado por las células B es la molécula Ia. Esta proteína polimórfica sirve como elemento de reconocimiento en la interacción con células T antígeno-activadas, y representa un requerimiento básico para la activación de células B antígeno-inducidas⁽¹²⁵⁾.

Cuando las células B maduras son activadas a dividirse por estimulación antigénica y ayuda de células T, algunos miembros del clon formado, no continúan su camino diferenciador hacia células plasmáticas, sino que conservan su morfología y adquieren capacidad de vivir largos periodos de tiempo⁽¹²⁶⁾. Esta población clonal recibe el nombre de células B de memoria, y en coordinación con su contraparte de células T se encargan de la respuesta aumentada que resulta de una exposición secundaria a un antígeno.

La etapa final en la diferenciación de las células B da lugar a las células plasmáticas maduras. La progresión desde linfocito B activado está acompañada por una pérdida gradual de las inmunoglobulinas de superficie; sin embargo, y en contraste con los linfocitos B, las células plasmáticas maduras tienen un aparato secretor bien desarrollado y pueden producir y secretar miles de inmunoglobulinas por segundo⁽¹²⁷⁾.

⁷ Ia es el nombre que recibe la molécula de origen murino, su equivalente en humanos es conocida como HLA-DR⁽¹²⁸⁾.

LINFOCITOS T .

Los linfocitos T tienen su origen en la médula ósea, a partir de una célula madre pluripotente que se diferencia y adquiere compromiso con el linaje linfocitario tipo T. Las células tallo comprometidas migran hacia el timo, donde ocurren procesos de diferenciación y proliferación tendientes a obtener las características celulares propias del linfocito T. La linfopoyesis, en esta etapa, es independiente de la estimulación antigénica. Se cree que una hormona, la timosina, sintetizada y secretada por las células epiteliales del timo, tiene influencia sobre la maduración de los linfocitos T. La muerte intratímica de las células T potenciales es elevada (de cerca del 95% del total de células provenientes de la médula ósea), en consecuencia, solo una pequeña porción sale del timo convertida en linfocitos T inmaduros ¹⁹⁸⁰.

Antiguamente se manejaba la idea de que las células T representaban una población uniforme, capaz de realizar una variedad de funciones inmunológicas, incluidas la activación y la supresión de la respuesta inmune. De acuerdo con esto, serían las condiciones externas y el tipo de estimulación antigénica los determinantes de la función que el linfocito T expresaría. Sin embargo, constantes investigaciones han dado por resultado la salida a la luz de una noción innovadora, que muestra al grupo de células T como un conjunto de subpoblaciones especializadas, cada una equipada para la realización de una función particular ^{1981,1982}.

La técnica más efectiva para la identificación y separación de subpoblaciones de células T, se basa en la propiedad de adquisición selectiva de glicoproteínas de superficie en la etapa de diferenciación dependiente del timo ^{1981,1982}. Estos antígenos de superficie tienen su expresión genética exclusivamente durante la diferenciación intratímica de las células T, y reciben la denominación de antígenos Ly y Tl en el ratón (algunos tienen moléculas equivalentes en el humano) ¹⁹⁸².

El conocimiento sobre los marcadores membranales en linfocitos T es bastante reciente ¹⁹⁸⁰, sin embargo, se han logrado conocer los sitios génicos específicos que dan lugar a su expresión, así se sabe que la glicoproteína o antígeno Ly 1 es codificada por un gene en el cromosoma 19, y los antígenos Ly 2 y Ly 3 son codificados por genes en el cromosoma 6. El segundo tipo de antígeno tímico-específico, el Tl, es solamente expresado sobre timocitos y no sobre células T periféricas ¹⁹⁸².

Gracias a los conocimientos antes expuestos, se ha podido determinar que, dependiendo del tipo de antígeno que expresen, existen tres subpoblaciones de células T: Ly-1,2,3, Ly-1 y Ly-2,3. Y que representan el 50, 30 y 10%, respectivamente, del total de linfocitos T periféricos¹³⁴³. La expresión selectiva de productos génicos sobre la superficie celular no es un hecho aislado, sino que confiere una instrucción genética determinada para cada población. Así, las células del grupo Ly-1 están programadas genéticamente para inducir o ayudar a otros tipos celulares a dividirse y/o diferenciarse, y dada su función son conocidas como linfocito T helper o cooperadores (Th); entre otras funciones, inducen a las células B a secretar anticuerpos, estimulan a los macrófagos, células cebadas y precursores de células T asesinas a participar en la respuesta inmune mediada por células^{134,75,25,72}.

Las otras clases de células, que expresan los marcadores Ly-2 y Ly-3 (Ly-2,3), están relacionadas con dos funciones, la citotoxicidad, dando lugar a las células T citotóxicas (Tc), y la supresión o regulación, originando a las células T supresoras (Ts)¹³⁴³.

Durante su estancia en el timo, los linfocitos T atraviesan por un importante proceso de autorreconocimiento de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Algunas de las células contenidas en el timo expresan en abundancia dichos antígenos, provyendo a los linfocitos T, en proceso de maduración, de un microambiente que les permite el reconocimiento de los antígenos del CMH propio, permitiéndoles para el reconocimiento diferencial de lo propio y lo extraño¹³⁴³.

El principio de que el programa genético de cada tipo celular especializado combina información para la expresión de marcadores específicos de superficie con una función fisiológica particular, puede ser ampliado gracias a la concordancia existente entre el fenotipo Ly de la célula T y su función y afinidad específica por los productos del CMH^{1343,138,145,100}. Los clones que expresan el antígeno Ly-1 (Linfocitos Th) son específicos para reconocer los productos de la clase II del CMH, mientras que los clones que expresan antígenos Ly-2,3 (linfocitos Tc y Ts), reconocen productos de la clase I del CMH^{1343,147,100}.

Las células T abandonan el timo junto con la sangre y se instalan en las regiones de ganglios linfáticos, bazo, hígado y médula ósea que guardan cierta dependencia respecto al propio timo. Después de haber abandonado el timo hacia las formaciones linfoides periféricas, las células T circulan continuamente entre ganglios linfáticos y otros tejidos linfáticos periféricos, bien sea por el conducto torácico que

Desemboca en la circulación venosa, bien sea directamente por la circulación venosa a partir de órganos como el bazo. En la sangre arterial, las células T se distribuyen no sólo en las formaciones linfoides periféricas, sino también en los tejidos de órganos no linfoides, cuando salen a través de las paredes endoteliales de los capilares. Al parecer, estas células T no regresan al timo. Este esquema de circulación de los linfocitos aumenta considerablemente la probabilidad de contacto entre las células T y antígenos extraños¹⁰⁹.

De 70 a 80% de los linfocitos de sangre periférica, y 90% o más de los linfocitos del conducto torácico, presentan características de células T¹¹⁰. Estas células T constituyen también la variante celular que predomina en el área paracortical de los ganglios linfáticos, en las vainas linfáticas periarteriales del bazo, y en otras regiones dependientes del timo en las formaciones linfáticas periféricas. La mayor parte de células T circulantes son linfocitos de vida larga o de senescencia. En promedio, esta vida larga (período intermitosis) dura cerca de 4.4 años¹¹¹, y algunas células pueden vivir hasta más de 20 años¹¹². En comparación, los linfocitos de vida corta, no suelen durar más de 3 días¹¹³.

Una de las propiedades más importantes que los linfocitos T adquieren con su maduración, es la capacidad de sintetizar y secretar un tipo específico de proteína, la interleucina-2 (IL-2), que es una linfocina. Las linfocinas son proteínas producidas por células linfoides y se definen como factores polipeptídicos, diferentes de las inmunoglobulinas, que son secretados por linfocitos activados y que tienen gran número de efectos fisiopatológicos sobre reacciones mediadas inmunológicamente¹¹⁴.

El descubrimiento de las linfocinas se realizó en 1962, cuando H. George y W. Vaughan observaron que algunos antígenos inhibían la migración de células mononucleadas provenientes de animales inmunizados, subsiguientemente se presentó a los macrófagos como células inhibitorias y este efecto requiere la presencia tanto de linfocitos como de antígenos sensibilizados¹¹⁵.

Posteriormente, T. Morgan en 1976, obtiene y caracteriza linfocinas mitogénicas de células T derivadas de macrófagos a partir de medios condicionados de cultivos de células mononucleadas de sangre periférica, este descubrimiento permitió establecer cultivos a largo plazo así como la extracción clonal y funcional de células T. Tiempo después se logró la caracterización de los factores mitogénicos observados por T. Morgan y hoy en día son conocidos como interleucina 1 (IL-1) e IL-2^{116,117}.

El conocimiento de que la IL-2 es secretada por los linfocitos T activados surgió a partir de numerosos trabajos en los que se muestra al sobrenadante de linfocitos T estimulados por antígenos y lectinas (fitohemaglutinina, concanavalina A, etc.) como fuente original de esta lincocina^(133,144,17).

La IL-2 tiene un peso molecular de 13-16 K en humanos y de 30-35 K en ratones. Las funciones que desempeña son muchas, algunas de las más importantes son su colaboración en las respuestas inmunes de las células T y B^(134,144); promueve y mantiene la proliferación de células T_H y T_C⁽⁷⁸⁾; estimula las respuestas Ig a antígenos y mitógenos dependientes de células T⁽¹⁰²⁾; estimula el crecimiento de timocitos y linfocitos de sangre periférica^(127,128); juega un papel importante en la activación de las células asesinas naturales^(79,100).

Por otro lado, se sabe que los mediadores biológicos, como la IL-1, aumentan la producción de IL-2, realizando un trabajo conjunto en el montaje de la respuesta inmune.

III. Cooperación Celular y Desarrollo de la Respuesta Inmune.

Los vertebrados reaccionamos ante antígenos extraños con una cascada de asociaciones celulares y moleculares que desencadenan las respuestas inmunes humoral y celular (Figura B). El requerimiento de la colaboración célula-célula en la generación de la respuesta inmune ha sido bien establecida^(107,146,55).

La respuesta inmune inicia, generalmente, con el reconocimiento del antígeno por los macrófagos, seguido por la fagocitosis y degradación del antígeno. En este proceso, ciertos determinantes inmunológicos críticos del antígeno son preservados y presentados ante los linfocitos T_H⁽¹³⁸⁾. Estos proliferan y se diferencian a su forma de célula efectora^(80,100,144,17,103). Estos linfocitos T_H activados inciden sobre poblaciones celulares diferentes ayudando al montaje, tanto de la respuesta inmune humoral como de la celular.

Las células T_H efectoras actúan sobre los linfocitos B maduros induciéndolos a proliferar y diferenciarse a células plasmáticas. En seguida, estas células sintetizan y secretan anticuerpos específicos contra el antígeno que provocó el ataque, desarrollándose así la respuesta inmune humoral. Estudios recientes han revelado que los linfocitos B activados pueden ayudar deliberadamente al ataque de las

células Tc contra virus, en ensayos *in vitro*⁽¹⁵⁴⁾.

Los linfocitos T_H activados tienen efecto sobre las poblaciones macrofágicas, ya que enlazan el antígeno y las moléculas de la clase II del CMH sobre la superficie de estos activándolos, e induciéndolos a elaborar una proteína (linfocina), la IL-1. El enlace del antígeno más el efecto de la IL-1, estimulan una secuencia de eventos bioquímicos y morfológicos en el linfocito T_H que resultan en la proliferación y diferenciación de estos a linfocitos T específicamente sensibilizados o activados, con la capacidad de producir otra linfocina, la IL-2, entre otras, que afectan tanto a macrófagos como a linfocitos ^(155,156,157,158,159). La presencia de la IL-2 en el medio circundante incide a su vez sobre una población de linfocitos T que producirán un factor inductor de receptores (FIR), el cual induce la aparición de receptores de superficie para esta linfocina. Una vez captada la IL-2 se inicia el proceso replicativo de los linfocitos T citotóxicos. La concentración de IL-2 es, finalmente, la responsable de la regulación de la respuesta inmune, siendo el factor modulador y quien da pauta para la finalización, mediada por los linfocitos T supresores, de los eventos que configuran el ataque inmune celular^(160,161).

Por otra parte, las células T en replicación son capaces de secretar un factor conocido como interferón- γ (IFN- γ), que promueve la expresión de antígenos Ia y aumenta la capacidad funcional de células accesorias que presentan antígenos⁽¹⁶²⁾.

Como hemos podido observar, los mecanismos de la inmunidad son sumamente complejos, y requieren de la interacción de un gran número de células y factores moleculares. Así pues, la protección del organismo contra agentes extraños resulta ser un proceso titánico y frágil a la vez, que en ocasiones puede verse afectado por mecanismos aun no entendidos con claridad. Uno de ellos es la transformación maligna, donde las células sufren cambios en sus características originales que las hacen aparecer ahora como "extrañas" y que, a pesar de ello, no son eliminadas por el sistema inmune. Todo esto ha llevado al desarrollo de la Inmunología Tumoral, rama tendiente a lograr el entendimiento de las complejas interrelaciones huésped-tumor, la expresión antigénica, así como los diferentes mecanismos para generar una mayor y más eficaz respuesta contra los tumores.

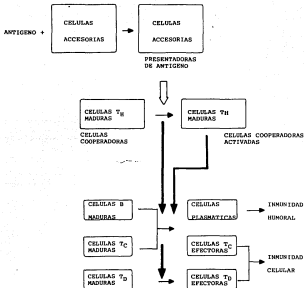


Figura 8. ESQUEMATIZACION DE LA CASCADA DE LA RESPUESTA INMUNE. Los linfocitos T se cree están involucrados en la respuesta contra células tumorales, en estadios muy tempranos (linfocitos T_C) y como una respuesta "retardada" (linfocitos T_D) (tomado de :Hood, 1984)

IV. INMUNOLOGIA TUMORAL.

El concepto de vigilancia inmunológica contra células cancerígenas fue propuesto al inicio de la segunda mitad de este siglo⁽¹²⁰⁾, más tarde nuevas observaciones llevaron a la conceptualización hipotética de que el sistema inmune reconoce antígenos asociados al tumor y destruye aquellas células que los expresan. El rango de células efectoras propuestas para esta actividad no incluye solamente a los linfocitos T y B, sino que también a los adyutores de la "inmunidad natural" como los macrófagos y las células asesinas naturales (NK)⁽¹²¹⁾.

Las especulaciones anteriores se basan en algunas de las características que las células adquieren o pierden durante el proceso de transformación maligna. Este proceso puede ir acompañado por cambios fenotípicos en las células que incluyen la pérdida de componentes antigénicos normales de superficie, la formación de neoantígenos (antígenos no detectables en los tejidos normales correspondientes) y otros cambios membranales que influyen sobre las interacciones célula-célula en los organismos. De ser real la presencia de neoantígenos en las superficies de las células transformadas, estos debían ser capaces de desencadenar la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, existe la posibilidad de que algunas células no sufran cambios fenotípicos membranales, en tal caso, cabría esperar que el organismo respondiera mediante el montaje de una respuesta inmune no adaptativa⁽¹²²⁾.

Si la célula neoplásica por el contrario, exhibe un fenotipo membranar transformado la respuesta inmune debe desarrollarse, y se ha observado que puede ser efectiva o inefectiva, lo cual nos habla de que se presenta un "escape inmunológico" por parte de las células malignas, el cual les permite continuar con su desenfrenado ritmo de multiplicación.

Existen varias posibilidades de explicación para el escape inmunológico de las células cancerígenas. Una de ellas es que el sistema inmune falla en el reconocimiento de los nuevos antígenos. Otra plantea que otros antígenos de superficie, tales como los productos del ICNH) sufren un cambio y no es posible el reconocimiento por asociación de las células neoplásicas, a pesar de que exhibieran esos nuevos antígenos⁽¹²³⁾. Se habla también de que los tumores producen y secretan al medio circundante productos solubles capaces de generar un efecto depresivo sobre varios aspectos

de la inmunidad mediada por células¹¹⁰⁰. Esta depresión podría actuar a través de la inducción de células supresoras, incluidos los linfocitos T supresores (Ts)¹¹⁰¹, mismos que serían capaces de mediar la inhibición de la producción de interleucinas¹⁰⁹¹. De igual forma se ha propuesto que los factores producidos por los tumores podrían provocar un decremento en la respuesta proliferativa de los linfocitos mediada por antígenos o por mitógenos naturales, como la IL-2, ya sea porque las células linfocíticas presenten algún daño que les impida responder ante el estímulo de la IL-2, o bien porque exista algún factor que inhiba su proliferación mediada por tal molécula¹¹⁰².

Aún cuando, por alguno de los procesos arriba descritos, las células tumorales puedan escapar de la vigilancia inmunológica, se ha probado que su presencia no pasa desapercibida para todas las células inunocompetentes, ya que se ha observado que linfocitos T son capaces de infiltrar las masas tumorales^{104,74,104}, el mecanismo que les permite hacerlo no es conocido con certeza sin embargo, se ha encontrado que la acumulación de células infiltrantes tiene relación con la producción de factores quimiotácticos en sitios de reacciones de hipersensibilidad¹⁰⁷ y donde ocurre la replicación de virus, sitios estos donde además se encuentran acúmulos de células asesinas naturales (NK)¹¹⁰³.

Por otra parte se ha observado que los linfocitos de sangre periférica (LSP) cultivados *in vitro* pueden generar linfocitos citotóxicos específicos contra células de tumores autólogos cuando estos son co-cultivados en presencia de IL-2^{107,111,110}, esto prueba que el sistema inmune es potencialmente capaz de atacar células tumorales y eliminarlas. Estudios realizados muestran que en el caso de los LSP la citotoxicidad no está restringida por el CMH, y las células citotóxicas precursoras son derivadas principalmente de células que expresan el fenotipo de asesinas naturales^{111,110} y son conocidas con el nombre de LAK⁸ (asesinas activadas por linfocinas) en este caso por IL-2. En contraste la citotoxicidad expresada por los linfocitos derivados de aquellos infiltrados en el tumor (TIL)⁹ está restringida por el CMH y cada célula posee características de célula T^{104,141}.

La aplicación de conocimientos como los antes descritos ha permitido el desarrollo de nuevas prácticas terapéuticas con miras a la cura de enfermedades neoplásicas. La base

⁸ LAK del Inglés Lymphokine Activated Killer.

⁹ TIL del Inglés Tumor Infiltrating Lymphocytes.

fundamental de las nuevas terapias se encuentra en la potencialidad ya mencionada que el sistema inmune posee para destruir tumores. La llamada Inmunoterapia Celular Adoptiva pretende la multiplicación y activación de LSP o bien de TIL en cultivos in vitro, en presencia de IL-2 y de las células del tumor autólogo para la generación de clones de células citotóxicas específicas que, posteriormente, serán inoculadas en el paciente para desencadenar un ataque sitamente específico y lograr la eliminación de las masas tumorales. Se ha comprobado que la aplicación de esta técnica produce la regresión de metastasis establecidas en modelos tumorales de algunas especies murinas.

La aplicación de la inmunoterapia adoptiva en humanos ha sido menos afortunada que en los modelos de laboratorio, ya que su aplicación clínica han tenido un porcentaje muy bajo de éxito, a la vez que se han observado una serie de efectos tóxicos producidos por la administración de IL-2 a los pacientes. Todo lo anterior nos lleva a pensar en la necesidad de establecer protocolos de investigación tendientes al esclarecimiento de los puntos oscuros que no permiten aun la aplicación correcta de la inmunoterapia, como son, la secreción de factores inhibidores de la función de células inmunitarias, producción de interleucinas, así como la generación de respuestas citotóxicas.

V. CANCER CERVICÓ UTERINO

El cáncer cérvico uterino (CaCu) se ha convertido en un grave problema de salud pública en nuestro país, pero dada la posibilidad de cura ante una detección temprana se ha dado un despliegue de campañas preventivas por parte de los sectores gubernamentales y privados ocupados de la salud que ha intentado, en las últimas décadas, proporcionar mayor información a un conjunto cada vez más amplio de la población con potencialidad de sufrir esta enfermedad.

Sin embargo, a pesar del esfuerzo realizado por los profesionistas e instituciones involucradas en este problema se sabe que existe un alto porcentaje de muertes provocadas por tal enfermedad^(189,20,200). Esta situación hace necesario el desarrollo de programas de investigación tendientes a encontrar una terapia efectiva para el control y erradicación de la enfermedad en estadios avanzados. Los conocimientos que se tienen al respecto del carcinoma de cérvix son amplios, más no completos. No se ha determinado con exactitud su etiología, sin embargo algunos estudios epidemiológicos sugieren que este tipo de cáncer está relacionado con agentes transmitidos sexualmente^(189,20,200).

Existen, por otra parte, evidencias de que un subgrupo de papovavirus, conocidos como papilloma virus humano (HPV) y algunos oncogenes celulares (incluidos el c-myc y el c-ras) pueden contribuir a la génesis de tumores humanos, y en especial de los tumores de cérvix^(191,20). El estudio molecular del CaCu ha permitido establecer que existe una fuerte relación entre esta enfermedad y algunos tipos de HPV, los cuales de manera general son capaces de infectar un tipo celular humano específico, el epitelio escamoso, donde se sospecha puedan estar relacionados con la formación de tumores, tanto benignos como malignos^(191,20,204).

Existe una amplia clasificación de los tipos de HPV que han sido estudiados, sin embargo se sospecha que son algunas clases especiales las que intervienen en la generación de tumores cervicales. Algunos de ellos han encontrado asociados tanto con neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) como con el CaCu^(189,41,140). En particular el HPV tipo 16 es el de mayor prevalencia en este padecimiento y su DNA genómico ha demostrado tener la habilidad de transformar e inmortalizar *in vitro* células humanas epiteliales normales^(192,155,120) (Cuadro 1).

LESIONES GINECOLOGICAS ASOCIADAS CON HPV
(Papilloma virus humano)

TIPO	LESION
6a-f	Condiloma acuminado NIC I, II, III NIV I, II, III
11a, b	Condiloma acuminado NIC I, II, III
16	Condiloma acuminado NIC I, II, III NIV I, II, III
18	Papulosis Bowenoides Carcinoma de Cérvix
31	Carcinoma de Cérvix NIC
33	Papulosis Bowenoides NIC
34	Carcinoma de Cérvix Papulosis Bowenoides
35	Carcinoma de Cérvix NIC

HPV del inglés Human Papilloma Virus.
NIC Neoplasia Intraepitelial Cervical.
NIV Neoplasia Intraepitelial Vaginal.

Las lesiones descritas en esta tabla fueron estudiadas a partir de sus células constitutivas, las cuales fueron aisladas de la biopsia correspondiente a cada una.

La posible relación entre el CaCu y los HPV mencionados convierten a esta clase de neoplasia en un candidato atractivo para la aplicación de la inmunoterapia adoptiva, ya que es probable que las células transformadas que tienen integrado el genoma viral exhiban en su membrana superficial antígenos virales (fuertes), lo que facilita su reconocimiento y eliminación por parte de las células linfocíticas citotóxicas específicas generadas *in vitro*.

Desde el punto de vista clínico y citológico el CaCu se inicia en las capas intraepiteliales del cérvix, estado conocido como preinvasor, que se diagnostica comúnmente en mujeres de 30 a 40 años de edad, siendo sobresaliente que que la mayoría de las pacientes con diagnóstico de carcinoma avanzado tienen de 40 a 50 años. En el grueso de los casos con carcinoma se requieren de 5 a 10 años para penetrar la membrana basal e invadir tejidos. Después de la invasión habitualmente ocurre la muerte en 3 a 5 años, en pacientes sin tratamiento o que no han respondido a éste⁽¹⁰⁷⁾.

En general, los tumores malignos del cérvix tienen un desarrollo gradual, sus precursores preinvasivos pueden existir en una fase reversible y de superficie, o en un estado *in situ* por varios años, durante los cuales puede ser completamente asintomático. El término usado para definir las anomalías tempranas de las células epiteliales cervicales es NIC y puede dividirse en tres grados:

- NIC I. En los dos tercios superiores del epitelio se presentan algunas anomalías en los núcleos celulares, mientras que en la capa baja se observan irregularidades en la maduración normal de las células (pérdida de la polaridad de las células). Las figuras mitóticas son normales.
- NIC II. La parte baja de la capa epitelial muestra también las anomalías del NIC I.
- NIC III. Se observan lesiones cubriendo todo el espesor de la capa, llenándola de células no estratificadas e indiferenciadas. Se presenta pleomorfismo nuclear y figuras mitóticas anormales⁽¹¹²⁾.

El paso de un NIC a un carcinoma invasor, puede llevar de 8 hasta 20 años. Algunas pacientes sufren esta transición en poco tiempo, sin embargo en algunos casos no es necesario el desarrollo total de un NIC para llegar a un carcinoma invasor, puede ocurrir que de un NIC temprano se pase a un invasor directamente⁽¹¹³⁾.

La clasificación de las siguientes etapas del CaCu fue desarrollada en 1973 y comprende dos divisiones base, el carcinoma preinvasor y el carcinoma invasor, cada una con sus subdivisiones (Tabla 2).

CUADRO 2

CARCINOMA PREINVASOR.

ETAPA 0 Carcinoma in situ, carcinoma intraepitelial,

CARCINOMA INVASOR.

ETAPA I	Carcinoma estrictamente limitado al cuello uterino.
Ia	Carcinoma microinvasor (invasión estrófica temprana).
Ib	Lesiones de mayores dimensiones que la etapa anterior.
ETAPA II	El carcinoma se extiende mas alla del cérvix pero sin llegar a la pared pélvica. El carcinoma afecta a la vagina pero no al tercio inferior.
IIa	No hay afección parametrial evidente. Hay invasión de la vagina pero no del tercio inferior.
IIb	Afección parametrial manifiesta.
ETAPA III	El carcinoma se ha extendido hacia la pared pélvica. El tumor afecta al tercio inferior de la vagina. Todos los casos con hidronefrosis o riñón no funcional.
IIIa	Involucra el tercio inferior de la vagina, no llega hasta la pared pélvica aunque puede tomar un parametrio.
IIIb	Involucra uno o ambos parametrios, se extiende hacia la pared pélvica. Ocurre obstrucción de ambos uréteres.
ETAPA IV	Carcinoma que se extiende mas alla de la pelvis, o bien invade la mucosa del recto y de la vejiga.
IVa	Diseminación del tumor a órganos adyacentes.
IVb	Diseminación del tumor a órganos distantes.

Clasificación de los etapas evolutivas del CoCu desarrollada y aceptada en 1978. Tomada de: Krupp, M. A. 1982

La etapa terminal del cáncer se caracteriza por la invasión a otros órganos y el consecuente bloqueo de su función. Dentro de los distintos tipos de cáncer se sabe que los carcinomas (tales como el cérvico uterino) están más capacitados para diseminarse inicialmente, por invasión a los nódulos linfáticos, los cuales se cree constituyen una barrera inmunológica, y posiblemente mecánica, para la diseminación del tumor. Cuando el proceso invasivo se presenta se observa una reacción hiperplásica por parte de los nódulos linfáticos adyacentes, lo cual sugiere una respuesta del enfermo contra las células tumorales o contra sus productos⁽¹⁸⁾. Pero, a pesar de ello, la invasión se concreta dando por resultado el establecimiento de una metástasis.

Los esfuerzos por encontrar una manera de dar alivio al síndrome de sufrimientos que acarrea consigo el cáncer han sido muchos, y a partir de la década de los 70's los estudios relacionados con la respuesta inmune y con el rechazo tumoral se han centrado en el desarrollo y establecimiento de una técnica que permita activar, hacer responder y proliferar de forma específica a los linfocitos citotóxicos del paciente en contra de su propio tumor. El proceso de proliferación y activación de los linfocitos se realiza *in vitro* en presencia de interleucina-2, ya que se supone que uno de los caminos por medio del cual las neoplasias evaden al sistema inmune es por una posible falla en el mecanismo de proliferación leucocítica, o bien por la existencia de algún factor inhibidor producido por el mismo tumor. En consecuencia, el objetivo primordial de la Inmunología Tumoral Adoptiva es la producción *in vitro* de células citotóxicas específicas en un número suficientemente grande, para que al ser inoculadas *in vivo* puedan ejercer su actividad citolítica.

Dado lo anterior, y con la finalidad de determinar si los leucocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer cérvico uterino presentaban algún daño que les impidiera proliferar ante el estímulo provocado por la IL-2, y así mismo conocer si las células de este tipo de cáncer secretaban al torrente sanguíneo factores inhibidores de la respuesta proliferativa leucocítica por IL-2, se cultivaron leucocitos de sangre periférica, tanto de pacientes con cáncer cérvico uterino como de donadores sanos en presencia de sueros de pacientes con este tipo de cáncer y de donadores sanos, empleando como mitógeno interleucina-2 humana recombinante (rhIL-2).

Cabe aclarar que se eligió el carcinoma cérvico uterino por que se sospecha que tiene una etiología viral, y por lo tanto pudiera ser manipulado inmunológicamente, a más de ser el de más elevada tasa de mortalidad de la mujer en nuestro país.

METODO

El material biológico utilizado en el presente trabajo, consistió de muestras sanguíneas de donadores normales y de pacientes con Cáncer Cérvico Uterino, estas últimas fueron obtenidas en la clínica de Ginecología y Obstetricia No.4 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el Servicio de Ginecología Oncológica.

Los reactivos empleados, a menos que sea indicado, fueron de grado reactivo. De la misma forma, el material de cristalería fue de marca Pyrex y para su esterilización se utilizó autoclave a 21 libras de presión durante 20 minutos, y posteriormente se introdujo en estufa a 100°C durante 20 minutos para su secado.

OBTENCION DE MUESTRAS SANGUINEAS

Las muestras sanguíneas fueron tomadas en condiciones de esterilidad con una jeringa conteniendo 0.1ml de Heparina (Rickercab/NCB, U.S.A.) a 1000 U.I./ml como anticoagulante. Se extrajeron, en promedio, 20ml de sangre por paciente.

Dichas muestras fueron transportadas dentro de la jeringa en la que se tomaron y ésta, a su vez, colocada en un recipiente aislante conteniendo hielo, para mantener una temperatura baja hasta su recepción en el laboratorio. Nunca se mantuvieron en dicha condición por más de 5 horas.

SEPARACION DEL PLASMA

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 300g durante 15 minutos. El plasma fue separado del paquete celular con una pipeta y colocado en un tubo de vidrio, se le adicionaron 0.1 ml de Clorhidrato de Protamina 1000 (F. Hoffmann. La Roche & Cie. S.A. Suiza), antagonista de la Heparina, que permite la coagulación y la separación del suero libre, mismo que se obtuvo rompiendo el coágulo formado y transfiriendo el líquido restante a un tubo de vidrio.

DESACTIVACION DEL SUERO.

La desactivación de los sueros se llevó a cabo colocándolos en un Baño de María a 57°C durante 30 minutos, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular, que pudieran interferir inhibiendo la proliferación de las células en cultivo.

SEPARACION DE LEUCOCITOS

Al paquete celular, una vez separado del plasma, se le practicó un lavado, adicionando 10ml de Medio de Eagle (E.M. : del inglés Eagle Medium) (Apéndice 1) y centrifugando a 300g por 15 minutos, se desechó el sobrenadante. Se adicionó, entonces, un volumen de E.M. equivalente a la cantidad de sangre contenida en el tubo y se resuspendió suavemente.

Esta mezcla fue vertida en tubos de vidrio que contenían 2ml de la solución de Ficoll-Paque (Apéndice 2). En cada uno de ellos se adicionaron 5ml de dicha mezcla, haciéndola resular muy lentamente por las paredes del tubo. Se centrifugó a 300g durante 30 minutos. La interfase de color blanco, formada por células mononucleadas, fue separada cuidadosamente con una pipeta y trasladada a tubos para centrifuga, a los cuales les habían sido adicionados 2ml de E.M., procurando bañar las paredes para evitar que las células se adhirieran a ellas. Se centrifugó a 375g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 5 ml de RPMI (Apéndice 3).

Las células se contaron en una Cámara o Hemocitómetro de Neubauer (American Optical, U.S.A.) para ser distribuidas en las cajas de cultivo.

Todos los medios nutritivos y soluciones empleadas en la técnica descrita, fueron calentados a 37°C en Baño de María antes de ser usados.

Todas las soluciones utilizadas para el cultivo fueron previamente esterilizadas por medio de filtros de poro de 0.22 micras (Millipore, Type GS, U.S.A.).

SIEMBRA DE LEUCOCITOS

La siembra de las células se realizó en Microcajas de Cultivo de 96 pozos de 0.32 cm² de Área de crecimiento (Costar, Cambridge, U.S.A.) , en los cuales fueron adicionados, según el caso, el número indicado de células suspendidas en RPMI, 10% de suero y 1000 U/ml de Interleucina 2 Humana Recombinante (rIL-2) (Cetus Corporation, U.S.A.)

CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos celulares contenidos en las microcajas, fueron mantenidos en incubadora (Forma Scientific, Division of Mallinckrodt, Inc. U.S.A.) a 37°C, en una atmósfera con 10% de Dioxido de Carbono y un ambiente saturado de humedad.

TECNICA DE CRIOPRESERVACION

Para preservar las células obtenidas de las muestras sanguíneas, que no fueron utilizadas en un ensayo inmediato, se empleó la técnica de criopreservación, que consiste en lo siguiente:

Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en una solución compuesta por suero autólogo o por un suero de donador sano suplementado con 10% de Dimetil Sulfoxido. Inmediatamente después, se repartieron en alícuotas de 1ml (con una cantidad no menor de 1x10⁶ células) en ampollitas de 2ml (Cooke Laboratory Products, U.S.A.).

Estas ampollitas fueron colocadas rápidamente en congelación a -70°C de 24 a 72 horas. Después de este tiempo fueron trasladadas a Nitrógeno líquido, a una temperatura de -190°C aproximadamente.

Para descongelar las células y poder emplearlas en posteriores ensayos se procedió de la siguiente manera: se sacó la ampollita del Nitrógeno líquido y se colocó en un Baño de María a 37°C hasta que la muestra quedó completamente líquida. A continuación la ampollita se centrifugó a 500g durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en RPMI para su distribución en las microcajas de cultivo.

CONTEOS CELULARES

Tanto el número inicial como el número de células después de 7 días de cultivo, fueron evaluados mediante su conteo directo en Cámaras o Hemocitómetros de Neubauer (American Optical, U.S.A.).

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y un mínimo de dos veces.

EVALUACION DEL INDICE MITOTICO

Con el fin de evaluar el número de células en proceso de división, como una evidencia mas de la proliferación, se prepararon placas de las células el mismo día en que estas fueron sometidas al conteo. Una vez que las células fueron colocadas sobre la placa de vidrio, se las fijó con Alcohol Metílico puro durante 5 segundos, se enjuagaron con agua destilada y se secaron, posteriormente se pusieron en contacto con la solución 1 del Hemocolorante Rápido (Sigma, U.S.A.) por 10 segundos, se lavaron y secaron nuevamente para ser colocadas en la solución 2 del Hemocolorante Rápido (Sigma, U.S.A.) por 10 segundos, finalmente fueron lavadas y secadas para ser observadas al microscopio. Las células en franca mitosis pudieron ser distinguidas perfectamente, a un aumento de 100x, por su característico aumento en el tamaño y deformación del núcleo, que adopta una figura estrellada típica en estados iniciales de la división, o una disposición cromosómica evidente para los estados mas avanzados de la mitosis. Se contaron un total de 500 células, por cada placa, anotando cuantas de ellas se encontraban en división y se aplicó la fórmula para el cálculo del Índice Mitótico (Apéndice 4).

RESULTADOS

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO, EN PRESENCIA DE SUEROS AUTOLOGOS Y DE DONADORES NORMALES E INTERLEUCINA 2 HUMANA RECOMBINANTE.

Es ampliamente conocida la capacidad de los LSP a proliferar ante la inducción producida por la IL-2 en cultivos *in vitro*. Sin embargo, surge la duda acerca de si los LSP de pacientes con cáncer conservan esta potencialidad, o si la han perdido por causa de procesos generados por esta enfermedad neoplásica.

Por otro lado es conocido que en el suero humano existen antígenos específicos de acuerdo con el tipo sanguíneo que el individuo presenta. Además se sabe que estos antígenos son capaces de interactuar con anticuerpos presentes en las membranas de los linfocitos. En consecuencia, cuando se emplean sueros heterólogos como suplemento de medios nutritivos en cultivos *in vitro* de LSP se podría esperar alguna interacción antígeno-anticuerpo que pudiera alterar la respuesta de estas células. Por tal motivo, resulta importante evaluar el efecto que produce la presencia de sueros heterólogos, de diversos tipos sanguíneos, sobre la proliferación de LSP inducida por la interleucina 2 humana recombinante (rhIL-2). Para poder evaluar si en nuestros experimentos el tipo sanguíneo pudo tener algún efecto inhibitorio a la proliferación de los LSP, en el presente ensayo se determinó el tipo sanguíneo de las pacientes y de los donadores sanos de suero. Encontramos que cinco de las pacientes presentaron tipo sanguíneo O con factor Rh positivo (O⁺), una de ellas tipo A⁺ y una más tipo B⁺, mientras que para el caso de los donadores sanos se encontraron cuatro con tipo O⁺, uno con A⁺ y dos con B⁺.

Dado lo anterior, y con la finalidad de determinar la capacidad proliferativa de los leucocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) se cultivaron *in vitro* 2×10^5 LSP de siete diferentes pacientes en presencia de sueros de donadores

sanos (heterólogos) y de rHL-2 1000 U/ml como mitógeno. Para evaluar este efecto de inducción el número de células fue determinado a los siete días de cultivo y comparado con los sembrados en ausencia de este factor.

Los resultados muestran que al suplementar el medio de cultivo con los diversos sueros en presencia de rHL-2, siempre se presentó proliferación de los LSP, independientemente del grupo sanguíneo del donador del cual provenia el suero utilizado (Tabla 1). La evaluación, realizada mediante el conteo del número final (Nf) de células al término del cultivo y la determinación del índice mitótico (IM), revela que los valores mínimos correspondieron a los LSP de la paciente número 2, con un Nf de 3.5×10^7 y un IM de 0.3, mientras que los más elevados a los LSP de la paciente número 4 con Nf de 5.5×10^7 y un IM de 1.3. Los valores de proliferación e IM intermedios resultaron ser muy heterogéneos. Es interesante hacer notar que para estos experimentos un bajo índice de proliferación correspondió, como era de esperarse, un bajo IM.

Es importante resaltar que los tres valores de proliferación más elevados correspondieron a casos en los que los tipos sanguíneos de las pacientes eran O⁺ y diferentes a aquellos de los donadores de suero sano. Sin embargo, se observó también que dos de los valores de proliferación más bajos correspondieron a casos en donde se presentó el mismo tipo sanguíneo (O⁻) entre los del donador de suero y de la paciente. Aunque no hay que perder de vista que los efectos de proliferación aquí descritos pudieran estar relacionados a la capacidad proliferativa de los distintos LSP, nuestros resultados parecen mostrar que no existe inhibición a la proliferación mediada por la rHL-2 relacionada con el tipo sanguíneo de los donadores de LSP y del suero.

Puesto que en todos los ensayos se encontró inducción a la proliferación de los LSP provenientes de las pacientes con CaCu, nuestros resultados parecen indicar que los linfocitos provenientes de estas pacientes no han perdido su capacidad de responder al estímulo mitogénico de la IL-2.

PROLIFERACION DE LSP DE PACIENTES CON CaCu Y DE DONADORES NORMALES, INDUCIDOS POR rHL-2 EN PRESENCIA DE SUEROS DE DIFERENTES PACIENTES CON CaCu Y DE DONADORES NORMALES.

Puesto que hemos encontrado que los linfocitos de pacientes con CaCu no han perdido su capacidad proliferativa, la falta de una respuesta inmune eficaz asociada a estos pacientes (ISB), podría quizá estar relacionada con la presencia a nivel sérico de un factor inhibidor de esta

TABLA I.

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO, EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA 2 HUMANA RECOMBINANTE CON SUEROS DE DONADORES SANOS.

No. DEL PACIENTE CON CaCu DONADOR DE	TIPO SANGUINEO DEL DONADOR DE SUERO		Nf (x10 ³)	IM
	L S P	SANO CON CaCu		
1	O	O	450	0.4
2	O	O	350	0.3
3	O	A	400	0.2
4	B	O	650	1.3
5	B	O	600	0.8
6	A	O	600	1.0
7	O	B	400	0.3

NOTA: El número inicial de células fue de 500 x 10³.

Nf Número final de células a los 7 días

IM Índice Mitótico

proliferación. Estos factores inhibitorios se han encontrado son producidos por las propias células tumorales (111) y por tanto se esperaría encontrarlos en el torrente sanguíneo.

Por tal motivo, y con el propósito de conocer si en el suero de pacientes con CaCu esta presente algún factor inhibitor de la proliferación de los LSP, se realizaron tres diferentes ensayos de inducción a la proliferación de LSP en presencia de sueros de diferentes pacientes con CaCu. En cada ensayo se incluyó un cultivo con suero autólogo y otro con suero de un donador normal como control. Se cultivaron con este fin 2.0×10^4 LSP, tanto de pacientes con CaCu como de donadores sanos y la evaluación de la inducción a la proliferación fue llevada a cabo a los siete días de iniciado el cultivo. Hay que hacer notar que en todos los experimentos se utilizó el mismo tipo sanguíneo del donador de LSP normal y de la paciente con CaCu.

En la primera serie de experimentos se observó proliferación tanto de los LSP del paciente como del donador sano con todos los sueros ensayados (Tabla 2). Al evaluar los Nf correspondientes a los LSP de la paciente se encontró un valor máximo de 8.0×10^2 para los sueros de las pacientes números 12 y 13, aún mayor que el obtenido con el suero autólogo. El valor mínimo de Nf correspondió al suero de la paciente número 11, con un valor de 3.5×10^1 . Nuevamente encontramos que a mayor Nf se obtuvo también un mayor IM.

Por otra parte los LSP del donador sano mostraron una respuesta uniforme, tanto en los Nf como en los valores de I.M, observándose un Nf máximo de 7.5×10^2 con un I.M de 0.9 para la prueba con suero autólogo y un Nf mínimo de 6.0×10^1 con un I.M de 0.7 para el suero heterólogo de la paciente número 11 (Tabla 2).

En la segunda serie de experimentos (Tabla 3), obtuvimos para los LSP de la paciente con CaCu un Nf semejante cuando se utilizó suero autólogo que cuando se empleó el suero del donador sano (7.0×10^2), mientras que los IM aunque los más altos de todo el ensayo fueron significativamente diferentes, 3.6 con suero autólogo y solo 1.3 con el del donador sano. Por otro lado, aunque el mínimo Nf correspondió al suero de la paciente número 8 con 6.0×10^1 en general no hubo diferencias muy grandes entre los diferentes sueros. Cabe hacer mención que en esta serie de experimentos los IM más bajos no correspondieron a los menores Nf.

En forma análoga los LSP del donador sano proliferaron de una manera muy homogénea ante la presencia de los diferentes sueros empleados. Es significativo el hecho de que el máximo Nf observado de 7.5×10^2 con un I.M de 0.8 correspondiera a sueros heterólogos de las pacientes 8 y 9 y

TABLA 2.

EFFECTO DE SUEROS DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO SOBRE LA PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CaCu Y DE DONADORES SANOS, EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA 2 HUMANA RECOMBINANTE.

DONADOR DE SUERO		DONADORES DE LSP (O ⁺)			
SUERO	TIPO SANGUINEO	PACIENTE CaCu		DONADOR SANO	
		Nf (x10 ³)	IM	Nf (x10 ³)	IM
CaCu 1	O ⁺	750	0.9	650	0.7
CaCu 11	O ⁺	550	0.6	600	0.7
CaCu 12	A ⁺	800	1.0	700	0.8
CaCu 13	B ⁺	800	1.3	700	0.7
Sano 1	O ⁺	650	0.8	750	0.9

NOTA: EL número inicial de células fue de 200,000, para todos los casos

Nf Número de células a los 7 días

IM Índice Mítico

TABLA 3.

EFEECTO DE SUEROS DE PACIENTES CON CÁNCER CERVICOLUTERINO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CaCu Y DE DONADORES SANOS, EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA 2 HUMANA RECOMBINANTE.

DONADOR DE SUERO			DONADORES DE LSP (10 ⁴)			
SUERO	TIPO SANGUINEO	PACIENTE CaCu		DONADOR SAND		
		Nf (x10 ³)	IM	Nf (x10 ³)	IM	
CaCu 2	O ⁺	700	3.6	600	0.6	
CaCu 8	O ⁺	600	1.2	750	0.8	
CaCu 9	A ⁺	650	0.8	750	0.8	
CaCu 10	B ⁺	650	0.8	550	0.3	
Sano II	O ⁺	700	1.3	700	0.9	

NOTA: El número inicial de células fue de 200,000, para todos los casos.

Nf: Número de células a los 7 días.

IM: Índice mitótico.

no como era de esperarse al suero autólogo, donde se obtuvo un Nf de 7×10^4 . Cabe también mencionar que en un caso se obtuvo un IM muy bajo, de solo 0.3, y con el menor Nf, de solo 5.5×10^3 . Nuevamente el valor más alto de Nf no correspondió al mayor IM.

En la tercera serie de experimentos (Tabla 4) nuevamente se obtuvo proliferación de todas los LSP empleados. Vale la pena hacer notar que en este caso, al igual que en los anteriores, se tomó la precaución de utilizar los LSP de un donador que tuviese el mismo tipo sanguíneo que los provenientes de la paciente con CaCu. Esta selección de donador tuvo como finalidad la de eliminar la posibilidad de diferencias en los resultados atribuibles a la posible existencia de anticuerpos en los sueros. Nuevamente tanto en el suero autólogo como en el normal los LSP de las pacientes tuvieron valores semejantes de Nf (7×10^4) y de IM 1.0 y 1.3 respectivamente. También en esta serie de experimentos se obtuvo que el suero heterólogo de una paciente dio lugar a valores bajos de Nf e IM (6×10^3 y 0.3 respectivamente).

En forma análoga los LSP del donador sano proliferaron en mayor grado con el suero autólogo con un Nf de 7.5×10^4 y un IM de 1.2 y valores muy bajos para uno de los sueros de las pacientes con CaCu con Nf de 5.5×10^3 e IM de solo 0.2.

Al completar estas tres series de experimentos se pudo observar que en los sueros de las pacientes ensayados no existe un factor que inhiba completamente la proliferación de los LSP, tanto de donadores sanos como de pacientes con CaCu. Sin embargo, la respuesta proliferativa ante cada suero no fué la misma; el aumento en el número celular varió de caso a caso, y este hecho queda reflejado en la actividad mitótica encontrada en cada prueba. Así, la respuesta más favorable se dió, generalmente cuando se utilizó el suero autólogo. Por su parte, la respuesta con los sueros heterólogos aunque por lo general fue claramente inductora a la proliferación, ocasionalmente ocurrió una disminución importante de esta. Podemos asimismo constatar que el tipo sanguíneo de los donadores, tanto de LSP como de suero, no interfirió negativamente en la inducción a la proliferación de los linfocitos, tal y como ya se había encontrado anteriormente.

EFFECTO DE SUEROS DESACTIVADOS Y NO DESACTIVADOS DE PACIENTES CON CaCu Y DE DONADORES SANOS, SOBRE LA PROLIFERACION DE LSP, EN PRESENCIA DE PH/L-2, DE PACIENTES CON CaCu Y DE DONADORES SANOS.

De acuerdo con lo observado hasta este punto, tal parece que no existe algún factor en el suero de las pacientes con

TABLA 4.

EFFECTO DE SUEROS DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO SOBRE LA PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO Y DE DONADORES SANOS, EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA 2 HUMANA RECOMBINANTE.

DONADOR DE SUERO			DONADORES DE LSP (AB+) DE PACIENTE CaCu			
SUERO	TIPO SANGUINEO	PACIENTE CaCu		DONADOR SANO		
		Nf ($\times 10^6$)	IM	Nf ($\times 10^6$)	IM	
CaCu 3	AB+	700	1.3	600	1.0	
CaCu 14	O+	600	0.3	550	0.2	
CaCu 15	A+	650	0.7	600	0.5	
CaCu 16	B+	600	0.5	650	0.6	
Sano III	AB+	700	1.0	750	1.2	

NOTA: El número inicial de células fue de 200.000, para todos los casos. Nf Número de células a los 7 días
 IM Índice Medio

CaCu que tenga la capacidad de inhibir la proliferación de los LSP tanto de estas pacientes como de donadores normales. Sin embargo, es digno de reflexión el hecho de que para la realización de la técnica de cultivo por nosotros empleada, el suero es sometido a un proceso de desactivación en Baño de María a 56°C durante 30 minutos. Esta desactivación tiene como finalidad la de eliminar proteínas del complemento sanguíneo presentes en el suero las cuales se sabe tienen una interferencia negativa en el cultivo celular sobre todo cuando existen anticuerpos. Cabe pues la duda de si entre las proteínas eliminadas por desnaturalización térmica a 56°C se encontrara algún factor inhibidor de la proliferación de los LSP *in vivo*, y que por tanto no haya sido detectado *in vitro*.

Con la finalidad de conocer si existe en el suero de las pacientes con CaCu algun factor inhibidor de la proliferación de los LSP con la característica de ser termolábil, se llevaron a cabo tres ensayos. En estos ensayos se cultivaron 1.5×10^5 LSP de pacientes con CaCu y de donadores sanos, el medio fue suplementado ya sea con suero de la paciente, con suero del donador sano o con un suero heterólogo sano. Estos sueros se agregaron tanto en su forma natural como después de haber sido sometidos a una desactivación térmica de 56°C durante 30 min. Además, fue colocado un control negativo en el que se eliminó la presencia de suero. Se usó, en todos los casos 1000 U/ml de rhl2 como mitógeno durante 7 días.

Se procuró que en todos los experimentos se contara con un donador del mismo tipo sanguíneo que de aquel de la paciente con CaCu y además, como se experimentó con sueros no desactivados térmicamente, se agregó un suero AB⁺ con la finalidad de eliminar, en caso de resultados diferentes entre el sueros bajo experimentación, la posible inhibición debida a los anticuerpos presentes en los sueros.

Los resultados muestran que se presentó proliferación en todos los ensayos, excepto en aquellos en los que no se adicionó suero al medio de cultivo (Tablas 5, 6 y 7). Además, no encontramos diferencias significativas entre el efecto proliferador inducido por la rhl-2 en los LSP en presencia de suero desactivado y no desactivado. En las tres series de ensayos los valores de Nf e IM resultaron ser muy homogéneos. En consecuencia podemos concluir que el tratamiento térmico que normalmente se le da a los sueros para ser empleados en cultivo de tejidos y eliminar al sistema de complemento, no contribuyó a eliminar a posibles moléculas inhibitoras de la proliferación de LSP inducida por rhl-2.

EFFECTO DE SUEROS DESACTIVADOS Y NO DESACTIVADOS DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO Y DE DONADORES SANOS, SOBRE LA PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO Y DE DONADORES NORMALES EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA-2 HUMANA RECOMBINANTE.

TABLA 5

DONADOR DE SUERO SUERO	PACIENTE		DONADORES DE LSP	
	Nf (x10 ³)	CaCu IM	DONADOR Nf (x10 ³)	SANO IM
CaCu B* No Desact.	300	0.2	300	0.2
CaCu B* Desactivado	250	0.2	250	0.2
Sano B* No Desact.	300	0.4	200	0.1
Sano B* Desactivado	350	0.5	300	0.4
Sano AB* No Desact.	400	0.5	300	0.4
Sano AB* Desactivado	350	0.4	350	0.4
Libre de Suero	50	0.0	100	0.0

TABLA 6

DONADOR DE SUERO SUERO	PACIENTE		DONADORES DE LSP	
	Nf (x10 ³)	CaCu IM	DONADOR Nf (x10 ³)	SANO IM
CaCu O* No Desact.	350	0.4	450	0.4
CaCu O* Desactivado	400	0.8	400	0.9
Sano O* No Desact.	350	0.7	400	0.9
Sano O* Desactivado	400	0.8	350	0.8
Sano AB* No Desact.	350	0.8	450	0.4
Sano AB* Desactivado	300	0.5	350	0.3
Libre de Suero	100	0.0	100	0.0

TABLA 7

DONADOR DE SUERO SUERO	PACIENTE		DONADORES DE LSP	
	Nf (x10 ³)	CaCu IM	DONADOR Nf (x10 ³)	SANO IM
CaCu O* No Desact.	450	0.5	550	0.7
CaCu O* Desactivado	350	0.3	550	0.5
Sano O* No Desact.	400	0.4	600	2.3
Sano O* Desactivado	350	0.3	600	2.0
Sano AB* No Desact.	300	0.1	600	1.5
Sano AB* Desactivado	400	0.4	550	1.0
Libre de Suero	50	0.0	100	0.0

NOTA: El número inicial de células fue de 150,000, para todos los casos

Nf número de células a los 7 días

IM índice mitótico

PROLIFERACION DE LSP DE PACIENTES CON CaCu. ACTIVADOS CON rHL-2 EN PRESENCIA DE DIFERENTES LOTES DE SUEROS FETALES DE CABALLO.

La finalidad de la inmunoterapia adoptiva para el cáncer cervicecervical, es la creación de poblaciones clonales de células efectoras en grandes cantidades y con la característica de ser específicas contra las células malignas. Como primer paso para la obtención de un número suficiente de células efectoras se requiere del empleo de técnicas de cultivo *in vitro*. Por lo general, para obtener una buena proliferación de LSP con estas técnicas se requiere suplementar los medios de cultivo con algún suero sanguíneo. Idealmente es conveniente la utilización de un suero singénico o cuando menos de la misma especie que el de las células en cultivo, sin embargo no siempre es posible disponer de cantidades suficientes de estos y se emplean por tanto sueros comerciales de animales como los ovinos, bovinos y caprinos.

Para los casos de cultivos con células de origen humano, el suero autólogo sería por tanto el más conveniente, sin embargo es obvio que el estado clínico general de los pacientes con CaCu impide la toma de grandes cantidades de muestras sanguíneas para la extracción de suero. Una segunda opción para suplemento de cultivo podría ser el suero humano proveniente de donadores normales, sobre todo de tipo AB⁺. Se prefiere suero tipo AB⁺ para evitar los problemas de anticuerpos existentes en otros tipos sanguíneos y que se sabe reconocen antígenos en leucocitos. Sin embargo, por lo poco abundante de este tipo de sangre en México también su disponibilidad es poca.

Debido a la dificultad de obtener suero humano para la producción de células efectoras en grandes cantidades consideramos que una opción digna de estudiarse es la de determinar la potencialidad de proliferación de las células humanas en medios suplementados con sueros animales. Aunque es conocido que sueros animales pueden ser utilizados para la proliferación de células de origen humano, esta sería la primera ocasión en que se utilizaría para células efectoras y para una posible aplicación terapéutica. Por tal motivo, en este ensayo se evaluó la capacidad proliferativa de LSP de pacientes con CaCu en un medio de cultivo suplementado con un suero no humano de origen fetal. Se cultivaron 2.0×10^6 LSP de cuatro pacientes en presencia de cuatro lotes diferentes de suero fetal de caballo (SFC) (lotes A, B, C y D) y de 1000 U/ml de rHL-2. La proliferación inducida por esta molécula fue evaluada a los siete días de iniciado el cultivo, a través del conteo del número final de células (NF).

Los resultados muestran, como era de esperarse, una

TABLA B

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO, EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA 2 HUMANA RECOMBINANTE CON SUEROS FETALES DE CABALLO.

LSP DE PACIENTE CON CaCu	L O T E D E S U E R O		NF	IM
	F E T A L	D E C A B A L L O		
1	A		600	1.4
2	B		700	1.9
2	A		600	1.1
2	C		400	0.6
3	B		900	1.5
4	E		450	0.4

NOTA: El número inicial de células fue de 300.000, para todos los casos

NF Número de células a los 7 días (x10³)

IM Índice Mítico

SFC-A Suero Fetal de Caballo lote A

SFC-B Suero Fetal de Caballo lote B

SFC-C Suero Fetal de Caballo lote C

SFC-E Suero Fetal de Caballo lote E

inducción a la proliferación celular en presencia de todos los lotes de SFC empleados (Tabla 8). Sin embargo, no todos los SFC presentaron el mismo poder inductor. El lote B indujo la mayor proliferación en los LSP de las pacientes 2 y 3 con Nf de 7.0×10^3 y de 9.0×10^3 e IM de 1.9 y 1.5 respectivamente, mientras que los menores valores observados correspondieron a los lotes C y D, el primero en la paciente 2 con un Nf de 4.0×10^3 y un IM de 0.6, el segundo en la paciente 4 con un Nf de 4.8×10^3 y un IM de 0.4. Aunque el lote A mostró una capacidad inductora a la proliferación muy similar en las dos pacientes en que fue probado con un Nf de 6.0×10^3 e IM de 1.4 y 1.1, con el suero B hubo diferencias significativas.

EFFECTO DE LOS SUEROS DE PACIENTES CON CaCu, EN DIFERENTES ESTADOS DE EVOLUCIÓN, SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LSP DE PACIENTES CON CaCu EN PRESENCIA DE rIL-2.

Como hemos podido observar, la capacidad responsiva de los LSP de pacientes con CaCu ante el estímulo proliferador provocado por la IL-2, se conserva a pesar de que se sospecha que estos han perdido parte de sus propiedades inductoras asociadas a dicha enfermedad. Sin embargo, hemos notado que esta respuesta proliferativa no es completamente homogénea entre los diferentes pacientes, pues en ocasiones es menor a la encontrada con LSP normales y en otras mayor. Se sabe, por otra parte, que existe un deterioro progresivo en el estado de salud general de la paciente a medida que el cáncer avanza. Cabe entonces preguntarse si este cuadro degenerativo incluye a las propiedades proliferativas de los LSP de las pacientes. Si así fuera, esperaríamos disminución progresiva en la respuesta proliferativa de los LSP, ante el efecto mitogénico de la IL-2, al aumentar el estadio de avance en el que su enfermedad se encontrara.

Con el fin de conocer si el estado de evolución del padecimiento afecta la capacidad proliferativa de los linfocitos de la paciente se cultivaron 1.5×10^6 LSP de siete pacientes, en presencia de los sueros autólogos, suero de un donador sano y suero fetal de caballo (SFC), usando como un control negativo un medio sin suero, y en presencia de rIL-2. La selección de pacientes fue hecha de tal manera que quedaron representadas las etapas evolutivas típicas del Cáncer Cervic Uterino (Cuadro 2). La evaluación de la proliferación inducida por la rIL-2 fue evaluada a los siete días de iniciado el cultivo.

Los resultados muestran que la respuesta proliferativa se presentó en todos los casos, excepto lógicamente, en

aquellos ensayos en los que se eliminó el suero (Tabla 9). Los valores de Nf observados fueron los esperados, según lo demostrado en experimentos anteriores, tanto para el suero sano como para el SFC. Esta capacidad proliferativa de los LSP nos muestra, nuevamente, la potencialidad real de uso que este tipo de sueros tiene en cultivos *in vitro* de LSP. En cuanto a la respuesta ante los sueros autólogos, notamos que en dos ocasiones los valores de Nf fueron más bajos que los obtenidos en los cultivos con SFC y suero sano, sin embargo los valores de IM nos muestran que si se presentó proliferación celular, aunque en uno de los casos (paciente IIb) fué muy reducida, esto debido posiblemente a errores de manipulación.

Por otra parte, en ninguno de los ensayos fué posible observar un decremento en la capacidad proliferativa, que fuera directamente proporcional al avance de la neoplasia. Así, los valores de Nf e IM para el suero de estadio IVa (el más avanzado en nuestra prueba) que se espararía fuera el menor, llegaron a ser tanto o más elevados que los correspondientes a sueros de estadios tempranos (Tabla 9). Los valores mínimos se observaron en las células de un paciente estadio IIIb, tanto para el suero autólogo como para el normal y el SFC lo cual puede reflejar más el estado general de los LSP que el del estadio de la enfermedad.

Una vez demostrado que no existe algún daño en la capacidad proliferadora de los LSP en respuesta al estímulo provocado por la rhIL-2 y que, además, esto no tiene relación con el estadio del cáncer, creímos conveniente evaluar si existe en el suero de las pacientes con mayor avance de su enfermedad algún factor inhibidor de esta proliferación. Para ello se cultivaron LSP de un donador sano con rhIL-2 en presencia de siete sueros de pacientes con CaCu, procurando nuevamente que los 4 diferentes estadios de la enfermedad estuvieran representados. Como control positivo se emplearon también el suero autólogo sano y el SFC, y como control negativo un cultivo sin suero. Al igual que en los otros experimentos la evaluación de Nf e IM se efectuó a los 7 días de cultivo.

Nuevamente nuestros resultados indican que en ningún suero se pudo detectar actividad inhibidora de la proliferación de LSP inducida por la rhIL-2 (Tabla 10). En efecto, en este experimento obtuvimos valores muy semejantes de Nf e IM para todos los ensayos. Aunque sabemos que para generalizar nuestros resultados se tiene que ampliar el número de muestras, los resultados aquí expuestos indican que no detectamos factores inhibidores de la proliferación de LSP en sueros de pacientes con CaCu.

TABLA 9

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA 2 HUMANA RECOMBINANTE CON SUEROS DE PACIENTES CON CaCu EN DIFERENTES ESTADOS DE EVOLUCION.

ESTADIO DEL DONADOR LSP	S U E R O							
	AUTOLOGO		SANO		SFC		LIBRE DE SUERO	
	Nf	IM	Nf	IM	Nf	IM	Nf	IM
Ib	450	1.9	400	0.9	400	0.9	73	0
Ib	350	1.0	450	1.5	450	1.3	90	0
IIb	400	1.2	550	2.0	400	1.0	75	0
IIb	250	0.4	500	1.2	500	1.9	60	0
IIIb	200	0.4	450	0.8	350	0.6	70	0
IIIb	400	1.2	500	1.1	400	0.7	30	0
IVa	300	0.9	500	1.0	300	0.5	20	0

NOTA: El número inicial de células fue de 250,000, para todas las cases.

Nf Número de células a los siete días de cultivo $\times 10^3$.

IM Índice Mitótico.

SFC Suero Fetal de Caballo.

TABLA 10

PROLIFERACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE DONADOR SANO, EN PRESENCIA DE INTERLEUCINA 2 HUMANA RECOMBINANTE, CON SUEROS DE PACIENTES CON CARCINOMA CERVICO UTERINO EN DIFERENTES ESTADOS DE EVOLUCION.

SUERO EMPLEADO	NI	Nf	IM
CaCu Ib	150	400	0.9
CaCu Ib	150	450	1.0
CaCu IIb	150	550	2.0
CaCu IIb	150	500	1.2
CaCu IIIb	150	450	0.8
CaCu IIIb	150	500	1.1
CaCu IVa	150	500	1.0
SANO (AUTOLOGO)	150	550	1.4
SFC-E	150	450	0.7
LIBRE DE SUERO	150	145	0.0

NI número inicial de células $\times 10^4$

Nf número de células a los 7 días de cultivo $\times 10^3$

IM Índice Mídico

SFC-E suero fetal de caballo lote E.

DISCUSION DE RESULTADOS

Resulta notable el grado de avance que la Inmunología ha alcanzado en décadas recientes y la sólida vinculación que se ha establecido con diversas ramas de la actividad científica. Gracias a estas relaciones la posibilidad de aplicaciones se ha extendido al campo de la salud, dentro del cual se abren nuevas perspectivas terapéuticas para enfermedades tan terribles como lo es el cáncer. Una de estas aplicaciones es en la Inmunoterapia Adoptiva, cuya factibilidad aplicativa se basa en la potencialidad de ataque de células inunocompetentes contra células malignas, probablemente mediante el reconocimiento de antígenos tumorales que se expresan sobre la membrana superficial de éstas.

Dentro de los diversos tipos de cáncer que se conocen existe uno de gran importancia en nuestro país, ya que es el de mayor incidencia en la población femenina, y causa de gran número de defunciones por año; el Cáncer Cervico Uterino (CaCu). Como este tipo de cáncer ha demostrado ser resistente a las diferentes formas de terapia existentes hoy en día, la aplicación de la inmunoterapia adoptiva representaría para las enfermas que lo padecen una nueva oportunidad de tratamiento. Evidentemente la aplicación de este tipo novedoso de terapia para el CaCu requiere de conocimientos previos acerca del estado y la potencialidad funcional de las células inmunológicas involucradas, a saber, la familia de células linfoides.

Los linfocitos intervienen de manera esencial en la respuesta de defensa del organismo contra cuerpos extraños, contra células dañadas o infectadas y probablemente contra células transformadas. Sin embargo, aunque existiera un reconocimiento de células transformadas por el sistema inmune resulta evidente la incapacidad que este manifiesta para la eliminación de aquellas que forman las masas tumorales *in vivo*.

La razón que explique satisfactoriamente la ineficiencia de este sistema de defensa natural en contra de los tumores malignos, no se ha establecido con seguridad. Se hipotetiza entre muchas otras posibilidades la secreción al torrente sanguíneo por parte de las células transformadas, de un

factor inhibidor de la proliferación de los linfocitos. La potencialidad proliferativa de los linfocitos contenidos en los LSP ante el estímulo con IL-2, ha sido observada en cultivos in vitro desde hace largo tiempo⁽⁷⁾. Sin embargo, tal potencialidad en los LSP de pacientes que sufren una enfermedad del tipo del CaCu se ha puesto en duda, ya que existe la posibilidad de que la serie de procesos involucrados en el desarrollo de la neoplasia, traiga como consecuencia un daño a nivel celular que produzca deficiencias en el reconocimiento de la IL-2, lo que a su vez limita el proceso proliferador de los LSP⁽¹⁰⁰⁾.

Por otra parte, también se considera la existencia de posibles daños a nivel celular que imposibiliten la activación a la proliferación de los linfocitos mediada por la IL-2, y por tanto bloqueen su participación en los eventos tendientes a la eliminación del proceso maligno⁽¹⁰⁰⁾.

En este trabajo se presentan evidencias que invalidan las dos hipótesis anteriormente descritas, ya que en general los resultados muestran que en el suero de las pacientes con CaCu no se detectó algún factor que inhiba la proliferación de linfocitos de sangre periférica mediada por IL-2, y a su vez, que estas células no presentan un daño que les impida responder ante la activación a la proliferación inducida por la molécula mencionada. Sin embargo, hay que tomar en consideración que nuestros resultados provienen de experimentación in vitro y que por necesidad se tienen que corroborar in vivo antes de ser generalizados.

Nuestro argumento para afirmar que no existe daño en la capacidad de los LSP de pacientes con CaCu para ser activados a proliferar en presencia de la IL-2, se basa en el hecho de que al realizar un cultivo de estos en presencia de sueros de donadores sanos, la proliferación inducida por la IL-2 estuvo presente en todos los ensayos, y fue semejante a la obtenida con LSP de donadores normales. No dudamos que el proceso maligno lleve consigo una serie de transformaciones que pudieran afectar a los linfocitos y sus funciones dentro de a cascada de eventos desencadenados por una reacción de inmunidad, sin embargo según nuestros resultados esta afectación no parece estar en la capacidad de responder a la inducción mitogénica de la IL-2.

Es conocida la presencia de anticuerpos específicos del sistema ABO en el suero humano dependiendo del tipo sanguíneo de cada individuo. Aunque estos anticuerpos tienen sus antígenos en los eritrocitos de individuos no compatibles y no los comparten con leucocitos, se han descrito otros que parece si reconocen antígenos en células blancas⁽⁴⁾. Es por esta última razón que los experimentos de producción de células efectoras, para ser empleadas en la inmunoterapia

adoptiva del cáncer, utilizan tanto suero del mismo tipo sanguíneo que el paciente o de tipo AB. Al utilizar este suero carente de anticuerpos A y B se garantiza el no trasplantar, junto con las células, efectoras antígenos que pudieran dañar los eritrocitos del paciente.

Nuestros resultados muestran que en los sueros de diferentes tipos sanguíneos no existen anticuerpos contra antígenos leucocitarios que pudieran interferir en la actividad mitogénica de la IL-2 en linfocitos. Esta observación está basada en que la suplementación del medio de cultivo con sueros heterólogos trajo como consecuencia una visible activación a la proliferación de los LSP de las diferentes pacientes con CaCu semejante a la obtenida con sueros autólogos. En consecuencia los resultados aquí expuestos pueden apoyar el desarrollo de una técnica de producción de células efectoras en presencia de cualquier tipo de suero humano, siempre y cuando se tome la precaución de cambiar a un suero AB o del mismo tipo del paciente antes de que estas células sean inoculadas.

Por otro lado, nuestra afirmación de que en el suero de las pacientes no fue detectado algún factor que inhiba la proliferación de LSP mediada por IL-2, está apoyada en el hecho de que al suplementar los medios de cultivo en los que se sembraron, tanto LSP de pacientes con CaCu como de donadores sanos, se pudo observar proliferación ante la presencia de rhlL-2. El hecho de no encontrar dañado el poder proliferador de las células en cultivo, ante la inducción provocada por la rhlL-2, indica que no había en el medio un factor inhibidor de tal respuesta, y por tanto que probablemente no se encuentra en el suero de las pacientes.

De manera general, las respuestas proliferativas más favorables se encontraron en los medios suplementados con los sueros autólogos. Esta respuesta resulta lógica pues se sabe que las células del organismo están continuamente en contacto con el suero que se encarga no únicamente de proporcionar las condiciones fisiológicas adecuadas, sino también de hacer llegar las señales reguladoras además de acarrear los desechos celulares. En consecuencia era de esperarse que los LSP no exhibieran alguna característica que pudiera provocar una respuesta inhibitoria por la simple presencia de su propio suero.

En nuestro trabajo la proliferación de las células sembradas no fue evaluada únicamente mediante el conteo de estas en función del tiempo de cultivo con la IL-2, sino que se evaluó la cantidad de mitosis observadas durante el mismo periodo. Sin embargo, en contra de lo que se esperaba, no siempre los más altos valores de proliferación correspondieron a los mayores índices mitóticos. Creemos que

este fenómeno puede estar relacionado con el hecho ya mencionado de que las células en cultivo tienen diferentes propiedades de supervivencia dependiendo de la compatibilidad del suero utilizado¹³⁸. Hemos también de considerar que las fases constitutivas de los ciclos celulares no se presentan de manera sincrónica en nuestras condiciones de cultivo in vitro y que no todas las células son activables por la rHL-2¹³⁹. Por tal motivo, no resulta extraño encontrar que en nuestros ensayos no se haya observado un índice mitótico mayor al 4 %.

Ahora bien, tal parece que no se presenta en el suero de las pacientes con CaCu algún factor inhibitorio de la proliferación de LSP, sin embargo, debe ser tomado en cuenta el hecho de que el proceso empleado en este trabajo para la realización de los cultivos in vitro, involucra la desactivación térmica de los sueros (a 56°C por 30 min.), este proceso bien podría provocar la desnaturalización del supuesto factor inhibitorio. La prueba realizada para detectar la factibilidad de la anterior idea, reveló, nuevamente, la inexistencia de tal factor, pues hubo una respuesta proliferativa positiva para cada uno de los diferentes LSP ante los sueros ensayados. Aún así, los valores de proliferación y número de mitosis resultaron muy parecidos en sueros desactivados y no desactivados.

No descartamos la idea de que las células tumorales sean capaces de producir factores inhibitorios de la función inerte de los linfocitos, así mismo, consideramos posible que la secreción a nivel local provea a las masas tumorales de un medio circundante altamente concentrado de estos factores, tales cantidades podrían bloquear la funcionalidad linfocítica, sin embargo creemos posible que las concentraciones a nivel sanguíneo no son las suficientes para lograr semejante inhibición.

Por otra parte, un aspecto más a discutir es la posibilidad de encontrar daños celulares en los LSP de pacientes con un mayor grado de avance en su enfermedad, o bien de presentarse en su suero algún factor inhibitorio de la proliferación de estos en cantidades biológicamente activas. Las anteriores suposiciones están basadas en el hecho de que a medida que avanza el cáncer, se presenta en las pacientes un agotamiento general y una dificultad creciente para la realización de las funciones corporales normales, esto podría hacer pensar que también algunas de las funciones de los LSP se han visto afectadas, por ejemplo la capacidad de proliferación ante el estímulo por IL-2. Además, resulta lógico pensar que si las células malignas secretan un factor inhibitorio de la proliferación de los LSP, un mayor número de ellas producirá una concentración más elevada del supuesto factor, aumentando así su nivel en sangre y adquiriendo la

capacidad de bloquear a los LSP.

Los resultados obtenidos mostraron que la proliferación, mediada por la rhl-2, en los LSP de las pacientes con cáncer en estados más avanzados fue igual o hasta superior, en algunos casos, a la observada para los LSP de pacientes con cáncer en estadios tempranos. Esto nos hace suponer que el cuadro clínico presentado por las pacientes no involucra daños a nivel de la función proliferadora de los LSP. Por otro lado, y en cuanto a la presencia de cantidades biológicamente activas de algún factor inhibidor de la proliferación de LSP, secretado por las células malignas, los resultados obtenidos mostraron que aun en los estadios provados más avanzados ocurrió una respuesta proliferativa positiva ante la presencia de la rhl-2.

Menos discutido acerca de la potencialidad funcional de los LSP de pacientes con CaCu, sabemos ahora que no sufren de algún daño que les impida proliferar, ante el estímulo de la rhl-2. Sabemos, también, que el suero de estas pacientes no contiene, o por lo menos no en cantidades biológicamente activas, algún factor que inhiba tal proliferación. De tal forma, la situación resulta alentadora, pues abre la posibilidad de aplicación futura en inmunoterapia de los LSP de esta clase de pacientes oncológicas.

El primer paso para la aplicación de la inmunoterapia, es la proliferación *in vitro* de células linfocíticas de la paciente con CaCu, para esto debe tomarse una muestra sanguínea, de la cual se obtendrán tanto las células mencionadas como suero. Debemos entonces considerar que el estado general de estas pacientes es deplorable y no es recomendable extraer sangre varias veces (posibilidad contemplada para la obtención de cantidades adecuadas de suero para suplementar los cultivos celulares). Además, es importante mencionar que existe dificultad para la obtención de sueros humanos de donadores sanos, por lo tanto es necesario conocer si es posible la utilización de sueros no humanos en esta fase proliferativa de las células linfocíticas. La prueba realizada con este fin demuestra que los sueros de origen fetal de caballo son adecuados para la suplementación de medios proliferadores de LSP. Sin embargo, basándonos en los datos reportados, nos damos cuenta de que algunos lotes de suero producen mayores niveles de proliferación que otros. Este hecho es debido a la heterogeneidad de elementos que conforman los diferentes lotes de suero. A pesar de esto, una ensayo sencillo de proliferación, en presencia tanto de IL-2 como de los lotes de suero a probar, pueden proveernos de un buen suplemento para los medios de cultivo empleados en la multiplicación de linfocitos, y salvar así la dificultad que representa la obtención de sueros humanos.

No debe pasar desapercibido el hecho de que el suero fetal de caballo debe ser oportunamente substituido por suero autólogo en los cultivos terminales a ser empleados en inmunoterapia. Esto debe hacerse antes de llegar al periodo en que los LSP proliferados y activados específicamente deberán ser transfundidos a la paciente de origen, de no ser así se desencadenarían una serie de reacciones de rechazo hacia los antígenos presentes en el suero extraño, que le acarrearían aún más problemas de salud.

CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que hemos llegado mediante la realización de este trabajo son las siguientes:

- No existe daño a nivel celular en los LSP de pacientes con CaCu, que les impida responder ante el estímulo proliferativo de la rhIL-2 en cultivos in vitro.
- La capacidad proliferativa de los LSP de pacientes con CaCu, ante el estímulo de la rhIL-2, no se ve modificada al avanzar el cáncer.
- No detectamos la presencia de algún factor inhibidor de la proliferación de los LSP, inducida por rhIL-2, en el suero de pacientes con CaCu aun en los estadios más avanzados.
- Es posible la obtención in vitro de poblaciones clonales de LSP de pacientes con CaCu utilizando medios de cultivo suplementados con suero humano autólogo, heterólogo sano o suero fetal de caballo.

BIBLIOGRAFIA

1. Adams, R. (1980). Cell Culture for Biochemists. Scotland, U.K.
2. Asimov, I. (1986). El Rio Viviente. Ed. Lissua. México, D.F. 203 pp.
3. Askonas, B.A. and Williamson, A.R. (1972). Factors effecting the propagation of a B cell clone forming antibody to the 2,4-dinitrophenyl group. *Eur. J. Immunol.* 2:487.
4. Beck, S.W. Hematology. (1987). 4a. The MIT Press. Cambridge, U.S.A. 496 pp.
5. Beebe, S.P. and Ewing, J.A. (1906). A Study of the Biology of Tumour Cells. *Brit. M. J.* 2:1539.
6. Bennett, W.E. and Cohn, I.A. (1966). The isolation and selected properties of blood monocytes. *J. Exp. Med.* 123:143.
7. Bendtsen, K. (1983). Biological properties of interleukins. *Allergy.* 38:219-226.
8. Bentwich, I. and Kunkel, H. (1973). Specific properties of human B and T lymphocytes and alterations in disease. *Transplant Rev.* 16:29.
9. Berendt, H.J. and North, R.J. (1980). T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. And explanation for progressive growth and immunogenic tumor. *J. Exp. Med.* 151:69.
10. Bernard, C. (1878-79). Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux. Paris.
11. Bishop, J.M. (1983). Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.* 52:301.

12. Boakd, J.L., Christie, B.H., Ford, W.L. and Howard, J.G. (1968). Pathways in the development of liver macrophages: alternative precursors contained in populations of lymphocytes and bone marrow cells. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 169:307.
13. Boyse, E.A., Old, L.T. and Stockert, E. (1965). An approach to the mapping of antigens on the cell surface. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 60:886.
14. Boyse, E.A., Miyizawa, M., Prok, T. and Old L.J. (1968). LyA and LyB, two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*. 170:175.
15. Boyse, E.A., Stockert, E. and Old, L.J. (1968). Isoantigens of the H-2 and TLA loci of the mouse. Interactions affecting their representation on thymocytes. *J. Exp. Med.* 128:85.
16. Brodley, E.C., Konrad, M., De Groot, S., Doyle, M., Cetus Corporation, Emerville, C.A. and Lowtz, R. (1986). *In vivo* normalization of NK activity in patients with cancer treated with interleukin-2. *Proc. of AACR*. 27:351.
17. Buckton, K.E., Brown, W.M. and Smith, P.G. (1967). Lymphocyte survival in men treated with x-rays for ankylosing spondylitis. *Nature*. 214:470.
18. Burger, C. J., Elgert, K.D. and Farrar W.L. (1984). Interleukin 2 (IL-2) activity during tumour growth: IL-2 production kinetics, absorption of an responses to exogenous IL-2. *Cell Immunol.* 84:228-239.
19. Burnet, F. M. (1964). Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br. Med. Bull.* 20:134-158.
20. Burnet, F. M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant. Rev.* 7:3-25.
21. Burrows, P.D., Le Jeune, M. and Kearney, J.F. (1979). Asynchrony of immunoglobulin chain synthesis during B cell ontogeny: evidence from cell hybridization that murine pre-B cells synthesize μ heavy chains but no light chain. *Nature*. 280:838.
22. Cantor, H. and Asofsky, R. (1972). Synergy among lymphoid cells mediating the ODH response. III. Evidence for interaction between to classes of thymus-derived cells. *J. Exp. Med.* 135:764.

23. Cantor, H. and Weissman, I. (1973). Development and function of subpopulations of thymocytes and T lymphocytes. *Prog. Allergy*. 20:1.
24. Cantor, H. and Boyse, E.A. (1975). Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly cells in the generation of killer activity. *J. Exp. Med.* 141:1390.
25. Cantor, H., Shen, F.W. and Boyse, E.A. (1976). Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: After immunization, antigen specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T cell subclasses. *J. Exp. Med.* 143:1391.
26. Cantrell, A.D. and Smith, K.A. (1984). The interleukin-2 T cell system. A new growth model. *Science*. 224: 1312-1314.
27. Coradino, R., Lowenthal, J.W., Nabholz, M. and Mac Donald, H.R. (1985). Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker in thymic stem cells. *Nature*. 314:98-100.
28. Cline, H.J. (1970). Monocytes and macrophage: differentiation and function, in T.J. Greenwalt and S.A. Jamieson (eds.) Third Annual Red Cross Symposium on Formation and Destruction of Blood Cells. p.222. Philadelphia.
29. Cohen, S. (1973). Biologic activity of extracts of delayed hypersensitivity skin reaction sites. *Cell. Immunol.* 9:363.
30. Cohn, I.A. and Benson, B. (1965). The differentiation of mononuclear phagocytes. *Morphology, Cytochemistry and Biochemistry*. *J. Exp. Med.* 121:179.
31. Cohn, I.A. and Benson, B. (1965). The *in vitro* differentiation of mononuclear phagocytes. I. The influence of inhibitors and the results of autoradiography. *J. Exp. Med.* 121:279.
32. Cohn, I.A. and Benson, B. (1965). The *in vitro* differentiation of mononuclear phagocytes. II. The influence of serum on granule formation, hydrolase production and pinocytosis. *J. Exp. Med.* 121:835.

33. Conlon, P.J., Ranzhun, C.A., Henny, B.S. and Billis, S. (1982). Cytokine dependent thymocyte responses: II. Generation of cytotoxic T lymphocytes from immature thymocytes. *J. Immunol.* 129:11-17.
34. Cooper, M.D., Karney, J.F., Bathing, W.E. and Lawton, A.P. (1980). Effects of anti-Ig antibodies on the development and differentiation of B cell. In: *Immunological Reviews*, Vol.52, edited by G-Møller, p.29, Munksgaard, Copenhagen.
35. Coccolino, F., Tordia, M., Carosino, A.M. and 7 others. (1987). Characterization of cells from invaded lymph nodes in patients with solid tumours. Lymphokine requirement for tumour-specific lymphoproliferative response. *J. Exp. Med.* 166:303.
36. Cheever, M.A., Greenberg, P.D. and Fefer, A. (1980). Specificity of adoptive chemoinmunotherapy of established syngeneic tumors. *J. Immunol.* 125:711.
37. Chu, E.T. and Seha, R.S. (1985). Antigen presentation by EBV-B cells to resting and activated T cells: role of IL-1. *J. Immunol.* 134:1676.
38. Davis, V. and Dulbecco, R. (1978). *Tratado de Microbiología*. Ed. Salvat. España. 1144-1145.
39. De Vita, V. T. Jr., Hellman, S. and Rosenberg, S. A. (1982). *Cancers: Principles and Practice of Oncology*. J. B. Lippincott Co. U.S.A. p.1926.
40. Diener, E. (1970). Evolutionary aspects of immunity and lymphoid organs in vertebrates. *Transplant. Proc.* 2:309.
41. Di Luca, D. and Cassai, E. (1986). Human papillomavirus type 16 DNA in genital tumours: a pathological and molecular analysis. *J. General Virology.* 67: 583-589.
42. Durst, M., Sissman, L. and Ikenberg, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 3812-3815.
43. Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* 122:501-504.
44. Eberlein, T.J., Rosenstein, M.R. and Rosenberg, S.A. (1982). Regression of a syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin 2 in mice. *J. Exp. Med.* 156:385.

45. Ebert, E.C. and Nagase, H. (1987). Characterization of an immunosuppressive factor derived from human colon cancer cells. *J. Immunol.* 138:2161.
46. Farran, E. and Moon, D. K. (1982). Inhibition of cytokine production by a tumor cell product. *Immunology.* 46:603.
47. Fauci, A.S. and Ballieux, R.E. (1979). Antibody production in man. Academic Press, New York.
48. Fernandez-Cruz, E., Halliburton, B. and Feldman, J.D. (1979). *In vivo* elimination by specific effector cells of an established syngeneic rat Moloney virus-induced sarcoma. *J. Immunol.* 123:1772.
49. Fibach, E., Berassi, E. and Sachs, L. (1978). Induction of colony formation *in vitro* by human lymphocytes. *Nature* 259:127.
50. Finke, J.H., Sharma, S.D. and Scott, J.W. (1981). Generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes: production of T cells and macrophage helper factor in addition to IL-3 and IL-2 by peritoneal cells from mice immunized to *listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 127: 2354-2361.
51. Finke, J.H., Scott, J. W., Sillis, S. and Hilfiker, M.L. (1983). Generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes: evidence for a differentiation factor distinct from IL-2. *J. Immunol.* 130: 763-767.
52. Fischer, A. (1941). Die bedeutung den aminosauren vor die gewebezellen *in vitro*. *Acta Physiol. Scand.* 2:143.
53. Foa, R. and Catovsky, D. (1979). T-lymphocyte colonies in normal blood, bone marrow and lymphoproliferative disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 36:488.
54. Frard, F., Corthesy, P. and Nobhoitz, M. (1984). Characterization of soluble factor that induce the cytolytic activity and the expression of T cell growth factor receptors of a T cell hybrid. *J. Exp. Med.* 160: 584-599.
55. de Freitas, E.C., Chesnut, R.W., Grey, H.M and Chiller, J.M. (1983). Macrophage dependent activation of antigen-specific T cells requires antigen and a soluble monokine. *J. Immunol.* 131:23.
56. Fudenberg, H. (1979). Manual de Inmunología Clínica. El Manual Moderno. México. 1112 pp.

57. Furber-Harris, P.M. (1989). Loss of leukoregulin up-regulation of natural killer but not lymphokine-activated killer lymphocytotoxicity in HPV 18 DNA-immortalized cervical epithelial cells. *J. Nat. Cancer Institute*. 81: 1080-1085.
58. Gariglio, P., Ocadiz, R., and Saucedo, R. (1987). Human papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells*. 5: 343-348.
59. Gorman, R.D. and Fan, D.P. (1983). Characterization of helper factor distinct from IL-2 necessary for the generation of allospecific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 130: 756-761.
60. Gorman, R.D., Taku, A. and Fan D.P. (1984). Chromatographic separation from known cytokines of a helper factor necessary for the generation of murine cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 132: 1879-1887.
61. Gathings, W.E., Mage, R.S., Cooper, M.D. and Young-Cooper, G.W. (1982). A subpopulation of small pre-B cells in rabbit bone marrow expressed delta kappa light chain and exhibits allelic exclusion of b locus allotypes. *Eur. J. Immunol.* 12:76.
62. Gelfand, E.W., Lee, J.W.W., Bosch, H.M. and Price, G.B. (1981). Human T cell colony formation in microcultures: analysis of growth requirements and functional activities. *J. Immunol.* 126:1134.
63. Gershon, R.K. (1974). T-cell control of antibody response. *Contemp. Top. Immunol.* 3:1.
64. Gissman, L. (1984). Papillomavirus and their association with cancer in man. *Cancer Surv.* 3: 161-181.
65. Glasbrock, A.L., Sarmiento, M. and Fitch, F.W. (1988). Murine T lymphocytes clones with distinct immunological functions. *Immunol. Rev.* 54:225.
66. Goeths, J.W. (1989). *Fausto*. 13a. Ed. Porroa, S.A. Mexico, D.F. 190 pp.
67. Grime, E.A., Mazunder, A. and Rosenberg, S.A. (1982). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155:1823.

68. Guillou, T.J., Sedean, P.C. and Ramsden, C.W. (1989). The inhibition of lymphokine-activated killer cell generation by cultured tumour cell lines *in vitro*. *Cancer Immunol. Immunother.* 28:43.
69. zur Hauren, H., de Villiers, E.M. and Gisseann, L. (1981). Papillomavirus infection and human genital cancer. *Gynecol. Oncol.* 12: 124.
70. Hersey, P. and McCarthy, W.H. (1983). Inhibition of interleukin 2 production by factors released from tumor cells. *J. Immunol.* 131:2837.
71. Hood, L.E., Weissman, J.L., Wood, W.B. and Wilson, J.H. (1984). *Immunology*. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., U.S.A. 558 pp.
72. Huber, B., Devinsky, O., Berahan, R.K. and Cantor, H. (1976). Cell-mediated immunity: Delayed type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T cell subclasses. *J. Exp. Med.* 143:15.
73. Huber, B., Cantor, H., Shen, F. and Boyse, E. (1978). Independent differentiative pathways of Ly1 and Ly23 subclasses T cells. Experimental production of mice deprived of selected T cell subclasses. *J. Exp. Med.* 144:1128.
74. Ibayashi, Y. and Kikuchi, K. (1985). Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and non-immune rats. *J. Immunol.* 134:648.
75. Jandinski, J., Cantor, H., Todakuna, T., Peavy, D.L. and Pierce, C.W. (1976). Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: suppressor and helper activities are inherent properties of distinct t cell subclasses. *J. Exp. Med.* 143:1382.
76. Jerne, N.K. (1973). The Immune System. *Sci. Am.* 229:52.
77. Jolly, J. (1906). Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 55:1266.
78. Jourdan, M., Combes, T. and Klein, B. (1985). Control of Human T-colony Formation by Interleukin-2. *Immunology* 54:249-253.

79. Kabelitz, D., Kirchner, H., Armerding, D. and Wagner, H. (1985). Recombinant interleukin-2 rapidly augments human natural killer cell activity. *Cell Immunol.* 93:38-43.
80. Kaje, T. and Janeway, C.A. (1984). Induction of receptors for interleukin-2 requires T cell Ag: Ia receptor crosslinking and interleukin-1. *Lymphokine Res.* 3:175.
81. Kamps, W.A. and Cooper, M.D. (1982). Microenvironmental studies of pre-B and B cell development in human and mouse fetuses. *J. Immunol.* 129:526.
82. Kanagawa, O. (1983). Three different signals are required for the induction of cytolytic T lymphocytes from resting precursors. *J. Immunol.* 131: 606-610.
83. Kessler, I. (1977). Venereal factors in human cervical cancer. Evidence from marital clusters. *Cancer.* 39: 1912.
84. Kikuchi, K. and Ishii, Y. (1976). Cell mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 276:188.
85. Kincaid, P.W. (1981). Formation of B lymphocytes in fetal and adult life. *Adv. Immunol.* 31:177.
86. Kronenberg, M., Siu, B., Hood, L.E. and Shastri, N. (1986). The molecular genetics of the T cell antigen receptor and T cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 4:529-91.
87. Krupp, H.A., Chatton, H.J. (1982). *Diagnóstico Clínico y Tratamiento.* 17a. ed. Ed. El Manual Moderno, S.A. 1324 pp.
88. Kurt-Jones, E.A. (1985). Identification of a membrane-associated IL-1 in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:1204.
89. Lafreniere, R. and Rosenberg, S.A. (1985). Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* 45:3735.
90. Landreth, K.S., Rosse, C. and Clagett, J. (1981). Myelogenous production and maturation of B-lymphocytes in the mouse. *J. Immunol.* 127:2027.
91. Leavell, B.S. and Thorup, D.A. (1978). *Hematología Clínica.* 4a. Interamericana. México. 688 pp.

92. Le Francois, L., Klein, J.R., Paetkau, U. and Bevan, M.J. (1984). Antigen independent activation of memory cytotoxic T-cells by interleukin-2. *The J. Immunol.* 132:1845-1851.
93. Lesley, C., Lora, M., Yashuhiro, U. and Angus, W. (1986). Tumour induced suppression of cell-mediated immunity: selective effects on lymphokine production and lymphocyte transformation and independence of cyclophosphamide-sensitive suppressor cells. In: *Leukocytes and Host Defense*. Alan, R. Liss Inc. pp.465-470.
94. Lewis, M.R. (1925). The formation of macrophages, epitheloid cells and giant cells from leucocytes in incubated blood. *Am. J. Pathol.* 1:91.
95. Lewis, M.R. and Lewis, W.M. (1926). Transformation of mononuclear blood cells in to macrophages, epitheloid cells and giant cells in hanging drop culture of lower vertebrates. *Contrib. Embryol.* 18:95. U.S.A.
96. Liu, Y. and Mullbacher, A. (1986). Activated B cells can deliver help for the *in vitro* generation of antiviral cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:4627-4633.
97. McCance, D.J. and Clarkson, P.K. (1985). Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 92: 1101-1105.
98. McKenzie, S.B. (1988). *Textbook of Haematology*. Lea Febiger. U.S.A. 507 pp.
99. Melnick, J.L. and E. Adam. (1978). Epidemiological approaches to determining whether herpesvirus is the etiological agent of cervical cancer. *Prog. Exp. Tumor Res.* 21: 49.
100. Metcalf, D. and Moore M.A. (1971). *Hematopoietic cells*. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. p.312.
101. Metchnikoff, E. (1905). *Immunity in infective diseases*. Cambridge Univ. Press. Cambridge England.
102. Mischner, S. and von Fladner, V. (1986). Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumours: effects of tumour cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J. Immunol.* 136:1899.

103. Miller, R.A. and Strom, T.B. (1986). Stages of T cell activation: continued antigen dependence of IL-2 producing cells after IL-2 receptor expression. *J. Immunol.* 136: 977-983.
104. Mills, C.D. and North, R.J. (1983). Expression of passively transferred immunity against an established tumor depends on the generation of cytolytic T cells in recipient. Inhibition by suppressor cells. *J. Exp. Med.* 157:1448.
105. Mitchinson, N.A. (1971). The Immune System. *Eur. J. Immunol.* 1:19-27.
106. Mule, J.J., Yang, J. and Rosenberg, S.A. (1986). The antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo: direct correlation between reduction of established metastases and cytolytic activity of lymphokine-activated killer cells. *J. Immunol.* 136:3899.
107. Muul, L.M. and Rosenberg, S.A. (1987). Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J. Immunol.* 138:989.
108. Nabel, G., Fresno, M., Chessman, A. and Cantor, H. (1980). Use of cloned populations of mouse lymphocytes to analyze cellular differentiation. *Cell.* 23:19.
109. Naor, D. (1979). Suppressor cells: permitters and promoters of malignancy? *Adv. Cancer Res.* 29:45-125.
110. Nabuk, R.J. and Wells, R.M. (1987). Accumulation and chemotaxis of natural killer/large granular lymphocytes at sites of virus replication. *J. Immunol.* 138:877.
111. Nelson, D.S., Nelson M., Farras E. and Inoue Y. (1981). Cancer and subversion of host defences. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 59:229-262.
112. Nieuwenhuis, P., van der Brock, A.A. and Hanna, M.G. (Eds.) (1982). *In vivo Immunology: Histophysiology of the lymphoid system.* Plenum Press, New York.
113. Nossal, G.J. (1988). Current Concepts: Immunology. The Basic Components of the Immune System. *The New England J. of Medicine.* 316(21):1320-1325.

114. Nowell, P.C., Koretsky, S.A., Read, J.C. and Hannan-Harris, A.C. (1985). Interleukins and inhibitors in human lymphocyte regulation. Mediators in cell growth and dif. pp:199-212.
115. Oppenheim, J.J. (1985). Antigen non specific lymphokines: An over view. Methods in Enzymology. 116:357-372.
116. Oppenheim, J.J., Rosenthal, L.D. and Potter, M. (1981) Cellular functions in immunity and inflammation. Ed: Edward Arnold. U.S.A. pp: 479.
117. Ortaldo, J.R., Mason, A. and Overton, R.H. (1986). Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors. *J. Exp. Med.* 164:1193.
118. Osmond, D.G. (1980). Production and differentiation of B-lymphocytes in the bone marrow. In: Immunoglobulin Genes and B Cells Differentiation, edited by J.R. Battisto and K.L Knight. Elsevier/North-Holland, New York. p.135.
119. Paul, W.E. (1984). Nomenclature of lymphokines which regulate B-lymphocytes. *Molec. Immunol.* 21:343.
120. Paul, W.E. (1986). Fundamental Immunology. Raven Press. New York, U.S.A. pp:809.
121. Phillips, J.H. and Lanier, L.L. (1986). Dissection of the lymphokine-activated killer cell phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells, and T lymphocytes to cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 164:814.
122. Pink, R. et. al. (1971) Antibody variability. *Ann. Rev. Med.* 22:145.
123. Pirisi, L., Yasunoto, S. and Dipaolo, J.A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virology.* 61: 1061-1066.
124. Porter, R.R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73:119.
125. Raulat, D.H. (1985). Expression and function of interleukin-2 receptors on immature T-lymphocytes. *Nature.* 314:101-103.
126. Recklinghausen, F.D.von. (1866). Ueber die Erzeugung von rothen Blutkörperchen. *Arch. Mikroskop. Anat.* 2:137.

127. Reddehase, M. and Droege, W. (1983). IL-2 is not sufficient as helper component for the activation of cytotoxic T lymphocytes but synergizes with a late helper effect that is provided by irradiated I-region-incompatible stimulators cells. *J. Immunol.* 128: 61-68.
128. Rees, G.H. and Yen, N. (1984). Interleukin-2 Regulates Expression of Its Receptor and Synthesis of Gamma Interferon by Human T Lymphocytes. *Science* 225:429-430.
129. Roberts, K., Lotze, M.T. and Rosenberg, S. A. (1987). Separation and functional studies of the human lymphokine-activated killer cell. *Cancer Res.* 47:4366.
130. Rodriguez, J. (1983). Carcinoma cérvico uterino en el norte de México. Aspectos clínicos. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 21: 183.
131. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. (1986). *Immunology.* The C.V. Mosby Co. St. Louis Toronto, Canada.
132. Roenery, S.L. et.al. (1980). *Gynecology and Obstetrics: The Health Care of Women.* 2a. Mc. Graw-Hill.
133. Rosenberg, S.A. and Lafrenier, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 233:1318.
134. Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M. and 10 others. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316:889.
135. Rotkin, I.D. (1973). A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res.* 33: 1353.
136. Rozenszajn, L.A., Soham, D. and Kalechman, I. (1975). Clonal proliferation of PHA-stimulated human lymphocytes in soft agar culture. *Immunology* 29:1041.
137. Sato, G. H. (1982). *Cell culture and physiology.* Acad. Press. New York, U.S.A. 45-52.
138. Scala, S. and Oppenheim, J.J. (1983). Antigen presentation by human monocytes: evidence for stimulant processing and requirement for interleukin 1. *J. Immunol.* 131:1160.

139. Schreier, M.H., Iscove, N.M. and von Boehmer, H. (1980). Clones of killer and helper T cells: Growth requirements, specificity and retention of function in long term culture. *Immunol. Rev.* 51:315.
140. Schwartz, R.H. (1985). T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 3:237-61.
141. Shirasawa, H., Tomita, Y., Kubota, K. and Saito, B. (1988). Transcriptional differences of the human papillomavirus type 18 genome between precancerous. *J. Virol.* 57:603-613.
142. Smith, H.G., Horvath, R.P., Hanna, M.G. Jr., Zwilling, B.S., Ibar, B. and Rapp, H.J. (1977). Regression of established intradermal tumors and lymph node metastases in guinea pigs after systemic transfer of immune lymphoid cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 58:1315.
143. Smith, K.A., Lachman, L.B., Oppenheim, J.J. and Favata, M.F. (1980). The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* 151:1351-1356.
144. Spitz, M., Gearing, A., Callus, M., Spitz, L. and Thorpe, R. (1985). Interleukin-2 in vitro production of and response to interleukin-2 in lymphoid organs undergoing a primary immune response to heterologous erythrocytes. *Immunology.* 54:527-532.
145. Sredni, B. and Schwartz, R.H. (1980). Alloreactivity of an antigen specific T cell clone. *Nature.* 287:855.
146. Swain, S.L., Bakke, A., English, M. and Dutton, R.W. (1979). Ly phenotypes and MHC recognition: The allohelper that recognizes K o D is a mature Ly123 cell. *J. Immunol.* 123:2716.
147. Swain, S.L. (1981). Significance of Lyt phenotypes: Lyt 2 antibodies block activities of T cells that recognize class I major histocompatibility complex antigens regardless of their function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:7101.
148. Taku, A. and Braciare, T.J. (1984). A helper factor needed for the generation of mouse cytolytic T lymphocytes is made by tumor cell lines, cloned T cells and spleen cells exposed to a variety of stimuli. *J. Immunol.* 132:1853-1862.
149. Tartakovsky, B., Axelrod, D., Blankstein, T. and Hozes, E. (1989). Correlation between the Biologic Functions

and the Generation of Lymphokines in T cell clones. . J. Immunol. 142(18): 2675-2701.

150. Thomas, L. (1959). Reactions to homologous tissue antigens and relation to hypersensitivity. In: Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States (H.S. Lawrence, ed.) Hoeber N.Y. 527-532.
151. Thorn, G.W., Adams, R.D. et.al. (1979). Medicina Interna de Harrison. Sa. Ed. La Prensa Médica Mexicana, S.A. 2499 pp.
152. Topalian, S.L., Solomon, D., Avis, F.P. and 9 others. (1988). Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. J. Clin. Oncol. 6:839.
153. Tsunokawa, Y. and Sugitara, T. (1986). Transforming activity of human papillomavirus type 18 DNA sequences in a cervical cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:2200-2203.
154. Ueda, T. and Kikuchi, K. (1985). Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: II. Differential ability of mononuclear cells obtained from various tissues to produce helper factor that are involved in the generation of cytotoxic cells. J. Immunol. 135:3243.
155. Van Furth, R. and Silviter, W. (1982). Development of mononuclear phagocytes self-defense mechanisms. In: Role of macrophages. A Naito Foundation Symposium. University of Tokyo Press. p. 373.
156. Vassiliev, J. M. and Gelfand, I.M. (1981). Neoplastic and normal cells in culture. Cambridge Univ. Press. Great Britain. 372 pp.
157. Wagner, H. (1973). Correlation between T-lymphocytes and other mononuclear cells in the defense mechanisms. J. Exp. Med. 183:1379-1397.
158. Wagner, H., Hardt, G., Rouse, B. and Pfizenmaier, K. (1982). Dissection of the proliferative and differentiative signals controlling murine cytotoxic T-lymphocytes responses. J. Exp. Med. 555: 1876-1881.
159. Weiss, L. (1972). The cells and tissues of the immune system. Structure, functions, interactions. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.

160. Weissman, I.L., Rouse, R.V., Kyewski, V.A. and Lepault, F. (1981). Thymic lymphocyte maturation in the thymic microenvironment. In: Behring Institute Mitteilungen, *The Influence of the Thymus on the Generation of the T Cell Subsets*. Presented at the Int. Workshop, Rudesheim, Sep. 16-17. (F.R. Seiler and H.G. Schwick, Eds.). 242-251.
161. Werkmeister, J. and Hersey, P. (1980). Characterization of an inhibitor of cell division released in tumour cell cultures. *Clin. Exp. Immunol.* 41:487.
162. West, W.H., Tauer, K.H., Yannelli, J.R. and 4 others. (1987). Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 316:898.
163. Wettstein, P.J. and Frelinger, J.A. (1977). T-lymphocyte response to H-2 mutants. Proliferation is dependent on Ly1 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:3425.
164. Whiteside, T.L. and Heberman, R.B. (1988). Cytolytic antitumor effector cells in long term cultures of human tumor-infiltrating lymphocytes in recombinant interleukin-2. *Cancer Immunol. Immunother.* 26:11.
165. Williams, J.M., de Loria, D., Hansen, J.A. and Strom, T.B. (1985). The events of primary T cell activation can be staged by use of sepharose-bound anti T3 monoclonal antibody and purified IL-1. *J. Immunol.* 135:2249.
166. Wintrube, M.M. (1974). Lymphocyte function. In: *Clinical Hematology 7th.* Lea and Febiger. U.S.A. 1876 pp.
167. Woods, G.M. and Lowenthal, R.M. (1984). Cellular Interactions and IL-2 Requirements of PHA-induced Human T-lymphocyte Colonies. *Exp. Hematol.* 12:301-308.
168. Wu, A.M., Till, J.E., Sainovitch, L. and McCulloch, E.A. (1980). Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 127:455.
169. Yanaki, T. and Kikuchi K. (1988). Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumor : III. Soluble factors involved in the regulation of T-lymphocytes infiltration into tumor. *J. Immunol.* 140:4388-4396.

170. Yasunoto, S. and DiPaolo, J.A. (1986). Human papillomavirus type 18 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virology*. 57: 572-577.
171. Yoffey, J.M. and Courtice, F.C. (1970). Lymphatics, lymph and the lymphomyeloid complex. Academic Press, New York, 714 pp.

APENDICES

APENDICE 1

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO EAGLE MEDIUM (E.M.)

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, utilizando para ello dos matraces. Se adicionan 13.4 g/l de E.M. en polvo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, U.S.A.) agitándose suavemente, se agregan 3.7g de Bicarbonato de Sodio, 100 U/ml de Penicilina y 100 U/ml de Estreptomicina. Se completa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del ideal, que es de 7.2, empleando para esto Ácido Clorhídrico diluido y se esteriliza por filtración con membrana de poro de 0.22 micras

COMPOSICION DEL MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE.

Aminoácidos	Concentración (mg/L)
L-arginina	84.00
L-cistina	62.57
L-glutamina	504.00
Glicina	30.00
L-histidina HCl, H ₂ O	42.00
L-isoleucina	105.00
L-leucina	105.00
L-lisina, HCl	146.00
L-metionina	30.00
L-fenilalanina	66.00
L-serina	42.00
L-treonina	95.00
L-triptofano	16.00
L-tirosina (sal disódica)	104.20
L-valina	94.00

Vitaminas

D-Ca Pantotenato	4.00
Cloruro de Colina	4.00
Acido Fólico	7.20
Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxal	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina	4.00

Sales Inorgánicas

Cloruro de Calcio Anhidro	200.00
Nitrato de Hierro III nohidratado	0.10
Cloruro de Potasio	400.00
Sulfato de Magnesio anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.00
Fosfato Monosódico monohidratado	125.00

Otros Compuestos

L-glucosa	4500.00
Rojo Fenol	15.00

APENDICE 2

PREPARACION DE FICOLL-PADUE

La preparación de Ficoll para llevar a cabo la separación de células monoclonadas por medio de un gradiente de densidad se realiza de la siguiente manera: Se prepara una solución de Ficoll (Ficoll 400, Farmacia Fine Chemicals, Suiza) al 9% en agua destilada. De esta solución se toman 24ml y son mezclados con 10ml de una solución Hypaque (Winthrop Products, U.S.A.) al 34% en agua destilada. Estas dos soluciones se mezclan perfectamente, obteniendo así una densidad final de 1.07 g/ml. La esterilización de esta solución se lleva a cabo por medio de autoclave a 10 libras de presión durante 15 minutos.

APENDICE 3

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO RPMI - 1640

Se mide un 90% del volumen final requerido de agua destilada y desionizada y se coloca en un recipiente de tamaño lo más cercano posible a la medida del volumen final a preparar. La temperatura del agua debe ser de 15-20°C. Bajo agitación lenta y constante se adiciona el RPMI-1640 (RPMI-1640 MEDIUM, Sigma, U.S.A.) hasta su disolución; no debe aplicarse calor al agua. Con un volumen menor al 5% del volumen total de agua se enjuaga el paquete que contenía el Medio en polvo para remover cualquier traza de este que hubiera quedado adherido y se adiciona al recipiente.

A la solución obtenida se le adicionan 2.0g de Bicarbonato de Sodio o 26.7ml de solución de Bicarbonato de Sodio al 75% por cada litro de volumen final de Medio a prepararse. El medio en su presentación comercial contiene ya el aminoácido L-glutamina, sin embargo, el cultivo de células linfoides requiere de una mayor concentración de este. Por tal motivo, en esta etapa de la preparación se adiciona L-glutamina (Sigma, U.S.A) en una concentración 2mM. La agitación es útil para la total disolución de estos compuestos.

Se ajusta la solución a pH 7.2-7.4 a 20°C usando, para este fin, una solución concentrada de Hidróxido de Sodio. Se adiciona la cantidad de agua requerida para completar el volumen final y se esteriliza la solución filtrándola con membranas de poro de 0.22 micras.

COMPOSICION DEL RPMI-1640

Sales Inorgánicas	Concentración G/L
Nitrato de Calcio 4H D	0.100
Sulfato de Magnesio anhidro	0.04004
Cloruro de Sodio	6.0
Fosfato Dibásico de Sodio anhidro	0.8

Aminoácidos

L-arginina	0.2
L-asparagina	0.050
L-ácido aspártico	0.20
L-cistina 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.300
Glicina	0.010
L-histidina	0.015
L-hidroxi prolina	0.020
L-isoleucina	0.050
L-leucina	0.050
L-lisina HCl	0.040
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.020
L-serina	0.030
L-treonina	0.020
L-triptofano	0.005
L-tirosina	0.02883
L-valina	0.020

Vitaminas

D-biotina	0.0002
Cloruro de Colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Acido p-Amino Benzóico	0.001
Acido D-Pantoténico	0.00025
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B-12	0.000005

Otros

D-glucosa	2.000
Glutation Reducido	0.001
HEPES	5.958
Raja Fenol	0.0053

APENDICE 4

INDICE MITOTICO

El cálculo del Índice Mitótico se lleva a cabo mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$I.M = \frac{NCd}{NCT} \times 100$$

donde: I.M = Índice Mitótico.

NCd = Número de Células en división.

NCT = Número de Células total.