

138

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO.

FACULTAD DE QUIMICA.

ANTIGENOS CARCINOEMBRIONARIOS
EN LEUCOBLASTOS LEUCEMICOS.

T E S I S .

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A .

SUSANA EVA HIRSCH MOGYORAS

México, D. F.

1973.

M-172294



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE:	PROFESORA	MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL:	PROFESORA	CARMEN REYNA BORDES
SECRETARIO:	PROFESORA	ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA
1er. SUPLENTE:	PROFESORA	SOCORRO CAO ROMERO
2o. SUPLENTE:	PROFESORA	DEA CORONADO PERDOMO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD DEL
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION DEL
CENTRO MEDICO NACIONAL DEL I.M.S.S.

SUSTENTANTE:

SUSANA EVA HIRSCH MOGYOROS

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA.

SUPERVISOR TECNICO:

DR. HECTOR GOMEZ ESTRADA.

Recibid mi enseñanza y no plata;
Y ciencia antes que el oro escogido.
Porque mejor es la sabiduría que -
las piedras preciosas,
Y todo cuanto se puede desear, no es
de compararse con ella.

Proverbios 8.10-11

I N D I C E :

- I. INTRODUCCION.
- II. GENERALIDADES.
- III. MATERIAL Y METODOS.
- IV. RESULTADOS.
- V. DISCUSION.
- VI. CONCLUSIONES.
- VII. BIBLIOGRAFIA.

I. INTRODUCCION.

Las condiciones de vida actuales permiten alcanzar edades superiores a las de épocas precedentes. Ello ha dado lugar a la aparición con frecuencia ascendente de enfermedades degenerativas como son las neoplasias malignas. Según datos obtenidos del Departamento de Estadísticas Sociales de la Secretaría de Industria y Comercio, éstas presentan en nuestro país, como causa de mortalidad, una tasa creciente desde 1922 en que era de 14, al año de 1969 en - que ha alcanzado un valor de 35 por 100,000 habitantes, lo cual ha dado lugar a que ya en el año de 1964 ocupara el - quinto lugar como causa de defunción.

Las leucemias, en particular, vienen presentando un incremento anual, a partir de 1960, del 10% como causa de mortalidad.

En vista de lo anterior, se considera que es necesario hacer una mayor investigación en este campo, con - el objeto de llegar a tener un conocimiento más completo de estos padecimientos tendiente a mejorar los procedimientos profilácticos y terapéuticos de ellos.

Uno de los principales **problemas** para la preven-- ción, diagnóstico y tratamiento del cáncer, es el desconocimiento de su etiología.

Varios autores¹⁻⁶ han identificado antígenos em-- brionarios en células tumorales. Estos son los antígenos - carcinoembrionarios (ACE)⁴ u oncofetales (AOF)¹.

Para investigar las semejanzas entre los ACE y - los antígenos neoplasia específicos (ANE), se probaron los sueros de pacientes leucémicos contra leucocitos de recién nacidos y la aglutinabilidad de ambos con la Concanavalina A (Con A).

II. GENERALIDADES.

ANTECEDENTES SOBRE RETROGRESION ANTIGENICA E INMUNOLOGIA DE CANCER.

Los cambios asociados a la transformación maligna en la estructura de la membrana celular consisten en la aparición de ANE que sólo se encuentran normalmente presentes en las células embrionarias⁷ y que se encuentran ocultos en las células de adultos normales. Este fenómeno se conoce con el nombre de retrogresión antigénica, mencionado anteriormente^{1-4,6} de donde resulta que los ANE pueden ser biológicamente equivalentes a los ACE.

Los ACE son el producto de un cambio en la estructura de la membrana celular sin relación con la expresión de antígenos virales y por lo tanto pueden ser comunes en una misma especie a varias neoplasias, independientemente del virus inductor, como se ha observado, por ejemplo, en las leucosis aviarias⁸.

Las células transformadas son antigénicas para el portador de la neoplasia: se ha demostrado que las células esplénicas de animales inmunizados con fibroblastos embrionarios resultan citotóxicas in vitro a las células singénicas transformadas por virus del polioma⁹. Sin embargo, los intentos para suprimir el crecimiento tumoral in vivo por procedimientos de inmunización ha dado lugar a crecimiento acelerado del tumor, sugiriendo un fenómeno de facilitación inmunológica hacia la neoplasia.^{9,10.}

Los ANE y ACE son glucoproteínas, en cuya antigenicidad contribuye de manera muy importante el ácido N-acetilneuramílico.¹¹ La antigenicidad tisular normal (HL-A) y neoplásica (ANE y ACE) está dada por glucoproteínas y glucolípi-

dos de la membrana celular. ¹²

Se ha encontrado en las neoplasias experimentales ¹³⁻¹⁶ y humanas ¹⁷⁻²⁴ un acúmulo de glucoproteínas en las membranas - de las células malignas, superior a lo normal, ²⁵ que aparentemente son secretadas al espacio intercelular. Su presencia se ha correlacionado a una mayor velocidad de crecimiento y diseminación tumoral. ²⁶

En las células transformadas y de neoplasias espontáneas, existen enzimas que sintetizan glucoproteínas a velocidad acelerada. ²⁷⁻³¹ Las células que han sido transformadas sintetizan glucoproteínas a velocidad muy superior a las normales y ésta es aún mayor en aquellas células que han sido doblemente transformadas por la acción simultanea de dos virus oncogénicos. ²⁷ El incremento de la síntesis es real y no atribuible a una mayor velocidad de crecimiento o proliferación. ²⁷ Las enzimas son 4--glucosil-transferasas que en número de cuatro han sido descritas en estas células. ²⁷⁻³¹ Las glucoproteínas son sintetizadas intracelularmente, ³² aunque el componente glucídico se une al final cerca de la membrana. ^{31,32.}

La síntesis puede llegar a ser tan activa que las glucoproteínas pueden llegar a ser secretadas a los líquidos extracelulares. En las neoplasias experimentales se ha encontrado un aumento en las glucoproteínas séricas de animales portadores de neoplasias en forma paralela al crecimiento tumoral, mientras que el resto de las proteínas séricas tendieron a disminuir. ³³ Estos experimentos realizados en hamsters han demostrado que en el suero de ellos pueden identificarse por inmunoelectroforesis unas cinco proteínas adicionales, habiéndose sugerido que éstas pueden ser proteínas normales cuya concentración aumenta en los portadores de la neoplasia; ³³ sin embargo, los cambios inmuno-

electroforéticos son más acentuados en los animales inoculados con tumores xenogénicos. ³³

Se ha encontrado que el trasplante de células de tumor de colon humano transplantadas en la bolsa cervical o en músculos de hamsters, permanecen produciendo el ACE, que es detectable en la sangre del portador. ³⁴

En el suero de pacientes oncológicos la alfa-glucoproteína ácida se encuentra elevada en casos con carcinoma cérvico-uterino antes de la histerectomía. ³⁵ Resultados similares se han informado en adenocarcinoma mamario, enfermedad de Hodgkin, leucemia granulocítica crónica, melanoma, hepatoma, carcinomas indiferenciados, carcinoma de cuello, sarcoma osteogénico y reticulosarcoma. ³⁵⁻³⁸ En la leucemia infantil aguda se ha observado aumento de las glucoproteínas en el plasma, principalmente en casos graves; pero los valores tendieron a normalizarse en los períodos de remisión clínica, correlacionándose el aumento de las glucoproteínas con el número de blastos en sangre circulante y en médula ósea. ³⁹

Se mencionó anteriormente que la inmunización de animales con células embrionarias produce una respuesta inmune hacia las células de esa misma especie transformadas por virus oncogénicos. Los ACE se han encontrado presentes en animales de experimentación en los óvulos no fecundados, ⁴⁰ y éstos pueden ser empleados en la inmunización a cobayos y el suero inmune resultó citotóxico contra células de esta misma especie transformadas con virus SV-40, por lo que los autores del trabajo demuestran la relación existente entre los ANE y ACE ovulares. ⁴⁰

Se ha informado que las células trofoblásticas que constituyen la capa más externa de la placenta y que se encuentra en íntimo contacto con la circulación materna, son antigénicas. De hecho, los linfocitos autólogos son citocídi-

cos para las células trofoblásticas cultivadas in vitro.⁴¹

En una población alogénica la placenta es esencialmente un injerto tolerado. Las células trofoblásticas son portadoras de antígenos de histocompatibilidad normales (HL-A)⁴² pero al parecer, dichos antígenos se encuentran enmascarados in vivo. En ese trabajo, ningún suero materno dió pruebas de MCT positivas con las células de su trofoblasto específico.⁴²

El trofoblasto es una estructura celular que ha sido extensamente estudiada.⁴³ Desde hace varios años se había consignado el hecho de que el trofoblasto y la decidua no están en contacto directo sino que se encuentran separados entre sí por una capa de material fibrinoide que rodea a las células trofoblásticas⁴⁴ y que por métodos específicos de tinción histoquímica como es la técnica del hierro coloidal se ha encontrado que corresponde a una capa de mucopolisacáridos ácidos de 1.4 micras de espesor en promedio, que recubre las vellocidades coriónicas.⁴⁵ Es posible que estas glucoproteínas pasen a la circulación materna. Se ha informado que en el suero de las mujeres embarazadas existe un aumento de la alfa 1-glicoproteína ácida, la alfa-2-glicoproteína y la gama-globulina con alto contenido de carbohidrato.^{46,47}

Durante el embarazo, el trofoblasto semeja por su comportamiento, a una neoplasia maligna que prolifera e invade la pared uterina y en ocasiones desprende porciones de sí mismo hacia la circulación materna, por lo cual este tejido peculiar ha sido designado con el nombre de carcinoma fisiológico⁴⁸ que prospera en un endometrio pasivo y tal vez receptivo. El desprendimiento de grupos de células trofoblásticas que pasan a la circulación materna fue descrito desde 1893 -

por Shmorl,⁴⁹ con el nombre de deportación trofoblástica, lo cual ha sido confirmado mas recientemente.⁵⁰ Este fenómeno - se ha comparado al comportamiento de las células malignas por su cualidad metastásica.⁴⁸ Se han identificado grupos celulares trofoblásticos en la circulación materna, de 100 a 200 - micras de diámetro, a partir de la decimooctava semana gestacional.⁴⁹ Las células trofoblásticas deportadas a la circulación materna pueden ser encontradas abundantemente en pulmones a medida que progresa el embarazo, para desaparecer en el post-parto.⁵⁰

La vida media de estos émbolos trofoblásticos es - aproximadamente de 3 días, lisándose en los pulmones y desapareciendo sin dejar lesión.⁵⁰ En algunas especies, las células del trofoblasto presentan un comportamiento particularmente - invasivo activo a las arterias, las cuales se recubren en su endotelio vascular por células trofoblásticas que emigran hacia ellas.⁵¹ Las células trofoblásticas pueden ser transplantadas extrauterinamente y con frecuencia son bien toleradas - aún xenogénicamente, como por ejemplo de ratón a hamster.⁵¹ El trofoblasto, sin embargo, ha demostrado ser antigénico. Los anticuerpos maternos se fijan al trofoblasto, que aparentemente los absorbe sin daño durante el embarazo, por lo que no se les encuentra en la circulación materna. Sin embargo, el suero materno obtenido 4 días post-parto da reacciones de inmunofluorescencia positivas con las placentas autólogas.⁵² Los anticuerpos anti-trofoblastos no son específicos para una combinación madre-placenta autóloga, sino que muestra reactividad cruzada, por lo que se puede concluir que el antígeno no es un - producto específico del feto como pudieran ser los antígenos - HL-A también presentes en las células trofoblásticas.^{42, 53.}

Algunos autores han sugerido que la capa de glucoproteínas que reviste al trofoblasto enmascara los antígenos de histocompatibilidad normales de las células trofoblásticas y de esta manera protegen a la placenta de ser rechazada inmunológicamente.^{54, 55} aún cuando ésta sea heterotransplantada.⁵⁶ El tratamiento de las células trofoblásticas con neuraminidasa les permite expresar sus antígenos de histocompatibilidad⁵⁷ y la aplicación endovenosa de neuraminidasa en ratonas embarazadas da lugar a interrupción del embarazo en todos los casos tratados.⁵⁸

Las células de algunos tumores murinos tienen una gruesa capa de glucoproteínas. La preincubación de ellas con neuraminidasa reduce a un 10% la transplantabilidad del tumor por inoculación de estas células, por lo que se piensa que los antígenos subyacentes de las células neoplásicas se encuentran enmascarados y al ser desenmascarados por la neuraminidasa son capaces de inducir una acción de rechazo hacia ellos.⁵⁹⁻⁶² El tratamiento con neuraminidasa, no sólo tiene utilidad profiláctica, sino que la inmunización con células malignas tratadas con la enzima a ratones que ya tenían un tumor en crecimiento progresivo, induce a la desaparición total de la neoplasia en el 33% de los animales y en el 66% restante el tumor cesó en su crecimiento.⁶³ Posiblemente el poder inmunogénico de las células tratadas sea disminuído por el hecho de que las células recuperan su envoltura glucoprotéica una hora después de ya no estar en contacto con la neuraminidasa.⁶⁴

La neuraminidasa se ha empleado también en leucemia murina L-1210:^{65, 66}

La inoculación de 40,000 de estas células causa la muerte por leucemia en menos de 20 días al 100% de los receptores. Cuando se inoculó la misma cantidad de células tratadas con neuraminidasa todos ellos sobrevivieron más de 100

días. El tratamiento con neuraminidasa no afecta la viabilidad celular. La importancia que tiene la respuesta inmune en el rechazo de los leucoblastos leucémicos se ha puesto de manifiesto por el hecho de que la inmunodepresión de los receptores conduce a la muerte del animal por leucemia en el plazo normal. ⁶⁵

Los linfocitos maternos presentan un efecto citocídico contra las células embrionarias cultivadas in vitro, lo cual demuestra que son capaces de llevar a cabo una respuesta inmune, contra las células alogénicas fetales. Sin embargo, este efecto es inhibido por la presencia de suero materno, - en el que se presume la presencia de un anticuerpo de tipo - bloqueador, que actuando a manera de anticuerpo de facilitación inmunológica ¹⁰ resulta de utilidad para la supervivencia del producto, ⁶⁷ pero semejante a lo que ocurre en los portadores de neoplasias, cuando éstas tienden a persistir y no a ser rechazadas inmunológicamente. ¹⁰

Se ha demostrado que las glucoproteínas que revisten a las células trofoblásticas son antígenos que inducen en el organismo a la producción de anticuerpos de facilitación inmunológica. ⁶⁸ Posiblemente la capa de glucoproteínas que reviste a las células malignas tenga una función semejante en ellas. De hecho, estas células son portadoras de antígenos HL-A; pero no son afectadas en las pruebas de MCT por los sueros inmunes correspondientes. Así pues esta técnica se ha empleado como un procedimiento de diferenciación entre las células normales y malignas cuando existen mezcladas; lo cual se ha atribuido al cubrimiento de los antígenos HL-A por la capa de glucoproteína en estas últimas. ⁶⁹

Un hecho sobresaliente de los anticuerpos de facilitación en la leucemia es su incapacidad para fijar complemen

to autólogo.⁷⁰ Por otra parte, si a los anticuerpos de rechazo se les quita el fragmento Fc, éstos se vuelven de facilitación.⁷¹ Al parecer, el fenómeno de facilitación inmunológica, además de ser mediado por anticuerpos, puede ser de tipo celular dependiendo de la proporción en que entren en contacto las células malignas con las inmunocompetentes del organismo.⁷² Al parecer, ambas formas de facilitación inmunológica son inducidas por la cubierta glucoprotéica de las células trofoblásticas y malignas. Así, se ha demostrado que el crecimiento tumoral es acelerado en ratonas durante la gestación.⁷³ Algunos autores han llamado la atención recientemente acerca de las similitudes inmunológicas existentes entre embarazo y desarrollo neoplásico.⁷⁴

Los datos anteriores explican porqué durante el embarazo las células trofoblásticas no son rechazadas, e incluso circulan libremente en la sangre;⁴⁸⁻⁵⁰ sin embargo, queda por dilucidar porqué los tejidos fetales no placentarios son tolerados. Sabemos que durante el embarazo ocurre un transporte activo de inmunoglobulinas de madre a feto.⁶⁸⁻⁶⁹⁻⁷¹⁻⁷⁷

En animales de experimentación se ha inmunizado de liberadamente a la madre con antígenos paternos y se ha hecho la transferencia de óvulos fecundados a las cavidades uterinas de madres receptoras. Los resultados han sido los siguientes:

Cuando el feto en madre prestada no es específico a la madre inmunizada, el título de anticuerpos citotóxicos es igual en ambos, por lo que se concluye que los anticuerpos citotóxicos antifetales pueden pasar de madre a feto. - Cuando el feto tenía los antígenos a los cuales la madre había sido inmunizada, la mayoría de ellas no tenía anticuerpos

circulantes, lo cual implica que son absorbidos por los tejidos fetales, sin causar daño.⁷⁸ El paso de anticuerpos de la madre al producto ocurre muy tempranamente y se les ha encontrado en blastocistos de 8 días de gestación, en conejos.⁷⁸

En el 17% de las mujeres multíparas se han encontrado leucoaglutininas contra leucocitos de sus hijos recién nacidos.⁷⁹

El paso de linfocitos de madre a feto también ocurre durante el embarazo,⁸⁰ sin embargo, éstos no parecen dañar inmunológicamente al feto, salvo en casos muy excepcionales.⁸¹

III. MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL.

Sueros de adulto normal: Se obtuvieron 240 muestras de 2 ml. de suero de donadores adultos jóvenes del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del IMSS. con la colaboración del Dr. Héctor Rodríguez Mayado.

Sueros de pacientes leucémicos: Se obtuvieron 53 sueros del Laboratorio de Hematología, tomados al azar de 28 pacientes leucémicos que asistieron a la Consulta Externa o se encontraban encamados en el Servicio de Hematología del Hospital de Oncología del Centro Médico del IMSS. De cada paciente se obtuvieron de una a cuatro muestras, dependiendo de la duración del estudio y sobrevida del caso. Cada suero fué codificado, de manera que al hacer las pruebas se desconocían los datos de cada paciente. El nombre, edad, sexo, antecedentes transfusionales, gestaciones, diagnóstico, tratamiento y respuesta al mismo, en las fechas correspondientes a la obtención de cada muestra de suero, se investigaron en los expedientes clínicos hasta la terminación del trabajo de laboratorio.

Leucocitos de adulto normal: Se obtuvieron 27 muestras de sangre de donadores adultos diferentes a los de las muestras de suero. La sangre se desfibrina por agitación suave en tubo de ensaye de 13 x 100 mm. con 12 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro. Los Leucocitos se obtienen de la sangre líquida sobrenadante.

Leucocitos fetales: Se obtuvieron 23 muestras de 5 ml. de sangre de cordón umbilical de niños nacidos a término por partos eutóxicos en el Hospital de Ginecobstetricia No.2 del Centro Médico Nacional del IMSS, por colaboración del Dr. Porfirio Landázuri Laris. La sangre fue desfibrinada para

la obtención de los leucocitos fetales.

REACTIVOS:

Ficoll* de peso molecular 400,000 al 9%

Hypaque** solución al 33.9% en agua destilada

Medio de cultivo simple Mc Coy 5a***

Aceite mineral****

Solución acuosa de eosina al 5%

Formol al 30% con el pH regulado a 7

Concanavalina A *****

*Pharmacia

** Winthrop

*** Grand Island Biol. Lab.

**** Nujol

***** Sigma

MÉTODOS.

Obtención de leucocitos fetales y de adulto: Se utilizó el método de Böyum⁸² modificado por nosotros: se prepara una solución compuesta de diez partes de Hypaque mas 24 - partes de la solución de Ficoll. La mezcla da una densidad de 1.076 a 1.078. Un ml. de esta solución a temperatura ambiente (20-22° C), se coloca en un tubo de plástico para centrífuga Fisher modelo 152. Sobre ella se coloca una capa 0.5 ml. de - sangre desfibrinada, procurando conservar la interfase entre la sangre y la solución de Hypaque-Ficoll. Se centrifuga a 3,500 G por cinco minutos. Los leucocitos se recogen con pipeta Pasteur de la interfase y se lavan con sesenta volúmenes de medio de cultivo simple Mc Coy 5a. por centrifugación a - 500 G 30 segundos. Los leucocitos se suspenden en medio de - cultivo fresco y se estandarizan por conteo en cámara cuenta-glóbulos a 2×10^6 células por ml. Aproximadamente la mitad - de ellos son linfocitos y el resto polimorfonucleares.

Prueba de microcitotoxicidad (MCT): Se empleó la - técnica de Terasaki et al.⁸³ Las pruebas se hicieron en placas de plástico de 60 excavaciones para micropruebas de Falcon catálogo 3034. Los pozos se cubren con 5 mcl de aceite mine-- ral para evitar la evaporación de los reactivos. En las pla-- cas se depositó en cada pozo 1 mcl de los sueros problema inac-- tivados a 56 grados Centígrados por 30 minutos, en un orden - constante anotado en una hoja de control con el objeto de iden-- tificar la procedencia del suero. Cada lote de placas así car-- gadas de conservó en congelación a -70 grados hasta el momen-- to de usarse para la pruebas con los leucocitos. Para ello, - se descongelaron y se agregó en cada pozo 1 mcl ya sea de la suspensión de leucocitos fetales o de adulto. Estos se incu-- ban con los sueros normales o leucémicos por 30 minutos a -

20-22 grados. Enseguida se agregaron 5 mcl de suero fresco de conejo como fuente de complemento y se continuó la incubación por 30 minutos más. Luego, las células se tiñeron con 2 mcl. de una solución acuosa de eosina al 5% por dos minutos y se fijaron con 5 mcl de formol al 30% con el pH regulado a 7. Se cubrieron los pozos con una laminilla de vidrio y se observaron los resultados en un microscopio invertido con contraste de fases UPI de Zeiss. La lectura de viabilidad celular de cada prueba se compara con la de los testigos. El resultado se consideró negativo cuando en ella aparecieron no más del 5% de células muertas y positivo cuando se observó el 80% de células muertas.

Los leucocitos de cada donador adulto ó recién nacido, se probaron simultáneamente contra 53 sueros leucémicos y de 60 a 240 sueros normales.

En cinco de los casos de adulto normal y cinco de recién nacido, la prueba de MCT se efectuó sustituyendo el suero de conejo por suero normal humano y suero autólogo al donador de los leucocitos, obteniéndose siempre resultados negativos.

Los leucocitos se incubaron inmediatamente después de haber sido obtenidos de la muestra de sangre y por no más de 60 minutos a temperatura ambiente, para reducir la adherencia de los polimorfonucleares al plástico. Hasta un 5% de células adheridas no interfiere con la lectura correcta de la reacción. Las células muertas de la serie granulocítica adoptan una forma redonda y se tiñen de color rojo oscuro con la eosina, mientras que las células adheridas conservan un aspecto

to estrellado irregular y no se tiñen con la eosina.

Prueba de aglutinación con la Con A: Se siguió el método de Imbar y Sachs.⁸⁴ Se disuelven 250 mcg de Con A en 1 ml de medio de cultivo Mc Coy 5a y con él se resuspenden 2×10^6 leucocitos de recién nacido o de adulto y se incuban a 37° C por 20 minutos. A continuación se centrifugan a 500 G por 15 segundos. La aglutinación se observa por agitación suave del tubo y además en una cámara cuentaglóbulos Speirs-Levy para eosinófilos de 0.2 mm de profundidad con iluminación de contraste de fases en microscopio Zeiss a 125 diámetros de amplificación. Se consideraron pruebas positivas - aquellas en las cuales la aglutinación macroscópica era evidente y al microscopio se observaba que la mayoría de las células formaban grupos de más de 20 leucocitos.

IV. RESULTADOS.

La técnica empleada para la separación de los leucocitos permitió la obtención de suspensiones celulares mixtas, compuestas aproximadamente por un 50% de linfocitos y 50% de polimorfonucleares. La contaminación con eritrocitos suele ser de menos del 2%.

Encontramos que la técnica de MCT descrita por Terasaki et al⁸³, es adaptable para el estudio de la reacción de citotoxicidad tanto para linfocitos como para polimorfonucleares, si se reduce la adherencia de estos últimos por medio de la separación rápida de los leucocitos, realizando la prueba a temperatura ambiente y reduciendo el período de incubación total a una hora. De esta manera se logra que menos del 5% de los polimorfonucleares se adhieran y el resultado de cada prueba sea más claro.

En la prueba de MCT los polimorfonucleares "vivos", que no fueron afectados por la reacción, se ven refringentes de no encontrarse adheridos, o si lo están presentan una forma estrellada irregular de límites difusos. En cambio, los polimorfonucleares muertos por la reacción de citotoxicidad se observaron de forma uniformemente circular, de límites precisos y teñidos de color rojo oscuro por la eosina. Los linfocitos no afectados por la reacción se observaron refringentes; mientras que los muertos se vieron de mayor tamaño, redondos y teñidos de rojo oscuro, como es lo usual en esta técnica. Con las consideraciones anteriores, es posible hacer pruebas de MCT con una población mixta de linfocitos y polimorfonucleares.

Con las 240 muestras de sueros de adultos, se efectuaron 2,415 pruebas de MCT contra los leucocitos de otros 27 adultos normales, de ellas, 6 resultaron positivas (0.25%). Con estos mismos sueros se hicieron 2,372 pruebas contra los

leucocitos de 23 recién nacidos, de los cuales 14 resultaron positivas (0.59%). La diferencia entre estas tasas no se considera significativa ($P=0.07$) (Tabla 1)

Con las 53 muestras de suero de 28 pacientes leucémicos, se hicieron 816 pruebas de MCT contra leucocitos de los mismos 27 donadores adultos, resultando 59 positivas (7.23%). Con los mismos sueros se realizaron 1,580 pruebas contra los leucocitos de los 23 recién nacidos, de las cuales 84 fueron positivas (5.31%). La diferencia, no se considera significativa ($P=0.06$) (Tabla 1).

En la tabla 2 se muestra la relación de los 27 casos de leucemia, con diagnóstico, antecedentes gestacionales, transfusionales y control terapéutico, cuyas 53 muestras de suero se probaron por la técnica de MCT contra los leucocitos de 27 donadores adultos y 23 recién nacidos. Los resultados se presentan divididos en cuatro grupos:

GRUPO 1. Nueve de los sueros dieron resultados positivos en 53 ocasiones contra leucocitos de adultos y 54 veces con leucocitos fetales. De ellos, ninguno se encontraba controlado terapéuticamente o en remisión de su leucemia.

GRUPO 2. Seis muestras dieron pruebas de MCT positivas en siete ocasiones contra leucocitos de adulto. De ellos cuatro se encontraban controlados y dos no.

GRUPO 3. Nueve muestras de sueros dieron pruebas de MCT positivas en 31 ocasiones contra leucocitos fetales, de los cuales ninguno se encontraba controlado.

GRUPO 4. Veintinueve muestras dieron siempre resultados negativos cuando se les probaron contra leucocitos de adultos y de los recién nacidos. Todos ellos correspondieron a etapas en que los pacientes se encontraban en remisión o controlados terapéuticamente.

En los cuatro grupos, la presencia de anticuerpos en los sueros leucémicos no muestra correlación con el número de gestaciones ni con los antecedentes transfusionales de los - casos. En la serie, quedaron incluidos solamente cuatro casos sin estos antecedentes y siempre dieron pruebas de MCT positivas y se encontraban controlados de su leucemia.

Con las muestras seriadas de cada uno de los pacientes, pudo verse que las pruebas de MCT positivas se obtenían en las etapas en que el padecimiento se encontraba en recurrencia, agudización o sin control terapéutico.

Cada suero dió pruebas de MCT positivas contra unos; pero no contra todos los leucocitos fetales o de adultos contra los que fuera probado, lo cual habla de cierta especificidad en la reacción.

La prueba de aglutinación de los leucocitos fetales con la Con A resultó positiva en todos los casos, En los grumos formados por las células participaban la mayoría de los - leucocitos de las muestras. Con los leucocitos de adulto, siempre se obtuvieron resultados negativos.

Diez muestras al azar de leucocitos fetales y diez más de adulto fueron tipificados y se les encontró ser portadores de los antígenos HL-A 1,2,3, 4a,7,8,9,11,12,y 13. Al - probarse contra los sueros leucémicos, no se encontró asociación entre los que daban pruebas de MCT positivas y los anteriores antígenos.

Tabla 1

Resultados de las pruebas de microcitotoxicidad (MCT) con leucocitos de adultos normales y de recién nacidos contra sueros de adulto normales y de leucémicos:

Leucocitos de	Pruebas de microcitotoxicidad (MCT) con					
	Sueros normales			Sueros leucémicos		
	Total de pruebas	núme- ro	%	Total de pruebas	Núme- ro	%
Adulto	2 415	6	0.25	816	59	7.1
Recién nacido	2 372	14	0.59	1 580	84	5.32

Tabla 2

Relación de los casos de leucemia, con diagnóstico, gestaciones transfusiones y control terapéutico, cuyas muestras de suero se probaron por la técnica de microcitotoxicidad (MCT) contra los leucocitos de 27 donadores adultos (A) y 23 recién nacidos (RN)

Caso	Gesta	Transfu siones	Diagnós ticos	Muestra	Control	MCT	
						A	RN
1	0	5	LGC	a	si	0	0
				b	si	0	0
				c	no	0	3*
				d	si	0	0
2	1	12	LGC	a	no	13	14
				b	no	8	10
3	0	2	LGC	a	no	0	1*
				b	si	1	0
4	4	0	LGC	a	no	9	9
				b	no	0	2*
				c	si	0	0
				d	si	0	0
5	0	4	LGC	a	no	0	1*
				b	si	0	0
				c	si	0	0
6	0	2	LGC	a	no	8	9
				b	si	0	0
7	2	1	LGC	a	si	0	0
				b	no	2	0
8	0	2	LGC	a	si	1	0
				b	no	0	1*
9	8	2	LGC	a	si	0	0
10	3	0	LGC	a	si	0	0
11	4	1	LGC	a	si	0	0
12	0	2	LGC	a	si	1	0
13	0	0	LGC	a	si	0	0
				b	si	0	0
				c	si	0	0
				d	si	0	0
14	0	8	LGC	a	si	0	0
15	0	17	LGA	a	no	2	18*
16	0	6	LGA	a	no	4	3
				b	si	0	0
17	0	4	LGA	a	no	2	3
18	5	0	LLC	a	no	0	2*
19	0	0	LLC	a	si	0	0
20	0	10	LALB	a	si	1	0

21	0	17	LALB	a	si	0	0
				b	si	0	0
				c	si	0	0
22	0	2	LALB	a	si	0	0
				b	no	1	0
				c	no	5	3
23	0	0	LALB	a	si	0	0
24	0	6	LALB	a	si	0	0
				b	si	0	0
25	4	0	LALB	a	no	0	1*
				b	no	1	1
26	0	0	LALB	a	si	1	1
				b	si	0	0
27	0	11	LMMB	a	si	0	0
				b	no	2	1
				c	si	0	0
				d	no	0	2

LGC:leucemia granulocítica crónica.LGA: Leucemia granulocítica aguda. LLC.leucemia linfocítica crónica. LALB:leucemia aguda linfoblástica. LMMB: Leucemia mielomonoblástica.

V. DISCUSSION.

La primera observación en este trabajo consistió en que los leucocitos fetales son aglutinables por la Con. A, pero se pensó que si estos contienen ACE, podrían ser detectados tal vez de manera mas específica por los anticuerpos que los pacientes leucémicos producen contra sus leucoblastos, -- en las fases de actividad neoplásica,⁷⁰ obteniéndose resultados positivos por ambos métodos.

Con el objeto de no desvirtuar los resultados de -- las pruebas de MCT, los sueros de los pacientes leucémicos -- fueron probados desconociéndose el diagnóstico, si se encontraban o no en tratamiento, en remisión, agudización o recurrencia del padecimiento. Estos datos se conocieron hasta el -- final del estudio, consultando los expedientes clínicos de -- los casos, sin saber a qué pacientes correspondían los sueros que habían dado pruebas positivas.

En diez testigos paralelos a las pruebas experimentales de MCT, el suero de conejo que se usa como fuente de -- complemento fué sustituido por suero autólogo. Todas estas -- reacciones resultaron negativas, mientras que con el empleo -- de complemento heterólogo siempre se obtuvieron reacciones -- positivas con los sueros de pacientes leucémicos que no se -- encontraban controlados con la terapéutica empleada. Esto permite excluir la posibilidad de que las pruebas de MCT positivas fueran debidas a la presencia de algún medicamento leucocitotóxico en el suero del paciente. Asi mismo, confirma un -- estudio previo⁷⁰ en el que se encontró que este tipo de reacción requiere suero de conejo como fuente de complemento.

El hallazgo de anticuerpos contra antígenos de histocompatibilidad normales (HL-A) en múltiparas y pacientes po^litransfundidos, en un hecho conocido desde hace varios años.
74, 85-86.

Sin embargo, llama la atención que tanto este tipo de anticuerpos como los anti-ACE hayan desaparecido en el suero de la mayor parte de los pacientes en que se había logrado una respuesta favorable al tratamiento, el cual tiene un efecto inmúnopresor asociado.⁸⁷⁻⁹⁰

Se ha encontrado que los anticuerpos presentes en el suero de pacientes fuertemente inmunizados a antígenos del sistema HL-A por medio de la aplicación de injertos cutáneos, no dan pruebas de MCT positivas al probarse contra los granulocitos de los donadores específicos de los injertos,⁴¹ por lo que se ha concluido que este tipo de células no contienen la suficiente cantidad de antígenos HL-A para fijar la cantidad necesaria de anticuerpo y complemento que se requiere en la reacción de citotoxicidad. Por tal motivo, se considera que las pruebas de MCT positivas que se obtuvieron al probar los sueros de pacientes leucémicos contra leucocitos fetales detectan realmente ACE que se encuentra presentes tanto en ellos como en los leucoblastos leucémicos.

Se cultivaron los leucocitos y leucoblastos de seis pacientes leucémicos (5 con leucemia granulocítica crónica y 1 con leucemia aguda linfoblástica) como en un estudio anterior.⁷⁰ Las células que se obtuvieron fueron llevadas en 60 volúmenes de medio de cultivo y probadas por la técnica de MCT con los sueros de pacientes leucémicos y de adultos normales, obteniéndose resultados positivos solamente con los sueros de pacientes leucémicos no controlados lo cual permitió confirmar que en los sueros de los leucémicos no controlados existen anticuerpos anti-leucoblastos, como ya se había demostrado en un estudio previo.⁷⁰

Es de hacer notar que los sueros de los pacientes - leucémicos no controlados, no siempre dieron pruebas de MCT positivas contra los leucocitos de todos los recién nacidos. Posiblemente esto sea debido a la mayor especificidad inherente a la reacción antígeno-anticuerpo. Otros medios de detección como la aglutinación de las células por la Con A pueden proporcionar información adicional a este respecto, si se toman en consideración los siguientes hechos:

La Con A es una proteína de origen vegetal de propiedades fisicoquímicas y estructurales definidas.⁹²⁻⁹⁴ Se combina en forma divalente, a manera de anticuerpo,⁹⁵ con un número restringido de polisacáridos ramificados o glucoproteínas que los contengan.⁹⁶ Es complementaria para residuos terminales de metil-alfa-D-manopiranososa y en forma menos específica para la metil-D-glucopiranososa y beta-D-fructofuranosa⁹⁶⁻⁹⁸. Tiene afinidad especial por los radicales oxhidrilo de dichas hexosas en posiciones C₁, C₂, C₃, C₄, C₆ y un hidrógeno de este último forma un puente con ella.⁹⁶⁻⁹⁸ La Con A - se combina con las células neoplásicas interactuando con estos grupos químicos localizandos en las glucoproteínas de su superficie. Las células normales presentan sitios de combinación para la Con A en algunas especies animales,¹⁰⁵ pero las células nucleadas solo lo hacen por períodos breves durante la mitosis.¹⁰¹

Por otra parte se ha encontrado que la Con A se une tanto a las células normales como transformadas a neoplásicas; pero que únicamente aglutina a estas últimas,¹⁰⁶ lo cual se ha explicado en base a la diferente distribución que adopta la Con A sobre la superficie de ambos tipos de células.¹⁰⁷

Otros autores han informado que la diferencia en aglutinabilidad entre las células normales y las malignas se explica porqué éstas fijan de 6 a 7 veces más Con A por micra cuadrada de superficie celular.⁸⁴ Sin embargo, el tratamiento proteolítico ligero de las células normales con tripsina revela hasta un 85% de los sitios crípticos de combinación con la Con A que presentan las células neoplásicas. Por ello se deduce que la mayor susceptibilidad de las células malignas a la aglutinación se debe a que éstas presentan espontáneamente un mayor número de sitios de combinación expuestos.⁸⁴ La aparición de ellos en las células malignas, se ha correlacionado con la pérdida de la inhibición del crecimiento al contacto in Vitro.^{102, 108-110} la cual a su vez es una característica de las células neoplásicas,¹¹¹ de su capacidad oncogénica in vivo¹¹²⁻¹¹⁴ y una mayor movilidad electroforética atribuible a incremento en el contenido de ácido siálico¹¹⁴ en las glucoproteínas de la superficie celular.¹¹⁵

Las células del tumor de Burkitt humano también presentan una capa de glucoproteínas con las cuales se combina la Con A.¹¹⁶ Los anticuerpos contra las células de este tumor dan pruebas de MCT positivas contra leucoblastos de pacientes leucémicos, sin correlación con los antígenos del sistema HL-A, o sea que reaccionan con los ANE de las células leucémicas.¹¹⁷ Lo interesante de este hecho es que los antígenos glucoprotéicos detectables por la Con A en las células del tumor de Burkitt aparentemente es el mismo que el que se encuentra en las células leucémicas cuando se las investiga de manera más específica con un suero inmune y que guarda relación con el presente trabajo por el hecho de haberse encontrado en los sueros de leucémicos anticuerpos que reaccionan con los -

leucocitos fetales, los cuales son a su vez aglutinables por la Con A.

Existen otras alutininas vegetales, dentro de las cuales la del germen de trigo, que ha sido utilizado para la identificación de células malignas transformadas por virus oncogénicos,¹¹⁸ pero cuando ha sido usada con células leucémicas humanas, la propiedad alutinante se ha correlacionado más bien con el porcentaje de granulocitos en la muestra que con su acción directa sobre las células malignas,¹¹⁹ por lo cual resultó más conveniente el uso de la Con A en el presente trabajo, en el que no encontramos ese inconveniente.

La Con A también ha sido empleada para detectar los ANE glucoprotéicos de la leucemias experimentales.⁹⁹⁻¹⁰⁰

Sin embargo, dado que dicha proteína, si bien es -- específica para los radicales químicos con los que interactúa, no puede ser considerada un agente de reconocimiento específico de los ANE o de los ACE salvo de manera presuntiva, pues la Con A puede combinarse con toda una serie de proteínas séricas normales y patológicas que harían dudosa la interpretación de los resultados,^{120,124} además de que la transformación maligna in vitro de las células por virus oncogénicos que contiene RNA y no DNA,¹²⁵ no siempre se acompaña de aglutinabilidad por la Con A.¹²⁵ Las células malignas espontáneas y las experimentalmente transformadas por virus oncogénicos^{101,126,127} al -- parecer son aglutinadas por la Con A de una manera inespecífica por la neutralización de cargas electrostáticas negativas -- de la superficie celular, ya que también puede llevarse a cabo por medio de copolímeros de aminoácidos

básicos que son portadores en su molécula de cargas eléctricas positivas a pHs fisiológicos.¹²⁸

También pareció interesante estudiar en el presente trabajo si las células fetales son portadores de una capa de glucoproteínas que según se mencionó anteriormente, las protegería contra el daño inmunológico al que potencialmente están expuestas. Si a su vez esta capa de glucoproteínas se encuentra presente en los leucoblastos leucémicos, esto sería una indicación de que durante la transformación maligna de los leucocitos humanos, como ocurre espontáneamente en la leucemia, se lleva a cabo un fenómeno de retrogresión antigénica de las células normales de los adultos a los correspondiente a la etapa fetal.

Por lo que toca a los ANE o ACE que se pueden detectar en las células leucémicas y que al parecer son comunes con los antígenos de superficie de los leucocitos de recién nacidos, se ha informado que los ANE de los leucoblastos pueden ser diferentes en distintos tipos de leucemias,¹²⁹ lo que explicaría porqué los sueros de los pacientes leucémicos no controlados que se emplearon en el presente trabajo no dieron pruebas de MCT positivas con los leucocitos de todos los recién nacidos.

Posiblemente el antecedente más antiguo acerca de los ACE fue la demostración en 1966 de que las células embrionarias de aves tienen un antígeno que es un componente normal de ellas y que luego aparece en las células transformadas por los virus de las leucosis.¹³⁰

La hemopoyesis en embriones y fetos humanos conduce a la producción de leucocitos que morfológica^{131, 132} e histológicamente¹³³ semejan a los leucoblastos leucémicos. Por

ello, resulta menos extraño el que los leucocitos de recién nacidos sean portadores de ACE. Estos podrían explicar en los casos de cancer y leucemias porqué la respuesta inmune puede resultar ineficaz en llevar a cabo el rechazo de las células malignas,¹³⁴⁻¹³⁵ o que definitivamente actué protegiendo o - estimulando el crecimiento neoplásico.^{10,136.}

En los últimos años se han identificado diversas - glucoproteínas en tumores humanos, o circulando en la sangre, lo cual ha estimulado la investigación tendiente a desarrollar métodos para la detección oportuna del cáncer.¹³⁷⁻¹⁴⁴ Paralelamente, esto ha abierto la posibilidad de tener un mejor conocimiento acerca de su etiología, en la cual muy probablemente está involucrado el fenómeno de retrogresión antigénica ya mencionada y que se puede atribuir a su vez a la de-represión de los genes que regulan la síntesis de glucoproteínas en las células neoplásicas por la acción de algún agente oncogénico.¹⁴⁵

Dentro de los agentes oncogénicos, los candidatos - más fuertemente implicados son los virus. En el linfoma de -- Burkitt esta suposición parece estar confirmada.¹⁴⁶ Se han - encontrado anticuerpos contra antígenos de las células de este tumor en individuos sanos que habitan las zonas endémicas u - otras donde el tumor no es frecuente. Evidencia semejante se - tiene en relación con las personas que conviven con pacientes con sarcoma osteogénico, las cuales con una frecuencia del 57% dan pruebas de MCT positivas contra las células cultivadas - in vitro de esta neoplasia, mientras que el porcentaje observado en individuos de la población general es sólo del 3%. Ya se ha mencionado anteriormente que los sueros de pacientes - leucémicos dan pruebas de MCT positivas contra células cultiva das del tumor de Burkitt. En leucemia, las fuertes evidencias que se tienen acerca de su etiología viral son:

En primer lugar el hecho de haberse observado en una niña la transformación maligna in vivo de los leucocitos normales que le habían sido transplantados, provenientes de la médula ósea de su hermano.¹⁴⁷ En segundo término, el haberse encontrado actividad de transcriptasa inversa en extractos de células leucémicas humanas.^{148.}

VI. CONCLUSIONES.

Por la prueba de aglutinación con Con A. puede presumirse que los leucocitos fetales contienen antígenos comunes con los de las células malignas.

Por la prueba de microcitotoxicidad puede concluirse que en los sueros de los pacientes leucémicos que no habían - recibido tratamiento, o eran resistentes al mismo, existen anticuerpos contra antígenos comunes entre leucocitos de recién nacidos y leucoblastos leucémicos.

De las dos conclusiones anteriores se puede deducir que los ANE de las células leucémicas y los ACE de los leucocitos de recién nacido, son semejantes estructuralmente y esto a su vez apoya la posibilidad de que en las leucemias se - lleva a cabo un fenómeno de retrogresión antigénica hacia las etapas embrionarias.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Citado por: Alexander, P. : 1972. Foetal "antigens" in cancer. Nature. 235: 137
- 2.- Abelev, G. I., S.D. Perova, N.I. Khramkova, Z. A. Postnikove, I.S. Irlin, : 1963. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas, Transplantation. 1: 174.
- 3.- Abelev, G. I. 1968. Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas: Review of experimental and clinical data. Cancer Res. 28: 1344.
- 4.- Gold P., S.O. Freedman, : 1965. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J. Exp. Med 122: 467.
- 5.- Gold, P. 1970. The role of immunology in human cancer - research. Canad, Med. Ass. J. 103: 1043
- 6.- Gold, P.: 1971. Embryonic origin of human tumor-specific antigens. Progr. Exp. Tumor Res. 14: 43.
- 7.- Burgen, M.M.: 1969. A difference in the architecture - of the surface membrane of normal and virally transformed cells Proc. Nat. Acad. Sci. 62: 994.
- 8.- Sarma, P. S., R. Huebner.: 1965. Presence of avian tumor virus group-specific antigen in nonproducing Rous-sarcoma cells of the chicken, Virology. 27: 233-236.
- 9.- Pearson, G., G. Freeman.: 1968. Evidence suggesting a - relationship between polyoma virus-induced transplantation antigen and normal embryonic antigen. Cancer Res. 28: 1665-1673.

- 10.- Kaliss, N., B.F. Bryant.: 1958. Factors determining homograft destruction and immunological enhancement in mice receiving successive inocula, J. Nat. Cancer. Inst. - 20: 691-
- 11.- Cornack, D.: 1970. Effect of enzymatic removal of the cell surface sialic acid on the adherence of Walker 256 tumor cells to mesothelial membrane. Cancer Res. 30: 1459.
- 12.- Kissmeyer-Nielsen, F., E. Thorsby.: 1970. Leukocyte antigens. En: Human Transplantation Antigens. Transplantation Review. 4: 17.
- 13.- Thomas, D. B.: 1968. Presence of glycopeptide material in cultured mouse mast-cell tumors. Biochem. J. 109: -- 79-86.
- 14.- Harris, R. J. C., H. Malmgren, B. Sylven.: 1954. The polysaccharides of Rous sarcoma No. 1. Brit. J. Cancer. - 8: 141.
- 15.- Warren, G. H., E.C. Williams, H.E. Alburn., J. Seifter: 1949. Rous chicken sarcoma as a source of hyaluronic acid. Arch. Biochem. 20: 300-304.
- 16.- Forrester, J. A., E. J. Ambrose, I. Mac Pherson.: 1962. Electrophoretic investigations of a clone of hamster -- fibroblasts and polyoma-transformed cells from the same population. Nature. 196: 1068-70.
- 17.- Franks, L. M., J.D. O'Shea, A.E.R. Thomson, : 1964. Mucin in the prostate: A histochemical study in normal glands, latent, clinical, and colloid cancer. Cancer. - 17: 983-91.

- 18.- Grishman, E.: 1952. Histochemical analysis of mucopolysaccharides occurring in mucus-producing tumors. *Cancer*. 5: 700-707.
- 19.- Ozzello, L., J.D. Speer.: 1958. The mucopolysaccharides in the normal and diseased breast. *Am. J. Pathol.* 34: - 993-1005.
- 20.- Winslow, D. F., J.M. Ensinger.: 1960. Hyaluronidase-sensitive acid mucopolysaccharides in lipo-sarcomas. *Amer. J. Pathol.* 37: 497-505.
- 21.- Abramowski, H., H. Jaugregui, W. Bradford.: 1972. Ultrastructural quantification of the Hale reactivity of HL-A cell surfaces. *Am. J. Pathol.* 66: 97a.
- 22.- Hakamori, S. I., R.W. Jeanloz.: 1964. Isolation of a -- glycolipid containing fucose, galactose, glucose and - glucosamine from human cancerous tissues. *J. Biol. Chem.* 239: 3606-3607.
- 23.- Hakamori, S. I., J. Koscielak, K.J. Bock, R.W. Jeanloz. 1967. Immunologic relationship between blood groups substances and fucose-containing glycolipid of human adenocarcinoma. *J. Immunol.* 98: 31.
- 24.- Hodson, J. J., R. Prout.: 1968. Chemical and histochemical characterization of mucopolysaccharides in a jaw myxoma. *J. Clin.* 21: 582-589.
- 25.- Rambourg, A., C.P. Leblond.: 1967. Electron microscope observation on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J. Cell. Biol.* 32: 27-53.
- 26.- Kalchar, H. M.,: 1965. Galactose metabolism and cell - "sociology". *Science* 150: 305-313.

- 27.- Bosmann, H. B., A. Hagopian, E.H. Eylor.: 1968. Mem--
brane glycoprotein biosynthesis: Changes in levels of -
glycosyl transferases in fibroblasts transformed by on-
cogenic virus. J. Cell. Physiol. 72: 81-88.
- 28.- Bosmann, H. B., A. Hagopian, E.H. Eylor.: 1968. Glyco--
protein biosynthesis: The characterization of two glyco
protein: Fucosyl transferases in HeLa cells. Arch Bio--
chem, Biophys. 128: 470-481.
- 29.- Hagopian, A., H.B. Bosmann, E.H. Eylor.: 1968. Glycopro
tein biosynthesis: The localization of poly-peptidyl: -
N-acetylgalactosaminy, collagen: Glucosyl and glycopro
tein: Galactosyl transferase in HeLa cell membrane frac
tions. Arch. Biochem. Biophys. 128: 387-396.
- 30.- Frot-Coutaz, J., P. Louisot, R. Got, L. Colobert.: 1968.
Subcellular incorporation sites of L-fucose- ^{14}C into -
glycoproteins of normal and cancerous cells in vitro -
cultures. Esperientia 24: 1206-1207.
- 31.- Bosmann, H. B., A. Hagopian, E. H. Eylor.: 1969. Cellu-
lar membranes: The biosynthesis of glucoprotein and - -
glycolipid in HeLa cell membranes. Arch. Biochem. Bio-
phys. 130: 573-583.
- 32.- Molnar, J., H. Chao, G. Markovic.: 1969. Subcellular -
site of structural glycoprotein synthesis in Ehrlich --
ascites tumor. Arch. Biochem. Biophys. 134: 533-538.
- 33.- Donovan, G., I. Popp, L. Roventa, D. Dumitrescu, G. Bo-
tez.: 1968. Serum proteins, glycoproteins, and specific
and non-specific antigens in hamsters bearing allogeneic
(H₁₀) and xenogeneic (Jensen) tumor grafts. Neoplasma.
15: 117-137.

- 34.- Goldenberg, D. M., H. J. Hansen,: 1972. Carcinoembryonic antigen present in human colonic neoplasms serially propagated in hasters, *Science*. 175: 1117-
- 35.- Yoshizaki, H., K. Hunziker, K. Schmid.: 1969. Constancy of the types of alpha₁ acid glycoprotein variants with uterectomy and irradiation. *Clin, Chem. Acta*. 23: - - 147-151.
- 36.- Yoshisaki, H., K. Hunziker, K. Schmid.: 1970. The constancy of the types of alpha₁-acid glycoprotein variants in patients with uterectomy and irradiation. *Clin. Chim Acta* 24: 94.
- 37.- Snyder, S., G. Ashwell.: 1971. Quantitation of specific serum glycoproteins in malignancy, *Clin. Chim. Acta*. 34: 449-455.
- 38.- Tokita, K., K. Scmid.: 1967. The alpha₁-acid glycoprotein variants of certain cancer patients, *Clin. Chim. - Acta* 17: 39-45
- 39.- Silischeva, N. N.: 1967. Blood serum glycoproteins in children with leukemia, *Pediatrics* 46: 73-76.
- 40.- Baranska, W., P. Koldovsky, H. Koprowsky.: 1970. Antigenic study of unfertilized mouse eggs: Cross reactivity with SV 40-induced antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 67: 193-199.
- 41.- Currie, G. A.,: 1967. Immunological studies of trophoblast in vitro. *J. Obst. Gynaec. Brit. Cwlth.* 74: 841-45.
- 42.- Loke, Y. W., V. C. Joysey, R. Borland.: 1971. HL-A antigens of human trophoblast cells. *Nature* 232: 403-404.

- 43.- Hamilton, W. J., J. D. Boyd.: 1966. Specialization of the syncytium of the human chorion. Brit. Med. J. 1: 1501-1506.
- 44.- Wynn, R. M.: 1967. Fetomaternal cellular relations in the human basal plate: An structural study of the placenta. Am. J. Obst. Gynecol. 97: 832-850.
- 45.- Tighe, J. R., P.R. Garrod, R. C. Curran,: 1967. The trophoblast of the human chorionic villus. J. Pathol. - Bact. 93: 559-567.
- 46.- Mansfield, R. E., M. R. Shetlar.: 1963. Serum glycoprotein changes in preynancy, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 112: 891-894.
- 47.- Mendenhall, H. W.: 1971. Serum alpha₁-acid glycoprotein concentration in pregnancy and with oral contraception. Am. J. Obst. Gynecol. 110: 924-925.
- 48.- Bardawil, W. A., B. L. Toy, : 1959. The natural history of choriocarcinoma: Problems of immunity and spontaneous regression, Am. N. Y. Acad. Sci. 80: 197-261.
- 49.- Douglas, G. W., L. Thomas, M. Carr, N.M. Cullen, R. Morris.: 1959. Thophoblast in the circulation blood during pregnancy. Am. J. Obst. Gynec. 78: 960-973.
- 50.- Attwood, H. D., W. W. Park.: 1961. Embolism to the lungs by trophoblast, J. Obst. & Gynecol. Brit. Cmwlth. 68: - 611-617.
- 51.- Billington, W. D.: 1966. Vascular migration of transplan ted trophoblast in the golden hamster. Nature 211:998-99.
- 52.- Hulka, J. I., K. C. Hsu, S. M. Beiser.: 1961. Antibodies to trophoblasts during the post-partum period. Nature - 191: 510,

- 53.- Hulka, J. I., V. Brinton, J. Scaar, C. Baney.: 1963. Appearance of antibodies to trophoblast during the - post-partum period in normal human pregnancies. *Nature*. 198: 501-502.
- 54.- Kirby, D.R.S., W.D. Billington, D.A. James.: 1966. Transplantation of eggs to the kidney and uterus of immunized mice. *Transplantation* 4: 713-718.
- 55.- Currie, G. A.: 1967. Immunological studies of trophoblast in vitro. *J. Obst. Gynaec. Brit. Cwlth.* 74: 841-48.
- 56.- Kirby, D.R.S.: 1962. Reciprocal transplantation of blastocysts between rats and mice. *Nature* 194: 785-786.
- 57.- Seigler, H. I., R. S. Metzgar.: 1970. Embryonic development of human transplantation antigens. *Transplantation* 9: 478-486.
- 58.- Gasic, G. J., T.B. Gasic.: 1970. Total suppressions of pregnancy in mice by post-ovital administration of neuraminidase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 67: 793-798.
- 59.- Sanford, B.: 1967. An alteration in tumor histocompatibility induced by neuraminidase. *Transplantation*. 5: - 1273-1279.
- 60.- Currie, G. A.: 1967. Masking of antigens on the Landschütz ascites tumor. *Lancet* 11: 1336-1138.
- 61.- Currie, G. A., D.K. Bagshawe.: 1968. The role of sialic acid in antigenic expression: Further studies of the - Landschütz ascites tumor. *Brit. J. Cancer* 22: 843-853.
- 62.- Currie, G. A., Bagshawe, K. D.: 1969. Tumor specific - immunogenicity of methylcholantrene-induced sarcoma cells after incubation in neuraminidase. *Brit, J. Cancer* 23: 141-149.

- 63.- Simmons, R. L., A. Rios., G. Lundgren, P. K. Ray, C.I. Mc Khann, G. R. Haywood.: 1971. Immunospecific regression of methylcholanthrene fibrosarcoma with the use of neuraminidase. *Surgery* 70: 38.
- 64.- Gasic, G., T. Gasic.: 1962. Removal and regeneration of the cell coating in tumor cells. *Nature* 196: 170.
- 65.- Bagshawe, K. D., G. A. Currie.: 1968. Immunogenicity of L 1210 murine leukemia cells after treatment with neuraminidase. *Nature* 218: 1254-1255
- 66.- Bekesi, J. G., G. St-Arneault, J. F. Holland.: 1971. Increase of leukemia L 1210 immunogenicity by Vibrio cholerae neuraminidase treatment. *Cancer Res.* 31: 2130-2132.
- 67.- Hellström, K. E., I. Hellström, J. Brawn.: 1969. Abrogation of cellular immunity to antigenically foreign mouse embryonic cells by a serum factor. *Nature* 224: 914-15.
- 68.- Kirby, D.R.S.: 1968. The immunological consequences of extrauterine development of allogenic mouse blastocysts Transplantation 6/9: 1005-1009.
- 69.- Troup, G. M., R. L. Walford.: 1965. Differential effect of cytotoxic isoantibody on benign and malignant cells in human serous fluids. *Cancer* 18: 1079-1084.
- 70.- Gómez, E. H., P. E. Arechavala, B. J. Arellano, Ch. A. Isaassi, Q. P. Fernández, P. A. Luján.: 1971. Anticuerpos a células leucémicas. *Patología.* 9: 195-
- 71.- Broder, S., J. Whitehouse.: 1968. Immunologic enhancement of tumor xenografts by pepsin-degraded immunoglobulin. *Science* 162: 1494-1495.

- 72.- Prehn, R. T.: 1972. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science*. 176: 170.
- 73.- Currie, G.A.: 1970. The conceptus as an allograft: Immunological reactivity of the mother. *Proc. Roy. Soc. Med.* 63: 61-64.
- 74.- Gitlin, D., J. Kumate., J. Urusti, C. Morales.: 1964. Selective and directional transfer of 7 S Gamma₂globulin across the human placenta. *Nature* 203: 86-87.
- 75.- Kumate, J., E. H. Gómez, L. C. Morales.: 1965. Transporte de proteínas a través de membranas corio-amnióticas. III Simposio Panamericano de Farmacología y Terapéutica Excerpta Medica Found. Int. Congr. Ser. 127: 29-31.
- 76.- Morphis, L. G., D. Gitlin.: 1970. Maturation of the maternal-fetal transport system for human gamma-globulin in the mouse. *Nature* 228: 573.
- 77.- Gitlin, D., M. Boesman.: 1966. Serum alpha-fetoprotein, albumin, and gamma G-globulin in the human conceptus. - *J. Clin. Invest.* 45: 1826-1858.
- 78.- Lamman, J. T., L. Herod.: 1965. Homograft immunity in pregnancy. The placental passage of cytotoxic antibody in rabbits. *J. Exp. Med.* 122: 579.
- 79.- Payne, R., M. R. Rolfs.: 1958. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J. Clin. Inv.* 37: 1756-1763.
- 80.- Desai, R. G., W. P. Creger.: 1963. Maternal-fetal passage of leukocytes and platelets in man. *Blood* 21: 665-673.
- 81.- Kadowaki, J. I., R. I. Thompson, W. W. Zeulzer, P. V. - Wooley, A. J. Brough, D. Gruber.: 1965. XX/XY lymphoid chimaerism in congenital immunological deficiency syndrome with thymic aplasia. *Lancet* 2: 1152.

- 82.- Wallach, D. F.H.: 1968. Cellular membranes and tumor - behavior: A new Hypothesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 61: 868.
- 83.- Currie G., K. Bagshawe.: 1967. The masking of antigens on trophoblast and cancer cells. Lancet 1: 708.
- 84.- Inbar, M., L. Sachs.: 1969. Structural difference in - sites on the surface membrane of normal and transformed cells. Nature 223: 710.
- 85.- Van Rood, J. J., J. G. Eernisse. A. Van Leeuwen. 1958. Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature 181: 1735-1736.
- 86.- Payne R.: 1957. Leukocyte agglutinins in human sera. Correlation between blood transfusions and their development. Arch. Int. Med. 99: 587.
- 87.- Schwartz, R. S.: 1957. Immunosuppressive drugs. Progr. - Allergy 9: 587.
- 88.- Schwartz, R. S.: 1967. Immunosuppressive therapy. The - relation between clinical response and immunological - competence. New Engl. J. Med. 277: 163.
- 89.- Schwartz, R. S.: 1968. Are immunosuppressive anticancer drugs selfdefeating? Cancer Res. 82: 1452.
- 90.- Makinodan, T., G. W. Santos, R. P. Quinn.: 1970. Immuno suppressive drugs. Pharmacol. Rev. 22: 189.
- 91.- Thorsby, E.: 1969. HL-A antigens on human granulocytes studied with cytotoxic iso-antisera obtained by skin - grafting. Scand. J. Heamat. 6: 119-127.

- 92.- Agrawal, B.B.L., I.J. Goldstein.: 1969. Physical and chemical characterization of concanavalin A, the hemagglutinin from jack bean (*Canavalia insiforma*) Biotera_ction of concanavalin A with igM and the glycoprotein - phytohemagglutinins of the waxbean and the soybean, J. Immunol. 103: 695.
- 93.- Hardman K. D., M. K. Wood., M. Shiffer et al: 1971. - Structure of concanavalin A at 4.25 Angstrom resolution Proc. Nat. Acad. Sci. 68: 1393-1397.
- 94.- Quioco, J. A. G. N. Reeke, J. W. Becker, W. N. Lipscomb G. M. Edelman.:1971. Structure of concanavalin A at 4 - Angstrom resolution. Proc. Nat. Acad.Sci. 68: 1853-1857
- 95.- Doyle, R. J. L. Cronholm.: 1969. A model of antigen-anti body system for classroom use. J.Chem. Educ. 46: 868-69
- 96.- So. L.L., I.J. Goldstein.: 1967. Protein-carbohydrate - interaction. IX. Application of quantitative hepten inhibition technique to polysaccharide concanavalin A inte_ration. Some comments on the forces involved in conca_vvalin A polysaccharide interaction . J. Immunol. 99:158.
- 97.- Goldstein, I. J., L.L. So, Y. Young, Q. C. Callies.: - 1967. Protein-carbohydrate interaction XIX. The inchem. Biophys. Acta. 133: 376.
- 98.- Poretz, R. D., I.J. Goldstein.: 1970. An examination of the topography of the saccharide binding sites of conca_vnavalin A and of the forces involved in complexation. - Biochemistry 9: 2890-2896.
- 99.- Burger. M.M., A. R. Goldberg.: 1967. Identifications of tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces. Proc. Nat. Acad. Sci. 57: 359

- 100.- Inbar, M., L. Sachs.: 1969. Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A. with normal - - and transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 63: 1418.
- 101.- Fox, T. O., J. R. Sheppard, M. M. Burger.: 1971. Cyclic membrane changes in animal cells: Transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis. Proc. Nat. Acad. Sci. - 68: 244.
- 102.- Burger, M. M.: 1969. Difference in the architecture of the surface membrana of normal and virally transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 62: 994.
- 103.- Moscona, A. C.: 1971. Embryonic and neoplastic cell surfaces. Availability of receptors for concanavalin A and wheat germ agglutinin. Science 171: 905.
- 104.- Warren, L., D. Critchley, I. Mac Pherson.: 1972. Surface glycoproteins and glycolipids of chicken embryo cells transformed by a temperature-sensitive mutant of Rous - sarcoma virus. Nature 235: 275-278.
- 105.- Edelman, G. M., U. Rutishauser., C. I. Millette.: 1971. Cell fractionation and arrangement on fibers, beads and surfaces. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68: 2153-2157.
- 106.- Cline, M. J., D. C. Livingston.: 1971. Binding of ^{3H}- concanavalin A by normal and transformed cells. Nature N. B. 232: 155-156.
- 107.- Nicolson, G. L.: 1971. Difference in topology of normal and tumor cell membranes shown by different surface distributions of ferritin-conjugated concanavalin A. Nature N. B. 233: 244-246.

- 108.- Pollack, R. E., M.M. Burger.: 1969. Surface-specific characteristics of a contact-inhibited cell line containing the SV 40 viral genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 62: 1074-1076.
- 109.- Inbar, M., Z. Rabinowitz, L. Sachs.: 1969. The formation of variants with a reversion of properties of transformed cells. III. Reversion of the structure of the cell surface membrane. Int. J. Cancer 4: 690-696.
- 110.- Sjögren, H. O., Hellström, I., G. Klein.: 1961. Resistance of polyoma virus immunized mice to transplantation of established polyoma tumors. Exptl. Cell Res. 23: 204-208.
- 111.- Todaro, G. J., K. Habel, H. Green.: 1965. Antigenic and cultural properties of cells doubly transformed by polyoma virus and SV 40. Virology 27: 179-185.
- 112.- Aaronson, S. A., Todaro, G. J.: 1968. Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. Science 162: 1024-1026
- 113.- Rabinowitz, Z., L. Sachs.: 1968. Reversion of properties in cells transformed by polyoma virus. Nature 220: 1203-1206.
- 114.- Forrester, J. A., E. J. Ambrose, J. A. Pherson.: 1962. Electrophoretic investigations of a clone of hamster fibroblasts and polyoma-transformed cells from the same population. Nature 196: 1068-1070°.

- 115.- Pollack, R. E., H. Green, G. J. Todaro.: 1968. Growth control in cultured cells: Selection of sublines with increased sensitivity to contact inhibition and decreased tumor-producing ability. Proc. Nat. Acad. Sci. 60: 126-133.
- 116.- Bernhard, W., S. Avrameas.: 1970. Ultrastructural visualization of cellular glycoproteins or glycolipids by means of concanavalin A. Exp. Cell Res. 64/1: 232-236.
- 117.- Mann, D. F., G. N. Rogentine, R. Halterman, B. Leventhal.: 1971. Detection of an antigen associated with acute leukemia. Science 174: 1136-1137.
- 118.- Benjamin, T. L. M. M. Burger.: 1970. Absence of a cell membrane alteration function in non-transforming mutants of polyoma virus. Proc. Nat. Acad. Sci. 67: 929-934.
- 119.- Aub, J. C., B. H. Sanford, L. H. Wang.: 1965. Reactions of normal and leukemic cell surfaces to wheat germ agglutinin. Proc. Nat. Acad. Sci. 54: 400-402.
- 120.- Harris H., E. B. Robson.: 1963. Precipitin reaction between extracts of seeds of *Canavalia ensiformis* (Jack bean) and normal and pathological serum proteins. Vox Sang. 8: 348.
- 121.- Leon, M. A.: 1967. Concanavalin A. reaction with human normal immunoglobulin G. and myeloma immunoglobulin G. Science 158: 1325.
- 122.- Yokohari, R., I. Jocius, M. A. Leon.: 1968. Reaction of concanavalin A with antibody and complement. Fed. Proc. 27: 314.

- 123.- Nordin, A. A. H. Cosenza, W. Hpkins.: 1969. The use - - of concanavalin A for distinguishing IgM from IgG antibody-producing cells. *J. Immunol.* 103: 859.
- 124.- Aspberg, K., Poroth J.: 1970. Group-specific adsorption of glycoproteins. *Acta Chem. Scand.* 24: 1839-1841.
- 125.- Moore, E. G., H. M. Temin.: 1971. Lack of correlation between conversion by RNA tumor viruses and increased agglutination of cells by concanavalin A and wheat germ - agglutinin. *Nature.* 231: 117.
- 126.- Coggin. J. H., K. R. Ambrose. N. G. Anderson.: 1970. - Fetal antigen capable of inducing transplantation immunity against SV 40 hamster tumor cells. *J. Immunol.* 105: 525.
- 127.- Ambrose, K. R., N. G. Anderson, J. H. Coggin.: 1971. Interruption of SV 40 oncogenesis with human fetal antigen. *Nature.* 233: 194.
- 128.- Duskin, D., E. Katchalski, L. Sachs.: 1972. Specific aggregation of SV 40-transformed cells by ornithine, leucine copolymers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 67: 185-192.
- 129.- De Carvahlo, S. Renerts. I.: 1960. Segregation of antigens from human leukemic and tumoral cells by fluorocarbon extraction. I. detection by a gel diffusion method. *J. Lab. Clin. Med.* 56: 333-341.
- 130.- Daugherty, R. M., H. S. Distefano.: 1966. Lack of relationship between infection with avian leukosin virus - and the presence of COFAL antigens in chick embryos. - *Virology* 29: 586-595.

- 131.- Thomas, D. B., J. M. Yoffey.: 1964. Human foetal haemopo_yesis. II Hepatic haemopoyesis in the human foetus. Brit J. Haematol. 10: 193.
- 132.- Playfair, J. H.L., M. R. Wolfendale, H.E.M. Kay.: 1963. The leukocytes of peripheral blood in the human foetus Brit. J. Haematol. 9: 336.
- 133.- Wolf, P. L., B. Silberberg., S. Albert, J. Horwitz, W.V. D. Muehl.: 1967. Histochemical similarities between - chem. Biophys. Acta. 133: 376 .
- 134.- Burnett, F. M.: 1967. Immunological aspects of malignan_t disease. Lancet 1: 1171.
- 135.- Alexander, P., Hamilton, F. G.: Cellular resistance to tumors. Brit. Med. Bull. 23: 86. 1967.
- 136.- Prehn, R. T.: 1972. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. Science. 176: 170°
- 137.- Gold, P., M. Gold. S. O. Freedman.: 1968. Cellular loca_tion of carcinoembryonic antigens of the human digesti_ve system. Cancer. Res. 28: 1331.
- 138.- Hakkinen, I., S. Viikari.: 1969. Occurrence of foetal - sulphoglycoprotein antigen in the gastric juice of patients with gastric diseases. Ann. Surg. 169: 277.
- 139.- Gold, P., J. Krupey, H. Ansari.: 1970. Position of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system in the ultrastructure of tumor cell surface. J. Nat. - Cancer Inst. 45: 219.