

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANTIGENOS TUMORALES

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

p r e s e n t a

LUZ MARIA LOPEZ DE LA ROSA

México, D. F., Septiembre de 1975



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

" Se impone para cada uno la aventura de vivir, porque vivir es aventura y esto vale tanto como decir que vivir es estar inmenso, lleno, pleno en la angustia de la responsabilidad y de las decisiones; vivir es deliberar constantemente, es en realidad una continua duda, un continuo decidir, una continua angustia".

Oriol Anguera.

Con profundo cariño a la memoria
de mi abuela LUISA

A mis padres.

Al Sr. Dr. Héctor Gómez Estrada en quien he encontrado un Maestro como científico y como ser humano.

Al M. en C Juan Luis Cifuentes Lemus por el continuo estímulo que me ha dado para mejorar mi preparación académica y científica.

Al Sr. Dr. Guillermo Romero Villaseñor quien me abrió las puertas hacia la investigación del cáncer y siempre me ha brindado sus orientaciones y su amistad.

Agradecimientos

Al Sr. Dr. Héctor Gómez Estrada, Jefe del Laboratorio de Inmunología del Departamento de Investigación Científica del I.M.S.S. por su valiosa asesoría, sus enseñanzas y su constante interés en la elaboración de esta tesis.

Al M. en C Jorge Arellano Blanco del Laboratorio de Inmunología por las enseñanzas, paciencia y estímulo que continuamente me brindó.

A todo el equipo humano del Laboratorio de Inmunología.

Al Sr. Dr. Guillermo Romero Villaseñor por sus valiosas orientaciones en la investigación del cáncer.

A los MVZ Alfredo Cortés Arcos y Eduardo Tena Betancout Jefes de Cirugía Experimental y del Bioterio 2 así como al personal de los mismos por su constante colaboración.

A la Q.B.P. Silvia Velázquez de Zamorano por sus enseñanzas en Citogenética.

A la Biol. Bertha Ortega Corona y Q.B.P. Martha Servín Martínez por sus enseñanzas y continuo estímulo.

A mis exalumnos y amigos por el gran estímulo, comprensión y ayuda que siempre me han brindado.

Finalmente, a los Señores profesores: Dra. Guillermina Yankelevich, Dr. Teófilo Herrera, Dr. Alfredo Barrera, Dra. Consuelo Savín, Dr. Jesús Manuel León Cázares, y Dr. Miguel Betancourt por la revisión crítica del manuscrito.

INDICE

I. INTRODUCCION.

- I.1 Antecedentes inmunológicos de la neoplasia.
- I.2 Antecedentes del Linfoma L5178Y.
- I.3 Hipótesis de trabajo.
- I.4 Los agentes utilizados para modificar los antígenos de membrana.
 - I.4.1 La neuraminidasa y otras enzimas.

II. MATERIAL Y METODOS.

- II.1 Ratones.
- II.2 Obtención de células tumorales L5178Y y transplante.
- ✓ II.3 Modificación de la antigenicidad de las células tumorales con diversos reactivos.
- II.4 Procedimiento de inmunización.
 - II.4.1 Inmunización con antígenos (células) modificadas.
 - II.4.2 Inmunización con líquido ascítico libre de células (antígenos solubles).
- II.5 Reto.
- II.6 Efecto " in vivo " de algunos de los agentes utilizados para modificar los antígenos membranales, sobre el crecimiento del linfoma L5178Y.
- II.7 Comprobación de la efectividad de la inmunización activa con células modificadas con neuraminidasa.

- II.7.1 Pruebas de microcitotoxicidad.
- II.7.2 Pruebas de linfocitotoxicidad.
- II.7.3 Inmunización adoptiva utilizando linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con células tratadas con neuraminidasa.
 - a. Obtención de linfocitos esplénicos.
 - b. Transferencia pasiva de inmunidad celular.

III. RESULTADOS.

- III.1 Sobrevida de ratones inmunizados activamente con células L5178Y modificadas con :
 - a. DTT; b. Glutaraldehido; c. Yodoacetamida;
 - d. Yoduro de potasio; e. 2-mercaptoetanol; f. mertiolate; g. urea; h. peryodato de sodio; i. papaína
 - j. papaína y EDTA; k. tripsina; l. tripsina y EDTA.
- III.1.1 Sobrevida de ratones inmunizados con células tratadas con neuraminidasa.
- III.2. Efecto " in vivo " sobre el crecimiento del linfoma L5178Y de: yodoacetamida, KI, ME, Mertiolato y NaIO_4 .
- III.3 Sobrevida de ratones inmunizados con antígenos solubles (líquido ascítico libre de células).
 - III.3.1 Inmunizados por vía IP y retados con células L5178Y intactas por vía IP.
- III.4 Comprobación de la efectividad de la inmunización activa y adoptiva con células L5178Y tratadas con neuraminidasa
 - III.4.1 Microcitotoxicidad.
 - III.4.2 Linfocitotoxicidad.
 - III.4.3 Sobrevida de ratones que recibieron inmunización adoptiva.

a. Ratones inmunizados adoptivamente por vía IP con linfocitos esplénicos con células L5178Y modificadas con neuraminidasa.

b. Ratones inmunizados adoptivamente por vía IP con linfocitos esplénicos de ratones portadores del tumor L5178Y subcutáneo.

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

V. RESUMEN.

VI. BIBLIOGRAFIA.

Esta Tesis se realizó gracias a la beca otorgada por la Comisión de Becas y por la Facultad de Ciencias de la UNAM en los Laboratorios de Inmunología y Biomembranas y Cáncer de la Jefatura de Investigación Científica del Centro Médico - Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS:

ANE. - Antígenos neoplasias específicos.

ACE. - Antígenos carcinoembrionarios.

AOF. - Antígenos oncofetales.

DTT. - Ditiotreitól.

EDTA. - Acido etilen diamino tetra-acético.

Glutar. - Glutaraldehido.

Yodac. - Yodacetamida.

KI. - Yoduro de potasio.

ME. - Mercaptoetanol.

Mert. - Mertiolate.

Neuram. - Neuraminidasa.

Na IO_4 . - Peryodato de sodio.

NANA. - Acido N-acetil neuramínico.

Pap. - Papaína.

Trip. - Tripsina.

IP. - Intraperitoneal.

SC. - Subcutánea.

INTRODUCCION

Las enfermedades neoplásicas ocupan el 5^o lugar como causa de mortalidad en la República Mexicana ¹. Dentro de ellas, la leucemia y los linfomas constituyen la segunda causa de letalidad ².

Los tratamientos quirúrgicos y de radioterapia para el tratamiento de las neoplasias son de utilidad limitada.

Los conceptos de antigenicidad asociada al tumor y de capacidad del huésped para producir una respuesta inmune efectiva subrayan a la teoría de la vigilancia inmunológica. De acuerdo a ésta, las células tumorales continuamente surgen en el organismo, pero en virtud de ser consideradas " extrañas " son eliminadas en forma eficiente por el sistema inmune. Sin embargo, un sistema tan complejo como éste, puede dejar de funcionar en formas muy variadas que conducen al mismo resultado: el escape de las células neoplásicas a la vigilancia del sistema inmune y a la aparición del cáncer.

Los procedimientos de inmunoterapia pretenden limitar o erradicar el crecimiento tumoral mediante la inducción en el organismo de una respuesta inmune de rechazo contra las células tumorales.

En virtud de que las células malignas poseen antígenos neoplasia-específicos (ANE) que no están presentes en los tejidos normales, son consideradas extrañas por el sistema inmune. Para efectos terapéuticos, la inmunogenicidad de los ANE debe ser aumentada mediante modificaciones químicas en su molécula. Esta modificación debe dar lugar a una respuesta inmune que por reacción cruzada de rechazo, afecte a las células tumorales intactas.

El objetivo del presente trabajo fué explorar diferentes métodos de modificación antigénica de los ANE de las células L5178Y, e inducir una respuesta inmune de rechazo antitumoral efectiva.

I. - Antecedentes inmunológicos en neoplasia:

Hace casi un siglo, Conhein ^{citado en 3}, tratando de explicar el origen de las neoplasias, [propuso que éstas se originaban por la proliferación de células embrionarias que habían quedado en reposo en los tejidos normales.] La proposición de Conhein, despertó gran interés en los investigadores por establecer una relación entre desarrollo embrionario y neoplasia.

Schöne, ^{citado en 3}, un investigador asociado a Ehrlich, informó en 1906 que los ratones, a los que se había inmunizado

con antígenos fetales de la misma especie, adquirirían la capacidad de rechazar trasplantes neoplásicos los cuales, cuando eran aplicados a ratones no inmunizados, eran aceptados y resultaban letales.

A partir de 1930, se ha informado que en las células de los tumores, existen antígenos semejantes a los que se encuentran en las células embrionarias y fetales. El estudio de estos antígenos es de gran valor en la investigación básica del cáncer.

Foley⁴ y Prehn⁵ demostraron que las células de las neoplasias transplantables, son portadoras de antígenos neoplasia específicos (ANE) en animales singénicos y que la inmunización contra ellas podía utilizarse para reducir el crecimiento tumoral inducido experimentalmente.

Se reportó posteriormente la existencia de ANE en neoplasia experimentales y humanas⁶⁻⁷, Coggin y asociados⁷ demostraron que las células fetales de ratón y hamster poseen el mismo tipo de antígeno que las células tumorales de la línea SV₄₀.

Las membranas y el glicocálix de las células tumorales, tienen ANE que no están presentes en las células de los tejidos normales^{4,10-11}. Las células neoplásicas liberan a los líquidos extracelulares parte de las glicoproteínas y glicopéptidos del glicocálix. Por otra parte, las células de los embriones así

como de los tejidos fetales de 2 a 6 meses, poseen en su membrana y en su glicocálix un grupo de sustancias de naturaleza glicoprotéica²⁴ con un determinante antigénico, a las cuales se denominó antígenos carcinoembrionarios u oncofetales (ACE, AOF)¹². Los ACE también pasan a los líquidos extracelulares¹²⁻¹³⁻¹⁴. Los ANE, ACE o AOF son sinónimos de antígenos tumorales.

Los cambios antigénicos en las células tumorales se deben a una expresión anormal de los genes, la cual ocurre ^{en cía.} concomitantemente a la transformación maligna y se acompaña de una regresión hacia el estado embrionario o fetal⁸⁻⁹. Por esta razón se considera a las células neoplásicas semejantes a las células embrionarias o fetales, que persisten en el organismo adulto durante el embarazo sin ser rechazadas^{6,15-16}.

Cuando se emplea una substancia carcinogénica para inducir la aparición de neoplasias en una serie de animales de la misma cepa, origina tumores que presentan ANE diferentes en cada animal y los anticuerpos contra dicho antígeno casi no dan reacción cruzada[?] entre ellos¹⁷. Esto indica que la naturaleza química de los ANE puede variar de individuo a individuo y que está condicionada por el portador de la neoplasia y no por el carcinogénico químico empleado¹⁰⁻¹⁸.

Por el contrario, cuando la transformación neoplásica es inducida por virus oncogénicos, las células malignas presentan ANE comunes entre los animales portadores del tumor y entre ellos existe amplia reactividad cruzada de los anticuerpos anti-ANE¹¹⁻¹⁸⁻¹⁹.

En las neoplasias espontáneas, en las cuales no se ha podido implicar una etiología química o viral, también existe reacción cruzada¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰⁻²¹.

El estudio de casos clínicos de neoplasias ya establecidas, comprueba que la respuesta inmune resulta ineficaz para llevar a cabo el rechazo del tumor. Se ha demostrado que un mecanismo paradójico denominado de "facilitación inmunológica" mediado por anticuerpos, favorece el crecimiento tumoral (Fig. 1)²²⁻²³.

Para hacer posible la inmunoterapia del cáncer, es conveniente que el organismo abandone el estado de facilitación inmunológica y desarrolle una respuesta inmune de rechazo hacia la neoplasia (Fig. 2). Para lograrlo, es necesario conocer las relaciones inmunológicas que existen entre las células tumorales y el portador de la neoplasia.

Los ANE, ACE o AOF tienen la propiedad de inducir la formación de anticuerpos de facilitación hacia ellos¹⁶, pudiendo

adicionalmente enmascarar los antígenos de histocompatibilidad normales ²⁴⁻²⁵⁻²⁶. Esto favorece la supervivencia y transpl
tibilidad de los tumores.

Cuando las células neoplásicas liberan a los líquidos extra-
celulares, parte de las glicoproteínas y glicopéptidos del glico-
cálix, estas se unen con sitios de reconocimiento y combina-
ción antigénica de las inmunoglobulinas y linfocitos. De esta
manera se lleva a cabo la inhibición aferente de la respuesta
inmune de rechazo. En el momento que los linfocitos llegan a
las proximidades de la célula tumoral, resultan bloqueados en
su sitio de combinación y por tanto anulados en su efecto cito-
tóxico contra la célula maligna. Por otra parte, las immuno-
globulinas forman complejos antígeno-anticuerpo solubles con
las glicoproteínas tumorales. De esta manera resulta bloquea-
da la posibilidad de combinación del anticuerpo con la célula
tumoral y así mismo, el posible efecto citopático subsecuente.

Los mecanismos inmunológicos que operan en el organis-
mo portador de una neoplasia y los que pone en juego la célula
tumoral son semejantes a los que ocurren durante el embarazo
entre las células embrionarias o fetales y el organismo mater-
no.

FIGURA 1 Esquema en el que se muestra que la célula tumoral libera a los líquidos extracelulares parte de las glicoproteínas antigénicas (ANE) constituyentes del glicocálix. Los ANE liberados se unen ya sea a los anticuerpos de rechazo (Ac. R) o a los anticuerpos de facilitación (AcF) formando complejos solubles. Los ANE solubles se unen también a los sitios de reconocimiento de los linfocitos y los anulan en su capacidad de enlazarse y desarrollar efecto citotóxico contra las células malignas.

MECANISMOS DE INHIBICION DE LA INMUNIDAD HUMORAL Y
CELULAR HACIA CELULAS NEOPLASICAS.

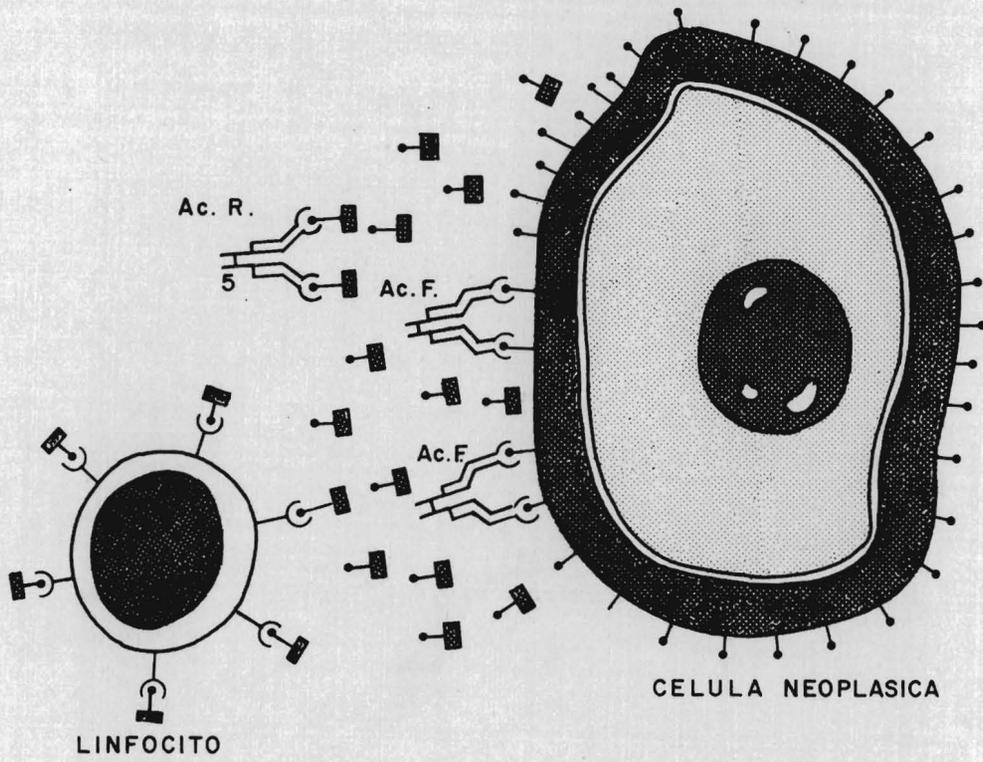
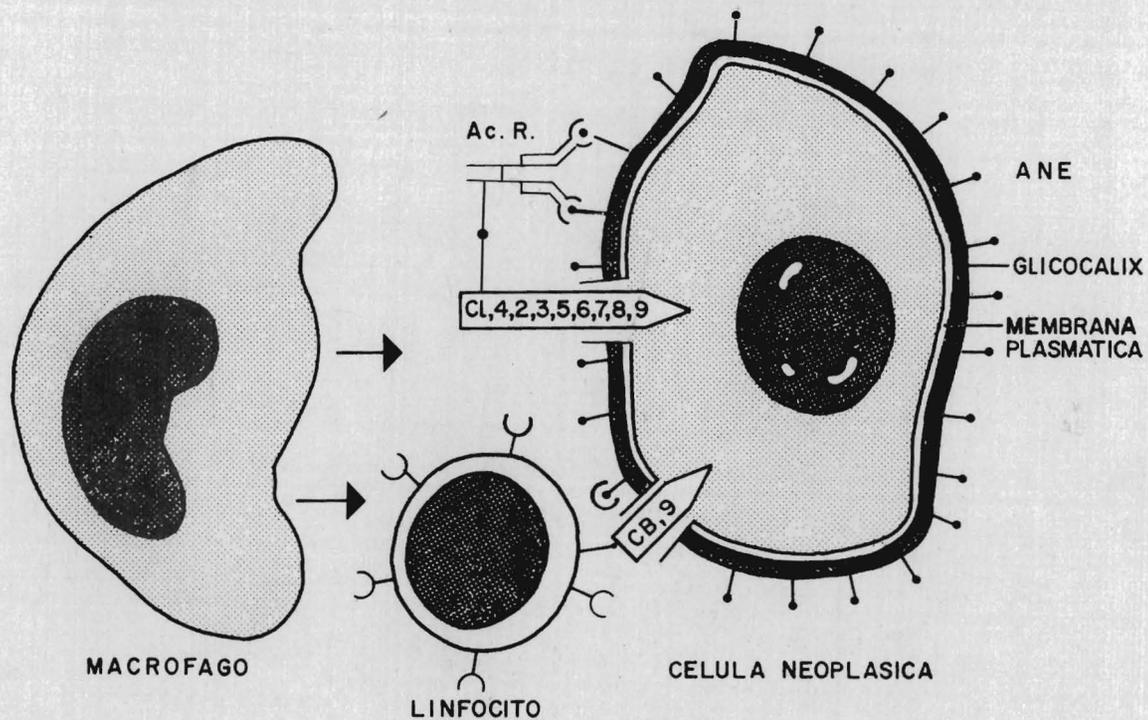


FIGURA 2 Esquema en el que se muestra el mecanismo de inmunidad humoral y celular hacia las células malignas. El organismo produce anticuerpos con capacidad de combinarse con los ANE sobre la superficie de la célula tumoral y activar al sistema de complemento C1, 4, 2, 3, 6, 7, 8, 9, el cual produce la lesión de la membrana que mata a la célula neoplásica. Por otra parte el linfocito se combina con los ANE de la superficie celular a través de sus sitios de reconocimiento antigénico y libera en contacto directo los componentes C8 y C9 del complemento que son citotóxicos por ruptura de la membrana celular.

INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR CONTRA CELULAS NEOPLASICAS.



I.2 Antecedentes del linfoma L5178Y

El presente trabajo se realizó con el linfoma L5178Y. Es te tumor se originó espontáneamente en 1956 como un linfoma de origen tímico de un ratón de la cepa DBA/2 en el laboratorio del Dr. Law y posteriormente Fisher lo estableció como cultivo in vitro²⁷. Desde entonces, las células neoplásicas también fueron inoculadas con éxito a la cavidad peritoneal de ratones singénicos y ha sido mantenida por trasplante seriado como un tumor intraperitoneal que crece en forma de suspensión celular en el líquido de ascitis que produce. Dicho tumor fué obtenido de la Universidad de Utah, Estados Unidos, por cortesía del Dr. Stevens. Fué importado a México por el Sr. Lonngi de la Sección de Biología Celular del Departamento de Investigación Científica del Centro Médico Nacional del IMSS y mantenido en esta durante tres años, de donde fué cedido al Laboratorio de Inmunología del mismo departamento. En aquella sección había sido mantenido en receptores singénicos de la cepa DBA/2 y se había observado que el tumor es perfectamente transplantable a ratones de la cepa BALB/2 compatibles en el locus H-2^d. En estos, la velocidad de crecimiento del tumor es similar que en la cepa de origen.

La transferencia de 8×10^7 células L5178Y a ratones adultos susceptibles por vía intraperitoneal, causa invariablemente



FIGURA 3 Ratón que recibió diez días antes 8×10^7 células L5178Y por vía IP. Se observa el crecimiento tumoral debido a la presencia de 8 a 10 ml de líquido ascítico en la cavidad intraperitoneal.

el desarrollo del tumor. Los receptores mueren a los 10 días post-transplante con 8 a 10 ml de líquido ascítico conteniendo 2.4×10^7 células malignas por ml. (Fig. 3).

1.3 Hipótesis de trabajo.

Como se mencionó anteriormente, los tumores son débilmente antigénicos y la respuesta inmune para rechazar al tumor resulta ineficaz. Las células tumorales, por diferentes mecanismos, escapan a la vigilancia inmunológica y la progresión del tumor se hace inevitable.

En este trabajo se pretende explorar algunos métodos químicos y enzimáticos para modificar a los ANE con el objeto de hacerlos más enérgicos para incrementar, de esta manera, la respuesta inmune natural de rechazo.

Se comprende que los cambios químicos producidos a dichos antígenos deben ser de tal magnitud que: 1o. produzcan una respuesta inmune enérgica y 2o. que esa respuesta vaya dirigida también contra los ANE originales, con el consecuente rechazo inmunológico del tumor.

Las células tumorales del tumor experimental L5178Y una vez modificadas por ciertos agentes químicos o por efecto de enzimas hidrolíticas, se introducen muertas en los ratones re-

ceptores para despertar la respuesta inmune, posteriormente se someten esos ratones inmunizados al reto de células tumorales vivas y se compara la sobrevivencia de estos ratones con los controles pertinentes. Se estudia también, como un control adicional, el efecto solo de los agentes modificadores.

I. 4 Antecedentes de las sustancias empleadas para modificar los antígenos de las células L5178Y:

El DTT y el mercaptoetanol son reactivos que causan la reducción de los puentes disulfuro intra e intercatenarios de las cadenas polipeptídicas de las proteínas, con lo cual se produce una alteración en la estructura terciaria o de mayor orden de las proteínas²⁸. Era de esperarse que un cambio de esta naturaleza en los antígenos de las células tumorales L5178Y diera lugar al descubrimiento de nuevos sitios antigénicos.

El glutaraldehído es una sustancia que produce el aumento de la rigidez de las moléculas de antígenos por entrecruzamientos de los enlaces que se establecen entre los grupos NH_2 de las proteínas y este reactivo²⁹. El tratamiento en esta forma de algunos antígenos ha dado lugar a la polimerización y aumento de la inmunogenicidad sin pérdida de los determinantes químicos originales de los antígenos³⁰. Es posible que tuviera este efecto en los antígenos de las células L5178Y

La yodacetamida es un compuesto que tiene la propiedad de combinarse con los grupos SH de las proteínas³¹. Al emplearse para tratar a las células L5178Y podría modificar la inmunogenicidad de los ANE.

Se ha informado que el yoduro de potasio a una concentración de 0.4 M tiene la propiedad de solubilizar y desnudar el glicocálix de las células³². Era de esperarse que al quitar el glicocálix de las células L5178Y se modificara su antigenicidad.

Los compuestos mercuriales tienen la propiedad de reaccionar con los grupos S-H o S-S de las proteínas, modificando la estructura terciaria o de otro orden de éstas y en ocasiones liberando de ellas algunos péptidos³³. Es posible que al emplearse mertiolate para modificar a las células L5178Y pudieran interactuar con las glicoproteínas de éstas y aumentar su inmunogenicidad.

La urea a concentraciones de 200 mM simula la acción proteolítica de la tripsina sobre las células tumorales³⁷, por lo que era de esperarse que la urea modificara el glicocálix de las células tumorales L5178Y.

El peryodato de sodio, al parecer actúa sobre una glicoproteína con ácido siálico, que al oxidarse origina un grupo

aldehídico esencial para la transformación. Se ha reportado que la modificación de las glicoproteínas de los linfocitos autólogos con este reactivo, es capaz de aumentar su poder inmunogénico³⁸. Posiblemente al modificar las células del linfoma murino L5178Y con peryodato de sodio, se aumente su poder inmunogénico.

I. 4-1 Antecedentes de Neuraminidasa y otras enzimas:

La enzima neuraminidasa que se obtiene del Vibrio cholerae modifica las glicoproteínas de la membrana al romper las uniones de tipo alfa-cetosídico que forman una cadena lateral de disacáridos³⁴. Esto permite obtener antígenos capaces de inducir una respuesta inmune de rechazo hacia las células de neoplasias experimentales; cuando se inmunizó a ratas con células de hepatoma de Novikoff tratadas con Neuraminidasa, mostraron resistencia específica al reto con células del mismo tumor, no tratadas con esta enzima. En fibrosarcomas inducidos con metil-colantreno en ratones, se observó que cuando se inmuniza a estos con células del mismo tratadas con neuraminidasa se presenta regresión del tumor³⁵. Al emplearse esta enzima para modificar las glicoproteínas de las células L5178Y, se pensó que sería posible que pudiera interactuar con estas moléculas y aumentar su antigenicidad.

II MATERIAL Y METODOS.

II.1 Ratones

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c los cuales son compatibles en antígenos tisulares con los de la cepa DBA/2 en el locus H-2^d.

II.2 Obtención de células L5178Y de los donadores y transplante.

Se transplantaron 8×10^7 células L5178Y suspendidas en el líquido ascítico intraperitonealmente a cada uno de los tres ratones nuevos del lote de mantenimiento cada semana. Se dejaron transcurrir ocho días después del transplante para el desarrollo tumoral.

Los ratones, ya con el tumor, fueron sacrificados por descerebración. Se les colocó en una placa de corcho sobre el dorso, fijando las extremidades. El abdomen se limpió con etanol de 96^o. Se hizo una incisión en la piel en la línea media ventral, de esternón a púbis. La piel se separó y se fijó en el flanco del animal formando con ella una cavidad para retener el líquido ascítico. Se hizo una perforación en la pared abdominal por el flanco, cuidando de no romper los vasos

sanguíneos de grueso calibre. Por la perforación salió el líquido ascítico que quedó retenido en la cavidad hecha anteriormente. De ahí se recogió con una jeringa sin aguja y de la jeringa se pasó a un tubo de ensaye esterilizado. Se centrifugó a temperatura ambiente (20 - 22° C) a 800 g durante 5 minutos. Al paquete celular se le agregaron 10 ml de medio de cultivo de Mc Coy (Grand Island Biological Co). Se diluyó una alícuota de esta suspensión celular 1 : 50 en el mismo medio y se contó en una cámara cuentaglobulos Speirs-Levy para eosinófilos en microscopio invertido de contraste de fases UPI de Zeiss a 125 X. En función de esta cuenta se calculó el volumen de la suspensión celular original en el cual estuviesen contenido 8×10^7 células tumorales para el trasplante a nuevos receptores.

Se utilizaron hembras vírgenes de la cepa BALB/c de edades comprendidas entre 4 y 6 meses. Se desinfectó el abdomen de estos animales con etanol de 96° y con una jeringa de 2.5 ml se inyectó al receptor el volumen de medio en el cual estuviese suspendida 8×10^7 células tumorales.

II.3 Modificación de la antigenicidad de las células tumorales con diversos reactivos.

Se prepararon los siguientes reactivos en NaCl 0.15 M en las concentraciones que se indican:

(A) Agentes químicos:

| | |
|-----------------------|--------|
| a) DTT | 0.10 M |
| b) Glutaraldehido | 0.25 M |
| c) Yodoacetamida | 0.10 M |
| d) Yoduro de potasio | 0.40 M |
| e) 2-mercaptoetanol | 0.10 M |
| f) Mertiolate | 0.10 M |
| g) Peryodato de sodio | 0.10 M |
| h) Urea | 0.20 M |

(B) Enzimas:

| | |
|--|--------------------|
| a) <u>Neuraminidasa de <u>Vi-</u> <u>brio cholerae</u></u> | 20 u/ml |
| b) Papaína | 0.5 mg/ml |
| c) Papaína y EDTA | 0.5 mg/ml y 0.2 M |
| d) Tripsina | 0.25 mg/ml |
| e) Tripsina y EDTA | 0.25 mg/ml y 0.2 M |

Las células malignas obtenidas del lote de ratones transplantados se lavaron tres veces con NaCl 0.15 M y se dividieron en alícuotas de 16×10^6 células L5178Y. Cada una de estas se trató separadamente con cada reactivo, resuspendiéndolas en 5 ml de cada solución y se incubaron a 37° C durante 30 minutos. Luego fueron lavadas tres veces con NaCl 0.15 M y el botón celular se suspendió en 8 ml de NaCl 0.15 M. Se observaron mediante tinción con Eosina para asegurarse que habían muerto las células tratadas y se congelaron a -70° C hasta el momento de usarse para las inmunizaciones. El tratamiento con tripsina y con papaína fué semejante al descrito con los reactivos.

Para tratar a las células con urea, se cultivaron 8×10^6 células neoplásicas en medio de Mc Coy^{5a} adicionado de urea 200 mM. El cultivo se realizó en botellas T para cultivo de tejidos de 5 x 7 x 1 cm a 37° C. Los cultivos se revisaron a intervalos de 24 horas. Se observó una intensa proliferación celular y a los cuatro días de iniciados las células se lavaron en medio de cultivo sin urea como se describió. Se estandarizó el número de células a 160×10^6 /ml en medio de Mc Coy^{5a} estéril y se radiaron a 3000 r en una bomba de cobalto. Se congelaron las células a -70° C hasta el momento de emplearlas para inmunizar.

Para tratar a las células malignas con neuraminidasa, una suspensión de ésta fue lavada tres veces con solución salina y estandarizada a contener 4×10^6 células neoplásicas por ml. Esta suspensión se ajustó a pH de 6.5 con burbujeo de CO₂ y se les agregó 20 Unidades por ml de neuraminidasa de Vibrio cholerae durante 30 minutos a 37^o C con agitación continua en un disco giratorio a 10 rpm. En seguida las células fueron lavadas 3 veces con 60 volúmenes de medio de cultivo fresco, a temperatura ambiente y a continuación fueron sometidos a 20 ciclos de congelación y descongelación con el objeto de producir la muerte celular y evitar la regeneración del ácido N-acetil neuramínico.

II.4 Procedimiento de inmunización:

Se realizó el procedimiento de inmunización activa que consiste en la introducción de un antígeno en un animal, el cual desencadena una respuesta de rechazo ya sea celular o humoral. Se emplearon para este procedimiento dos tipos de antígenos: a.- Las células L5178Y modificadas con diversos reactivos (Cuadro 1) b.- Líquido ascítico sobrenadante que se supone contenía antígenos solubles, puesto que se ha reportado⁴⁹ que los ANE son liberados a los líquidos extracelulares.

II.4-1 Inmunización de ratones con células L5178Y modificadas.

Se formaron 15 grupos de 10 ratones hembras BALB/c de dos meses de edad, peso promedio de 23 g. A éstos se les inmunizó cuatro veces una vez por semana con 4×10^6 células L5178Y modificadas con los reactivos indicados en el texto y suspendidas en 0.2 ml de NaCl 0.15 M. Cada ratón recibió en total 16×10^6 células malignas modificadas y muertas.

Como testigos de éstos grupos, se emplearon 7 ratones por cada lote que recibieron cada semana 4×10^6 células L5178Y no tratadas, congeladas y descongeladas 20 veces que se encontraban muertas. Otro lote de siete ratones testigo por grupo, recibió cuatro inyecciones una vez por semana de 0.2ml de NaCl 0.15 M.

II.4-2 Inmunización con líquido de ascitis sobrenadante libre de células. (Antígenos solubles).

A catorce ratones del mismo sexo, peso y edades que el grupo anterior, se les inmunizó vía IP, cuatro veces, una vez por semana, con 0.1 ml de líquido de ascitis sobrenadante L5178Y con igual cantidad de adyuvante de Freund.

A veinte ratones se les inmunizó vía SC, cuatro veces una vez por semana con 0.1 ml de líquido ascítico emulsionado con

igual cantidad de adyuvante completo de Freund.

Los testigos de estos grupos fueron siete ratones inyectados vía IP y siete inyectados vía SC con 0.1 ml de medio de cultivo emulsionado con igual cantidad de adyuvante completo de Freund.

Diez días después de terminado el proceso de inmunización de cada lote, los ratones fueron sometidos a pruebas de su estado inmune contra la neoplasia, mediante la aplicación de células tumorales intactas por vía intraperitoneal. Esta se describe a continuación con el nombre de "reto".

II.5 Reto.

Cada uno de los grupos de ratones, supuestamente inmunizados con células L5178Y modificadas con los diferentes reactivos, fueron inoculadas intraperitonealmente con 8×10^7 células tumorales intactas, suspendidas en medio de cultivo. A partir de ese día, los ratones fueron inspeccionados diariamente para vigilar la viabilidad y desarrollo tumoral, hasta el término de 90 días.

CUADRO 1 Exploración de diferentes métodos de modificación antigénica de las células L5178Y para inducir una respuesta inmune de rechazo antitumoral.

| Agentes modificadores de los antígenos membranales | No. de ratones inmunizados (1) | No. de ratones testigos | | Vía de administración (4) |
|---|--------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------|
| | | Células congeladas muertas (2) | NaCl 0.15M Medio de cultivo y adyuvante de Freund | |
| (A) Agentes químicos | | | | |
| a) DTT | 10 | 7 | 7 | IP |
| b) Glutaraldehido | 10 | 7 | 7 | IP |
| c) Yodoacetamida | 10 | 7 | 7 | IP |
| d) Yoduro de potasio | 10 | 7 | 7 | IP |
| e) 2-Mercaptoetanol | 10 | 7 | 7 | IP |
| f) Mertiolate | 10 | 7 | 7 | IP |
| g) Peryodato de sodio | 10 | 7 | 7 | IP |
| h) Urea | 10 | 7 | 7 | IP |
| (B) Enzimas | | | | |
| i) Papaína | 10 | 7 | 7 | IP |
| j) Papaína y EDTA | 10 | 7 | 7 | IP |
| k) Tripsina | 10 | 7 | 7 | IP |
| l) Tripsina y EDTA | 10 | 7 | 7 | IP |
| m) Neuraminidasa | 10 | 7 | 7 | SC |
| Antígenos solubles (líquido ascítico libre de células) (3) | 14 20 | | | IP SC |

- (1) Cada ratón recibió 4 inmunizaciones, 1 vez por semana con 8×10^6 células modificadas con cada sustancia. Las células muertas se aplicaron en 0.2 ml de NaCl 0.15M.
- (2) Células muertas con 20 ciclos de congelación descongelación.
- (3) Se utilizó 0.1 ml de líquido ascítico \neq 0.1 ml de adyuvante de Freund semanalmente por 4 semanas.
- (4) Cada grupo de ratones inmunizados se sometió al reto inoculando intraperitonealmente 8×10^7 células tumorales intactas/ratón. Los ratones testigos se inocularon de la misma manera.

II.6 Efecto " in vivo " sobre el crecimiento del linfoma L5178Y de los siguientes reactivos: yodacetamida, yoduro de potasio, mercaptoetanol 2, mertiolate y peryodato de sodio:

Los animales inmunizados activamente con células L5178Y y sometidos al reto se compararon con 5 lotes de ratones que sin haber sido inmunizados activamente recibieron células L5178Y intactas y una inyección diaria IP de algunos reactivos que modifican a las células L5178Y. Se estudió también el efecto tóxico " in vivo " de estas sustancias.

Se formaron cinco lotes de 15 ratones BALB/c de tres meses de edad y un peso promedio de 25 g, a cada uno, de los cuales se inoculó 8×10^7 células L5178Y sin modificar en 1 ml de medio de cultivo. Cada lote de 15 ratones fué dividido en 10 experimentales y cinco testigos. A cada uno de los 10 ratones experimentales de cada grupo se les inyectó IP durante 10 días una de las sustancias preparadas en NaCl 0.15 M indicadas en el Cuadro 2. Se registró el peso inicial promedio de cada lote y los pesos alcanzados a consecuencia del desarrollo tumoral del séptimo al 12o. día después de la inoculación de células L5178Y intactas. Los porcentajes de incremento de peso se muestran en la Tabla IV.

CUADRO 2. Efecto " in vivo " de Yodac, KI, ME, MERT y NaIO₄ sobre el crecimiento del linfoma L5178Y.

| Substancia de prueba (1) | No. de ratones tratados con las substancias de prueba (2) | No. de rato nes testigos (2) |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|
| a) Yodoacetamida 0.01 M | 10 | 5 |
| b) Yoduro de potasio 0.04M | 10 | 5 |
| c) 2-Mercaptoetanol 0.01M | 10 | 5 |
| d) Mertiolate 0.01 M | 10 | 5 |
| e) Peryodato de sodio 0.01M | 10 | 5 |

(1) El mismo día de la inoculación se inicia el tratamiento crónico de los ratones de prueba con los reactivos indicados (.2 ml diarios/10 días).

(2) Cada ratón fué inoculado con 8×10^7 células L5178Y sin modificar.

II.7 Comprobación de la efectividad de la inmunización activa con células modificadas con neuraminidasa:

II.7-1 Pruebas de microcito-toxicidad:

Por medio de esta prueba, se investigó la presencia de anticuerpos en el suero de los ratones inmunizados y sobrevivientes al reto con células neoplásicas. Se empleó la técnica de Terasaki³⁹. Se prepararon charolas (Falcon 3034) para micropruebas, las cuales contienen 60 excavaciones de 10 hileras con 6 pozos cada una. Se cubrieron las excavaciones con 5 mm³ de aceite mineral USP (Nujol) para evitar la evaporación de las sustancias que se colocaron subsecuentemente. En las hileras de seis excavaciones, se colocó ya sea 1 mm³ de sueros de ratones inmunizados y testigos en otras.

La sangre de los ratones se obtuvo por punción del plexo retrorbitario, se centrifugó a 2500 g 5 minutos y se separó el suero. Se preparó una suspensión de células tumorales lavadas tres veces en 60 volúmenes de medio de cultivo y estandarizadas a contener 2×10^6 células por ml. De esta suspensión celular se agregó 1 mm³ en cada pozo de prueba y se incubó la mezcla de células neoplásicas y sueros de los ratones inmunes y testigos a 37^o C durante 30 minutos al cabo de los cuales, se adicionaron, para cada prueba, 5 mm³ ya sea de suero

de ratón normal o bien de suero de cobayo y de conejo como fuente de complemento y se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente.

Cada una de estas pruebas se realizó en una hilera por sextuplicado en seis pozos. Después de 60 minutos de incubación, se tiñeron las células durante 2 minutos con 2 ml de eosina acuosa al 5% y se fijaron con una solución de formol al 30% a pH 7.

Se cubrieron todas las excavaciones de la charola con un porta-objetos de vidrio de 70 por 50 mm y se observaron en un microscopio invertido de contraste de fases UPI de Zeiss a 125 X.

II.7-2 Pruebas de linfocito-toxicidad:

Se prepararon en tubos de ensaye esterilizados, mezclas celulares conteniendo linfocitos esplénicos de ratones inmunizados más células malignas en proporción de 20 : 1 en medio de cultivo. Dos mililitros de esta suspensión se colocaron en botellas T para cultivo de 5 x 7 x 1 cm. En estas condiciones, se procuró que las células quedaran cercanas entre sí, sin confluencia o formación de grumos. Se incubaron a 37^o C durante 48 horas, extrayéndose de la estufa a intervalos de 6, 18

24, 36 y 48 horas para su observación con el microscopio invertido de contraste de fases.

De estos cultivos se tomaron con técnica estéril, alícuotas de 0.05 ml las cuales fueron teñidas con solución de eosina acuosa al 5% y fijadas en formol para estimación de viabilidad celular.

Los testigos para esta prueba fueron linfocitos procedentes de ratones sanos, puestos en contacto en la misma proporción con las células neoplásicas. Dicha mezcla se sujetó a las mismas condiciones que la anterior.

II.7-3 Inmunización adoptiva con linfocitos de ratones inmunizados con células tratadas con neuraminidasa.

a. Obtención de linfocitos esplénicos.

Se obtuvieron linfocitos de: a) ratones normales, b) ratones inmunizados con células L5178Y tratadas con neuraminidasa, c) sobrevivientes al primero y segundo reto, d) portadores de la neoplasia intraperitoneal (pertenecientes al grupo de receptores) y de e) portadores del tumor subcutáneo.

Los ratones fueron descerebrados y fijados en decubito dorsal a una placa de corcho. Se desinfectó el abdomen con

etanol de 96^o, se hizo una incisión media longitudinal, a través de la cual se expuso y disecó el bazo.

Este fué resecado y colocado en una caja de Petri esterilizada conteniendo 2 ml de medio de cultivo de Mc Coy^{5a} en donde fue cortado en pequeños fragmentos. Estos fueron transferidos a un homogenizador de vidrio esmerilado en el cual se disociaron las células esplénicas bajo presión manual suave.

Del material así obtenido, se separaron los linfocitos por el método de Böyum⁴⁰. Este consiste en preparar una mezcla de Ficoll-Hypaque esterilizado de densidad de 0.076 constituido por 24 partes de una solución de Ficoll (Pharmacia) de peso molecular 400 000 al 9 %, más 10 partes de una solución de Hypaque (Winthrop) al 33.9%.

En un tubo de ensaye esterilizado y con tapa hermética, se depositaron 3 ml de la mezcla anterior y sobre ella se colocó gota a gota con pipeta Pasteur, la suspensión celular obtenida del bazo, teniendo cuidado de conservar la interfase entre ambos líquidos. Estos tubos se centrifugaron a 1000 g por 20 minutos, al cabo de los cuales todas las células esplénicas se depositaron en el fondo del tubo, excepto los linfocitos que permanecen sobrenadando al nivel de la interfase entre la mezcla de Ficoll-Hypaque y el medio de cultivo sobrenadante. De

ahí fueron recuperados por aspiración con pipeta Pasteur y lavados tres veces en medio de cultivo.

La suspensión celular obtenida contuvo entre 95 y 98 % de linfocitos; el resto fueron eritrocitos. El rendimiento obtenido fué alrededor de 25×10^6 linfocitos por cada bazo de ratón. Esta cantidad fue utilizada ya sea para la transferencia pasiva de la inmunidad celular a otros ratones o bien para la observación del efecto linfocito-tóxico directo contra las células malignas in vitro.

b. Transferencia pasiva de inmunidad celular:

Los linfocitos obtenidos de cada bazo fueron suspendidos en 0.5 ml de medio de cultivo Mc Coy e inyectados por vía intraperitoneal a receptores normales. Diez días después, estos ratones fueron inyectados con 8×10^7 células tumorales intactas por vía intraperitoneal.

CUADRO 3 Comprobación de la efectividad de la inmunización activa y adoptiva con células L5178Y en la respuesta inmune antitumoral.

| Método de prueba | Sistema experimental | Sistema testigo |
|----------------------------------|--|---|
| 1. Microcitotoxicidad(1) | Suero de ratones inmunizados con células L5178Y modificadas con neuraminidasa y resistentes al reto. | Suero de ratones sin inmunizar. |
| 2. Linfocitotoxicidad(2) | Cultivo de linfocitos de ratones inmunizados con células modificadas con neuraminidasa y resistentes al reto, mezclados con células L5178Y intactas | Cultivo de linfocitos de ratones sin inmunizar, mezclados con células L5178Y intactas |
| 3. Inmunización adoptiva (3) (4) | a) Lote de ratones inmunizados vía IP con linfocitos esplénicos obtenidos de ratones tratados con células L5178Y modificados con neuraminidasa y resistentes al reto. b) Lo mismo que el caso anterior pero inmunizados por vía SC. | a) Lotes de ratones sin inmunizar b) Lote de ratones sin inmunizar. |

(1) Se obtuvo el suero de 5 ratones de prueba y de 5 testigos.

(2) Se obtuvieron linfocitos de 5 ratones de prueba y 5 testigos.

(3) Se utilizaron lotes de 6 ratones para pruebas y testigos.

(4) Los ratones inmunizados con linfocitos de ratones inmunes se sometieron a un reto con 8×10^7 células L5178Y intactas para demostrar que habían adoptado inmunidad celular con los linfocitos inmunes.

III. RESULTADOS

III.1 Sobrevida de ratones inmunizados activamente con células tratadas con diversos reactivos:

a. Inmunizados IP con células tratadas con DTT:

La sobrevida de este grupo fue entre 18 y 30 días. Fallecieron seis ratones entre el día 19 y 20 posterior al reto. Cuatro fallecieron 30 días después del reto. Tabla I y gráfica 1.

b. Inmunizados IP con células tratadas con glutaraldehído:

La sobrevida de este grupo fue entre 20 y 23 días. Un ratón falleció 20 días después del reto, seis fallecieron el día 21 y los tres restantes murieron con tumor 23 días después del reto. Tabla I y gráfica 1.

c. Inmunizados IP con células tratadas con Yodacetamida:

La sobrevida de este grupo fue entre 14 y 20 días. Los ratones fallecieron gradualmente, habiendo muerto dos el día 14, dos más el día 16 y tres el día 18 posterior al reto. Los tres ratones restantes fallecieron 20 días después del reto. Tabla I y gráfica 1.

d. Inmunización IP con células tratadas con Yoduro de potasio:

La sobrevivencia de este grupo fue entre 22 y 55 días. Solo falleció un ratón el día 22 y dos más el día 30 después del reto. Sin embargo, el resto de ratones fallecieron entre los días 31 y 55 después del reto a consecuencia del desarrollo tumoral. Tabla I y gráfica 1.

e. Inmunizados IP con células tratadas con Mercaptoetanol:

La sobrevivencia de este grupo fue entre 15 y 83 días. Dos ratones fallecieron el día 15, cuatro más el día 19, dos el día 30. Los ratones restantes fallecieron el día 83 después del reto a consecuencia del desarrollo tumoral. Tabla I y gráfica 2.

f. Inmunizados IP con células tratadas con Mertiolate:

La sobrevivencia de este grupo fue entre 13 y 32 días. Fallecieron cuatro ratones el día 13, doce más el día 21 y el resto el día 32 después del reto. Gráfica 2.

g. Inmunizados IP con células tratadas con peryodato de sodio:

La sobrevivencia de este grupo fue entre 15 y 30 días. Siete ratones fallecieron entre el día 15 y el día 21 y los tres restantes fallecieron el día 30 después del reto. Tabla I y gráfica 3

h. Inmunizados con células tratadas con urea:

La sobrevivencia de este grupo fue entre 10 y 17 días después del reto. Cuatro ratones fallecieron el día 10 y los restantes el día 17 después del reto. Tabla I y gráfica 3.

i. Inmunizados con células tratadas con papaína:

La sobrevivencia de este grupo fue entre 15 y 25 días. Dos ratones fallecieron el día 15, dos más el día 19 y el resto 25 días después del reto. Tabla I y gráfica 2.

j. Inmunizados con células tratadas con tripsina:

La sobrevivencia de este grupo fue semejante a la registrada para el grupo inmunizado con células tratadas con papaína. Tabla I y gráfica 2.

k. Inmunizados IP con células tratadas con papaína y EDTA:

La sobrevivencia de este grupo fue entre 13 y 40 días después del reto. Un ratón falleció el día 11 después del reto, seis más el día 21, dos el día 25 y uno 40 días después del reto. Tabla I y gráfica 2.

1. Inmunizados con células tratadas con tripsina y EDTA:

La sobrevivencia de este grupo fue semejante a la del lote inmunizado con papaína y EDTA. Se encuentran registrados en la Tabla I y gráfica 3.

TABLA I

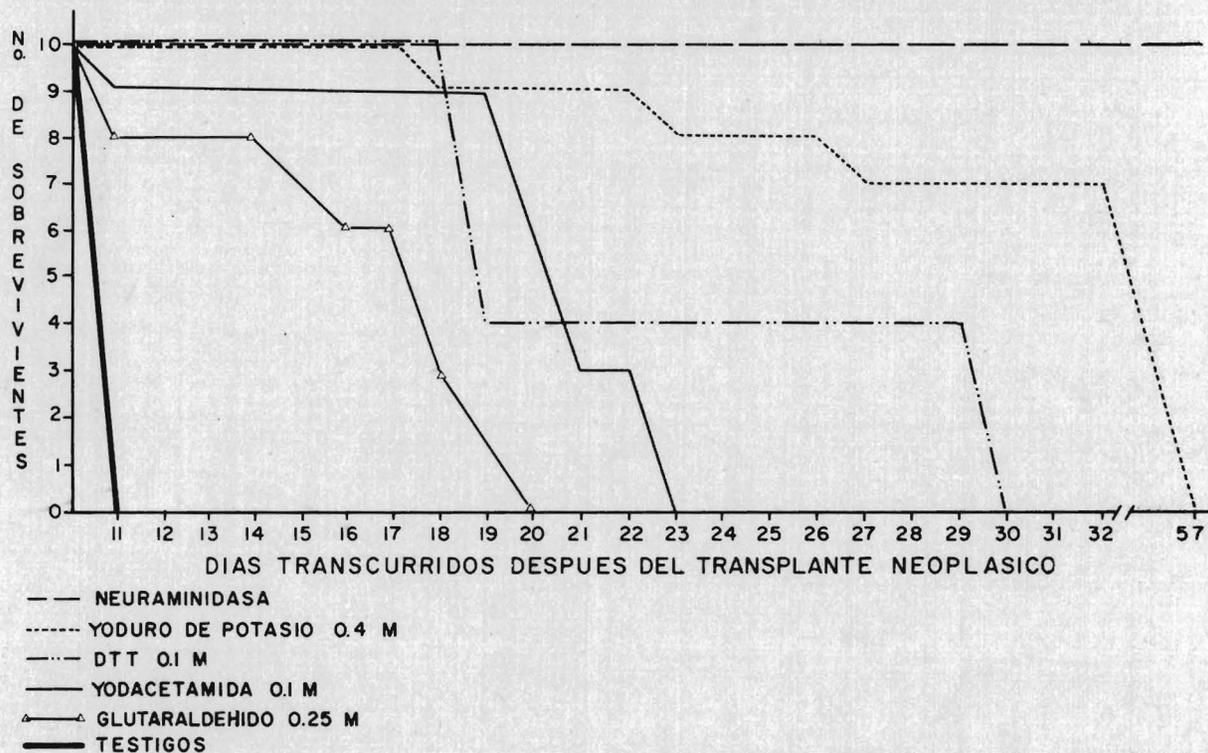
Sobrevida diaria de los ratones inmunizados* con células L5178Y tratadas con diferentes reactivos después de la aplicación IP de células L5178Y intactas.**

| Células tratadas con: | No. inicial de ratones | Número de ratones vivos en los días indicados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
| | | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | | | | | | | | | |
| <u>Agentes químicos:</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DTT | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | |
| Glutar | 10 | 10 | 10 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 3 | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Yodac | 10 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 6 | 3 | 2 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| KI | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 9 | 9 | 8 | 9 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | |
| ME | 10 | 10 | 10 | 10 | 8 | 8 | 6 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | |
| Mert. | 10 | 10 | 10 | 9 | 8 | 8 | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 | 5 | 5 | 4 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| Na IO ₄ | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 8 | 6 | 6 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | |
| Urea | 10 | 10 | 6 | 5 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <u>Enzimas:</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Neuram. | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| Pap. | 10 | 10 | 10 | 10 | 8 | 8 | 5 | 5 | 4 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Pap. y EDTA | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 7 | 6 | 5 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| Trip. | 10 | 10 | 9 | 8 | 8 | 6 | 5 | 5 | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Trip. y EDTA | 10 | 10 | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

* Cuatro dosis semanales vía IP.

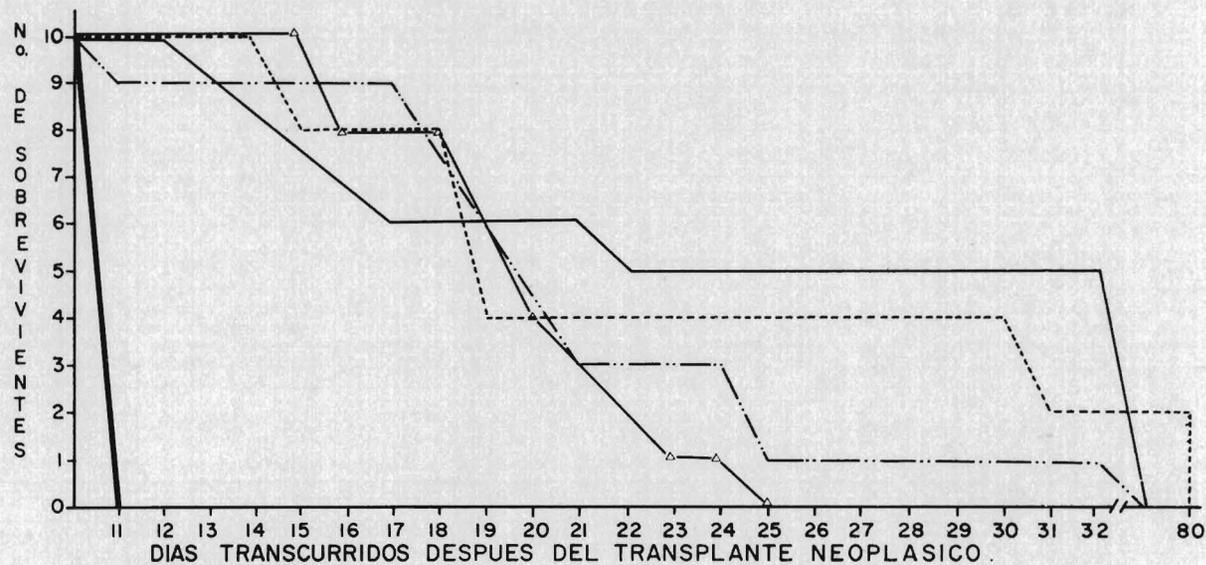
** 8×10^7 células intactas vía IP 10 días después de la última dosis inmunizante.

GRAFICA 1.
 SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE
 CON CELULAS L5178 Y TRATADAS CON : D.T.T. GLUTARALDEHIDO,
 YODACETAMIDA Y YODURO DE POTASIO.



GRAFICA 2

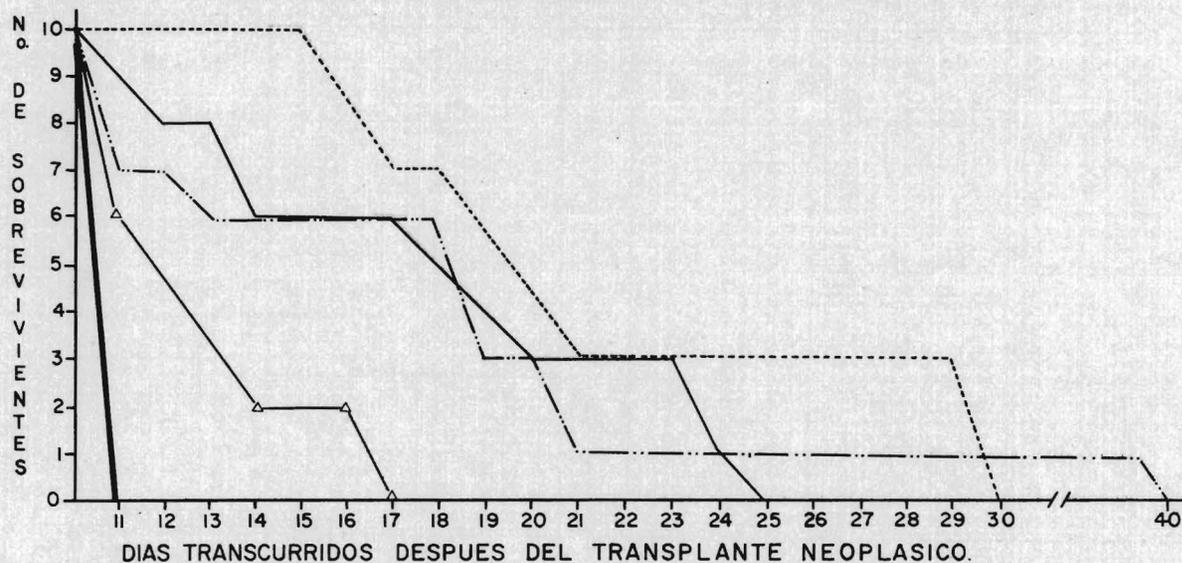
SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE CON CELULAS L5178 Y TRATADAS CON: MERCAPTOETANOL, MERTIOLATE, PAPAINA, PAPAINA Y EDTA.



- MERCAPTOETANOL 0.1 M
- MERTIOLATE 0.1 M
- △— PAPAINA
- PAPAINA Y EDTA 0.5 mg/ml y 1 ml al 0.02 M
- TESTIGOS

GRAFICA 3

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE CON CELULAS L5178Y TRATADAS CON PERIODATO DE SODIO, TRIPSINA Y EDTA, TRIPSINA, UREA.



- PERIODATO DE SODIO 0.1 M
- TRIPSINA AL 0.25 %
- · - · - TRIPSINA Y EDTA 0.25 % Y 0.02 M
- △ — △ UREA 0.200 mM Y RADIACION 3000 Y
- TESTIGOS

III.1-1 Sobrevida de ratones inmunizados con células tratadas con neuraminidasa:

Los resultados obtenidos en este grupo fueron los más importantes ya que los diez ratones inmunizados IP con células tratadas con neuraminidasa permanecieron sanos y libres del tumor hasta 90 días después del reto. Luego fueron sacrificados y en el estudio post-mortem no se encontró tumor ascítico ni sólido (Tabla II y gráfica 4).

Los ratones inmunizados SC con células L5178Y tratadas con neuraminidasa fueron 17 de los cuales seis (34.7 %) sobrevivieron más de 90 días libres de tumor y once lo desarrollaron (Tabla III y gráfica 4).

Testigos:

Todos los testigos inmunizados IP con células L5178Y congeladas y descongeladas 20 veces que fueron retados fallecieron con tumor entre 10 y 12 días después del reto.

Los ratones inyectados con 0.2 ml de NaCl 0.15 M que fueron retados fallecieron con tumor 10 días después del reto. Gráficas 1, 2, 3 y 4.

TABLA II

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE CON CELULAS L5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA Y RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS INTACTAS L5178Y POR LA MISMA VIA.

| Grupo de ratones | Resistentes al tumor > 90 días | Susceptibles al tumor** | % de resistentes al tumor |
|-------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Inmunizados 10 | 10 | 0 | 100 |
| No inmunizados* 7 | 0 | 7** | 0 |

* Este grupo fué inmunizado con células L5178Y congeladas y descongeladas 20 veces no tratadas con neuraminidasa.

** Murieron con tumor intraperitoneal antes de 15 días después del reto.

TABLA III

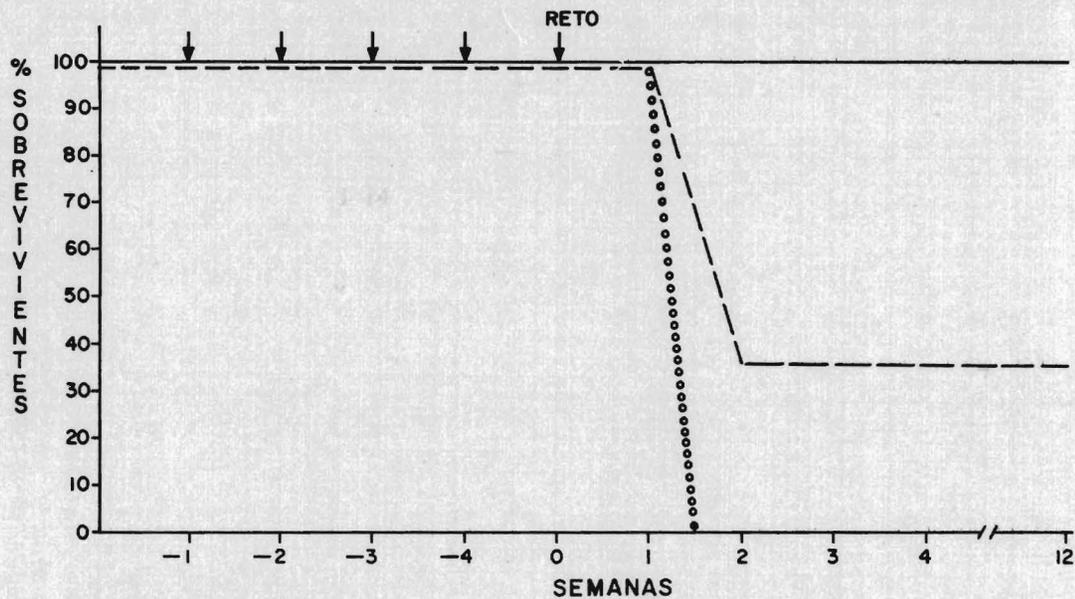
SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS SUBCUTANEAMENTE CON CELULAS L5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA Y - RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL.

| Grupo de ratones | Resistentes al tumor > 90 días | Susceptibles al tumor * | % de resistentes |
|------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------|
| Inmunizados | 17 | 11 | 34.7 |
| No inmunizados | 7 | 7** | 0 |

* Murieron con tumor intraperitoneal antes de 15 días después del reto.

** Este grupo fué inmunizado con células L5178Y congeladas y descongeladas 20 veces, no tratadas con neuraminidasa.

GRAFICA 4
 SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS POR VIA INTRAPERITONEAL Y
 SUBCUTANEA CON CELULAS L 5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA



↓ INMUNIZACION CON CELULAS L 5178 Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA
 — VIA INTRAPERITONEAL
 --- VIA SUBCUTANEA
 TESTIGOS NO INMUNIZADOS

III.2 Efecto " in vivo " sobre el crecimiento del linfoma L5178Y de los siguientes reactivos: Yodacetamida, yoduro de potasio, mercaptoetanol, mertiolate y peryodato de sodio:

Estos cinco grupos constituyen los testigos de los ratones que fueron inmunizados activamente con células tratadas con diversos reactivos y después retados. Los resultados se encuentran en el Cuadro 4 y a continuación se describen:

El peso promedio de los ratones tratados con yodacetamida tuvo una diferencia de 7 g con respecto al peso promedio de los testigos el día 10 después del trasplante de las células tumorales. Sin embargo, la yodacetamida fué muy tóxica a la dosis empleada ya que de los diez ratones que constituían el lote experimental al iniciar este trabajo, fueron falleciendo del 3o. al 10o día después de la aplicación, un promedio de dos ratones por día.

El lote tratado con yoduro de potasio mostró una diferencia de 3 g menos con respecto al peso del testigo. Sin embargo, el tratamiento no protegió a los ratones tratados, ya que fallecieron el 14 día post-trasplante con un porcentaje de aumento de peso de 56% por el crecimiento tumoral mientras que los testigos aumentaron 69% y fallecieron dos días antes que los tratados.

En los lotes inyectados con mercaptoetanol y mertiolate, se notó una diferencia en los pesos promedio de 5 g entre el lote testigo y el experimental del día 8 al día 11 después del trasplante, pero los ratones tratados con mercaptoetanol fallecieron 16 días después del trasplante con un incremento de peso de 52% debido al crecimiento tumoral, mientras que los testigos aumentaron 76%. Los tratados con mertiolate fallecieron a los 14 días con un incremento de peso de 39% por tumor y los testigos 52%. Tabla IV.

El tratamiento con peryodato de sodio dió diferencias en peso de 3 y 4 g los días 9 y 10 después del trasplante, pero el tratamiento no fué efectivo porque tanto los testigos como el lote experimental fallecieron el mismo día con el mismo incremento de peso debido al crecimiento tumoral. Los resultados se encuentran registrados en la Tabla IV y en el Cuadro 4.

TABLA IV

CRECIMIENTO DEL TUMOR L5178Y EN RATONES BALB/c
TRATADOS CON DIFERENTES SUBSTANCIAS

Porcentaje de aumento de peso debido al crecimiento tumoral

| Días post-transplante | TEST. | ME | NaIO ₄ | Mert. | KI | Iodac. |
|-----------------------|-------|----|-------------------|-------|-----|--------|
| 7 | 14.8 | 0 | 0 | 4 | 9 | 0 |
| 8 | 22.4 | 0 | 0 | 9 | 17 | 0 |
| 9 | 27.8 | 0 | 16 | 13 | 21 | 15 |
| 10 | 33 | 0 | 25 | 13 | 30 | 21 |
| 11 | 43 | 0 | 33 | 17 | 39 | 21 |
| 12 | 56 | 12 | 41 | 30 | 40 | *** |
| 13 | 63 | 28 | 50 | 39 | 56 | |
| 14 | 65 | 32 | *** | *** | *** | |
| 15 | 76 | 36 | | | | |
| 16 | *** | 52 | | | | |

* ME Mercaptoetanol; NaIO₄ Peryodato de sodio; Mert Mertio-
late; KI Yoduro de potasio; Yodac Yodacetamida. Las dosis
de cada una fueron de .2 ml diarios.

**TEST. ratones no tratados.

*** Día en que murieron por crecimiento tumoral.

CUADRO 4 Resultado del efecto " in vivo " de: Yodoacetamida, Yoduro de Potasio, Mercaptoetanol, Mertiolate y Peryodato de Sodio en el crecimiento del tumor L5178Y.

| Tratamiento* | Concentración M | Incremento de peso de los animales tratados con respecto al incremento de los testigos no tratados** (%) | Toxicidad |
|--------------------|--------------------|--|-----------|
| Mercaptoetanol | 0.10 | 68 | + |
| Peryodato de sodio | 0.01 | 79 | + + + + + |
| Mertiolate | 0.10 | 62 | + |
| Yoduro de potasio | 0.04 | 89 | + + + |
| Yodoacetamida | 0.01 | 49 | + + + + + |

* Se aplicaron 0.2 ml diarios de las sustancias en las concentraciones indicadas.

** Este porcentaje se calcula tomando como el 100% el % del incremento de peso debido al tumor en los animales no tratados y se compara con el % de incremento de peso de los animales tratados el día de su muerte.

III.3 Sobrevida de ratones inmunizados con líquido de ascitis sin células del tumor L5178Y (Antígenos solubles) vía IP y SC.

III.3-1 Sobrevida de ratones inmunizados IP con líquido de ascitis sin células del tumor L5178Y y retados después con células L5178Y intactas por la misma vía.

Seis ratones de los trece que integraban este grupo resultaron resistentes al reto (46.1 %). Estos no registraron tumor en el estudio post-mortem hecho a los 90 días.

Todos los testigos de este grupo inyectados IP con 0.2 de una emulsión constituida de adyuvante de Freund y medio de cultivo 1 : 1 fueron susceptibles al reto neoplásico intraperitoneal (Tabla V y gráfica 5).

III.3-2 Sobrevida de los ratones inmunizados SC con líquido de ascitis sin células del tumor L5178Y y retados después con células L5178Y por vía IP.

Diez de los veinte ratones que integraban este grupo (50 %) resultaron resistentes al reto con células L5178Y intactas por vía intraperitoneal, como lo demuestra la necropsia practicada a los 90 días (Tabla VI y gráfica 5).

Los testigos de este grupo murieron con tumor a los diez

días de hecho el reto.

TABLA V

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEAL--
 MENTE CON LIQUIDO DE ASCITOS SIN CELULAS DEL TUMOR
 L5178Y Y RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y
 INTACTAS POR LA MISMA VIA.

| R A T O N E S | | | |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|
| Número de inmu- nizados | Resistentes al tumor * | Susceptibles al tumor** | % de re-- sistentes |
| 13 | 6 | 8 | 46.1 |

* Sobrevida de más de tres meses libres del tumor después del reto.

** Murieron con tumor intraperitoneal antes de 15 días después del reto.

TABLA VI

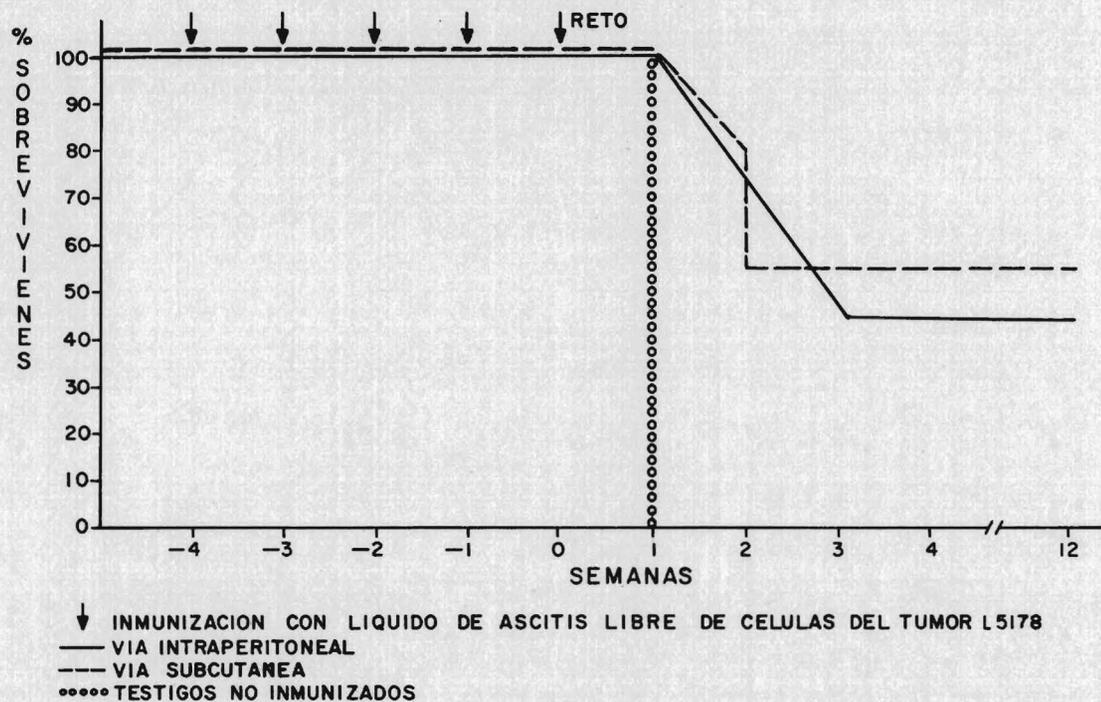
SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS SUBCUTANEAMENTE
 CON LIQUIDO DE ASCITIS L5178Y LIBRE DE CELULAS Y RE-
 TADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS
 POR LA MISMA VIA INTRAPERITONEAL.

| Número de inmu- nizados | Resistentes al tumor * | Susceptibles al tumor ** | % de re- sistentes |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 20 | 10 | 10 | 50 |

* Sobrevida de más de tres meses libres del tumor después del reto.

** Murieron con tumor intraperitoneal antes de 15 días después del reto.

GRAFICA 5
 SOBREVIVENCIA DE RATONES INMUNIZADOS POR VIA SUBCUTANEA E INTRA-
 PERITONEAL CON LIQUIDO DE ASCITIS LIBRE DE CELULAS DEL TUMOR
 L 5178



III.4 Comprobación de la efectividad de la inmunización activa y adoptiva con células L5178Y tratadas con neuraminidasa:

III.4-1 Prueba de microcito-toxicidad:

Se investigó la presencia de anticuerpos en el suero ya sea de: a) ratones inmunizados con células tratadas con neuraminidasa y sobrevivientes al reto con células neoplásicas, b) inmunizados adoptivamente con células esplénicas. Por la técnica de microcito-toxicidad, no se encontraron anticuerpos citotóxicos en el suero de ellos capaces de fijar complemento autólogo, singénico tumoral, alogénico tumoral, singénico normal, alogénico normal ni xenogénico de cobayo ni de conejo.

III.4-2 Linfocitotoxicidad:

Los cultivos de las células neoplásicas a las cuales se les agregaron linfocitos de ratones inmunes mostraron a las 48 horas agrupaciones de los linfocitos alrededor de las células malignas, las cuales morían después del tiempo de incubación a juzgar por el desprendimiento de las células neoplásicas del vidrio y la tinción de estas mismas células por la técnica de coloración con eosina.

Los testigos a los cuales se agregaron linfocitos de ratones no inmunizados, no mostraron esos cambios en el mismo

tiempo de observación.

III.4-3 Sobrevida de ratones que recibieron inmunización adoptiva:

Los grupos que se describen a continuación corresponden a los animales que recibieron 25×10^7 linfocitos esplénicos de ratones inmunizados vía IP y SC con células tratadas con neuraminidasa y que fueron resistentes al reto con 8×10^7 células L5178Y.

a. Sobrevida de ratones inmunizados adoptivamente por vía intraperitoneal con 25×10^7 linfocitos esplénicos de ratones inmunizados intraperitonealmente con células L5178Y tratadas con neuraminidasa y retos con 8×10^7 células L5178 intactas por vía intraperitoneal:

El resultado se muestra en la Tabla VII. Se partió de un número original de seis ratones, a los cuales se aplicaron intraperitonealmente los linfocitos esplénicos inmunes contra el tumor. Después de 10 días de la inyección intraperitoneal de los linfocitos, los seis ratones (100 %) se mostraron resistentes al trasplante tumoral y sobrevivieron más de tres meses libres de éste.

b. Sobrevida de ratones inmunizados adoptivamente por vía intraperitoneal con 25×10^6 linfocitos esplénitos de ratones portadores del tumor L5178Y subcutáneo y retados con 8×10^7 células L5178Y intactas por vía intraperitoneal:

Los resultados aparecen en la Tabla VIII. Se partió de un número original de seis ratones, todos los cuales sobrevivieron a la aplicación por vía intraperitoneal de los linfocitos singénicos inmunes contra el tumor. Después de 10 días de la aplicación de los linfocitos, los seis ratones (100 %) se mostraron resistentes al reto con células neoplásicas y sobrevivieron libres de éste, según estudios post-mortem hechos a los 90 días.

TABLA VII

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS ADOPTIVAMENTE POR VIA INTRAPERITONEAL CON 25×10^6 LINFOCITOS ESPLÉNICOS DE RATONES INOCULADOS DIEZ DIAS ANTES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y Y RETADOS CON 8×10^7 CELULAS L5178Y POR VIA INTRAPERITONEAL.

| No. de inmuni- zados | Resistentes al tumor* | Susceptibles al tumor | % de resis- tentes. |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| 6 | 6 | 0 | 100 |

* Sobrevida de más de tres meses libres del tumor después del reto.

TABLA VIII

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS ADOPTIVAMENTE POR VIA INTRAPERITONEAL CON 25×10^6 LINFOCITOS ESPLÉNICOS DE RATONES INOCULADOS DIEZ DIAS ANTES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y POR VIA SUBCUTANEA Y RETADOS CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL.

| R A T O N E S | | | |
|---------------------|------------------------|-----------------------|------------------|
| No. de inmunizados. | Resistentes al tumor * | Susceptibles al tumor | % de resistentes |
| 6 | 6 | 0 | 100 |

* Sobrevida de más de tres meses libres de tumor después del reto.

CUADRO 5. Resultados de sobrevida y resistencia al reto después de la inmunización activa y adoptiva.

Resultados a los 30 días

| Método | Vía de inmunización | % de sobrevida | % de resistencia al reto |
|--|---------------------|----------------|--------------------------|
| I. Inmunización activa. | | | |
| 1) Células tratadas con: | | | |
| a) DTT | IP | 40 | 40 |
| b) Glutaraldehido | IP | 0 | - |
| c) Yodacetamida | IP | 0 | - |
| d) Yoduro de potasio | IP | 70 | 70 |
| e) 2-mercaptoetanol | IP | 30 | 30 |
| f) Mertiolate | IP | 20 | 20 |
| g) Peryodato de sodio | IP | 0 | - |
| h) Urea | IP | 0 | - |
| i) Papaína | IP | 10 | 10 |
| j) Papaína y EDTA | IP | 10 | 10 |
| k) Tripsina | IP | 0 | - |
| l) Tripsina y EDTA | IP | 10 | 10 |
| m) Neuraminidasa | IP | 100 | 100 |
| | SC | 34.7 | 34.7 |
| 2. Antígenos solubles. | | | |
| | IP | 46.1 | 46.1 |
| | SC | 50 | 50 |
| II. Inmunización adoptiva con linfocitos esplénicos de ratones previamente inmunizados con células tratadas con neuraminidasa. | | | |
| | IP | 100 | 100 |

CUADRO 6. Resultados de la comprobación de la efectividad de la inmunización activa y adoptiva en la respuesta inmune anti-tumoral.

| METODOS | RESULTADOS |
|--|---|
| 1. Microcitotoxicidad | No se encontraron anticuerpos citotóxicos anti-células L5178Y |
| 2. Linfocitotoxicidad | Se encontró inmunidad celular mediada por linfocitos. |
| 3. Inminización adoptiva con linfocitos de ratones resistentes al reto (2o.reto) | Se encontró inmunidad celular mediada por linfocitos. |

IV. - DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Cuando una clona de células malignas se establece en el organismo o cuando un tumor canceroso se ha desarrollado por algún tiempo "in vivo", los mecanismos de vigilancia inmunológica e inmunidad concomitante del portador de la neoplasia, son capaces de llevar a cabo una respuesta de rechazo hacia el tumor ^{10,11,18,21,41,42}.

Los linfocitos son capaces de reconocer a las células neoplásicas y considerarlas extrañas en virtud de ser éstas portadoras de ANE ⁴³. Pueden interactuar con ellas y unirse a través de sus sitios de reconocimiento antigénico. Los linfocitos desarrollan entonces al fenómeno denominado peripolexis que consiste en la migración del linfocito sobre la superficie de la célula maligna alternando con períodos de inmovilidad y contacto de las membranas de ambas células. Después de esto, las células malignas presentan lesiones en sus membranas que producen un efecto citocídico o citotóxico subsecuente al contacto directo con el linfocito ^{43,44}.

Al parecer, los mediadores químicos productores de la lesión de membrana son la liberación in situ de los componentes C8 y C9 del sistema del complemento por el linfocito ⁴⁵.

Sin embargo, la respuesta inmune puede ser inhibida de diversas maneras, cuando el organismo produce anticuerpos de facilitación contra la neoplasia, los cuales pueden actuar protegiendo a la célula maligna de tres maneras diferentes⁴⁶: a) se combinan con los ANE a los cuales cubren y de esta manera evitan el reconocimiento y contacto directo de los linfocitos con las células neoplásicas, b) dichos anticuerpos, por carecer de capacidad para activar al sistema de complemento autólogo, no dan lugar a un efecto citotóxico contra las células neoplásicas, y c) pueden competir con los anticuerpos fijadores de complemento y de esta manera contribuyen a impedir la reacción de rechazo hacia la neoplasia^{22,23,47}.

Adicionalmente, las células tumorales liberan hacia los líquidos extracelulares ANE^{17,48,49} que bloquean a distancia el efecto citocídico de los linfocitos contra las células cancerosas⁴⁹. Dichos ANE, al pasar a los espacios extracelulares, llegan a ocupar los sitios de reconocimiento antigénico de los linfocitos y los sitios de combinación de los anticuerpos circulantes⁵⁰. De esta manera resultan inactivados a distancia tanto la respuesta inmune celular como la humoral que despierta el tumor.

Como puede verse, los mecanismos inmunológicos que el organismo pone en juego hacia las células neoplásicas o bien son activados por las mismas, o son de facilitación y favorecimiento del crecimiento tumoral.

Los ANE son glicoproteínas cuyos determinantes antigénicos pueden inducir en el organismo una respuesta del tipo de facilitación inmunológica mediada por anticuerpos⁵¹. Cuando la respuesta inmune del organismo hacia los ANE es de rechazo, esta es mediada principalmente por fenómenos de inmunidad celular y pocas veces por producción de anticuerpos fijadores de complemento^{41,42}.

Las glicoproteínas, como las que constituyen los ANE, son habitualmente proteínas de alta solubilidad, muy electronegativas y resistentes a la degradación enzimática^{14,51,52}. Estas características contribuyen a su mayor solubilidad y desprendimiento de la superficie de las células neoplásicas y a explicar su comportamiento inhibitorio a distancia sobre los mecanismos inmunológicos de rechazo^{46,49}.

Como puede verse, aparentemente existe una serie de factores combinados cuyo resultado da lugar a la permanencia de los tumores dentro del organismo. Tratando de explicar esta situación paradójica, cabe mencionar que en la naturaleza

opera un mecanismo semejante que hace posible la permanencia de los tejidos embrionarios y fetales durante el embarazo²¹. Tomando en cuenta que, asociada a la transformación maligna de las células ocurre una regresión antigénica hacia el estado embrionario o fetal⁵⁴, puede decirse que la persistencia de las células cancerosas en el organismo se debe a que éstas son toleradas de manera semejante a como lo son los productos del embarazo^{46,55}. Frente a esta situación, es aparentemente difícil encontrar procedimientos inmunoterapéuticos y preventivos contra el cáncer.

Entre los objetivos de la inmunoterapia oncológica podrían mencionarse los siguientes⁵⁶: a) disminuir la síntesis de los anticuerpos de facilitación, b) reducir el efecto bloqueador de los ANE circulantes sobre las células efectoras de la inmunidad celular contra las células malignas, c) disminuir el bloqueo que los ANE circulantes pueden ejercer sobre los anticuerpos de rechazo, d) disminuir la cantidad de ANE liberados por las células malignas y e) aumentar la capacidad de fijación del complemento de los anticuerpos de facilitación.

Sería posible lograr la disminución de síntesis de anticuerpos de facilitación únicamente mediante procedimientos adecuados de inmunización activa del portador de la neoplasia contra las células malignas. Esto conduciría, posiblemente, a que se

obtuviera un incremento de la respuesta celular contra la neoplasia.

En el presente trabajo, se intentó lograr la disminución de la síntesis de anticuerpos de facilitación por medio de la inducción de inmunización celular contra las células del linfoma L5178Y tratadas con diversos reactivos.

A continuación se analizan los resultados que en este sentido se han obtenido en los diferentes grupos experimentales:

El DTT y el mercaptoetanol 2, son reactivos que causan la reducción de los puentes disulfuro intra-e intercatenarios de las cadenas polipeptídicas de las proteínas, con lo cual se produce una alteración en la estructura terciaria y de mayor orden de las proteínas²⁸. Era de esperarse que un cambio de esta naturaleza, en los antígenos de las células tumorales, diera lugar al descubrimiento de nuevos sitios antigénicos en estas.

Los resultados muestran que los ratones tratados ya sea con DTT o con mercaptoetanol tuvieron una sobrevivencia máxima de 30 y 50 días post-transplante y después fallecieron gradualmente.

El glutaraldehído fue empleado por ser un reactivo que produce el aumento de la rigidez de las moléculas de antígenos por entrecruzamientos de los enlaces que se establecen entre los grupos NH_2 de las proteínas y este reactivo ²⁹. El tratamiento en esta forma, de algunos antígenos membranales ha dado lugar a la polimerización de las moléculas y al aumento de la inmunogenicidad sin pérdida de los determinantes antigénicos originales ³⁰. El trabajo de Sanderson y Frost ⁵⁷ informa que al inmunizar a ratones BALB/c con células tumorales tratadas con glutaraldehído se produjo un alto grado de protección. Estas células correspondían a un tumor inducido con metil-colantreno. Los resultados obtenidos al inmunizar a los ratones con células L5178Y tratadas con glutaraldehído dieron una sobrevida limitada a 23 días después del reto.

La yodacetamida es un compuesto que tiene la propiedad de combinarse con los grupos SH de las proteínas ^{31,58}. El empleo de este reactivo en el presente trabajo tuvo como objeto investigar si las células L5178Y podían ser modificadas por él, en su inmunogenicidad. Los resultados mostraron que la inmunización con células tratadas de esta manera no produjo una sobrevida importante en los ratones después del trasplante de las células neoplásicas intactas. En trabajos de Prager ⁵⁹ et al, con el linfoma P1798 se informa que un régimen de vacu

nación de tres dosis de células modificadas con yodacetamida no protegió a los huéspedes contra retos subsecuentes con células viables.

Se ha informado que el yoduro de potasio a una concentración 0.4 M tiene la propiedad de solubilizar y desnudar el glicocálix de las amibas³². Estudios de microscopía electrónica, hechos en este mismo laboratorio con las células L5178Y, han demostrado que éstas no pierden el glicocálix después de una exposición similar a la empleada en este trabajo. El único cambio importante que se observó en las células fue el aumento en las prolongaciones citoplasmáticas. Fig. 4. La inmunización de ratones con células L5178Y, tratadas con este reactivo, produjo una sobrevida de 70% hasta el día 30 post-transplante que fue superior a la obtenida con el tratamiento de DTT, mercaptoetanol, yodacetamida, peryodato de sodio, mertiolate, pero inferior a la del tratamiento con neuraminidasa.

Los compuestos mercuriales tienen la propiedad de reaccionar con los grupos SH o S-S modificando la estructura terciaria o de otro orden de las proteínas y en ocasiones liberando de ellas algunos péptidos de las membranas de eritrocitos³³.

Aunque el mecanismo de acción de estos reactivos no era predecible al actuar sobre las células L5178Y se empleó el

meriolate por existir antecedentes de que estos compuestos son capaces de interactuar con las glicoproteínas y aumentar su inmunogenicidad. Los resultados obtenidos con la inmunización con células tratadas con meriolate muestran que la respuesta inmune de rechazo permitió la sobrevivencia del 30% de ratones hasta el día 32 post-transplante. Estos resultados son similares a los obtenidos con los ratones inmunizados con células modificadas con DTT y mercaptoetanol.

La urea se empleó por haberse informado que a concentraciones 200mM simula la acción proteolítica de la tripsina sobre las células tumorales. Sin embargo, como después de este tratamiento las células neoplásicas permanecen viables, fue necesario radiarlas con el objeto de poder inyectarlas muertas durante el período de inmunización. Los resultados mostraron que la prolongación de la sobrevivencia post-transplante fue muy reducida, de solamente 17 días post-transplante para todo el grupo.

El peryodato de sodio, al parecer, actúa sobre una glicoproteína con ácido siálico que al oxidarse origina un grupo aldehídico esencial para la transformación. Se ha informado que el tratamiento de los linfocitos autólogos con peryodato de sodio produce estimulación inmunológica de los linfocitos no modificados del mismo individuo³⁸. De esta manera, puede concluirse que la modificación de las glicoproteínas de las células autólo-

gas con este reactivo es capaz de inducir contra ellas una respuesta inmune de tipo celular.

Dado que las células L5178Y son normalmente aceptadas por los receptores en que fueron transplantadas, la modificación de sus glicoproteínas con peryodato de sodio fue con el objeto de aumentar su poder inmunogénico y probar la efectividad de los procedimientos de inmunoprofilaxis contra ellas.

Los resultados obtenidos muestran que las células modificadas con este reactivo, fueron capaces de inducir una buena respuesta inmune de rechazo hacia las células intactas de esta neoplasia. De hecho, la sobrevida obtenida fue de 30% el día 21 después del reto, con una declinación rápida previa después del 15^o día post-transplante.

Inmunización con células L5178 tratadas con neuraminidasa:

Se sabe que las células L5178Y pierden el 65% de su contenido total de NANA (3.3×10^8 moléculas) y el 90% de la superficie celular (2.16×10^8 moléculas) cuando son tratadas con neuraminidasa de Vibrio cholerae^{60,61}. La inmunización con células tratadas con neuraminidasa produjo un 100% de protección contra el reto intraperitoneal con células malignas intactas. El 100% de los ratones no inmunizados desarrollaron el tumor, muriendo en un período no mayor de diez días. Así

una sobrevivencia del 100% de los ratones inmunizados libres de tumor por más de tres meses puede considerarse altamente favorable. Su estado de inmunidad pudo comprobarse mediante el experimento de transferencia de inmunidad pasiva con linfocitos esplénicos.

Por los resultados anteriores, puede verse que la inmunidad activa con células tratadas con neuraminidasa produjo el nivel más alto de protección por vía intraperitoneal (100%) comparada con la vía subcutánea (34.7%).

Tradicionalmente se ha considerado la vía subcutánea como la más inmunogénica, pero además se ha encontrado que la vía intraperitoneal es adecuada para la inmunización con las células linfocíticas^{62,63}. En el presente trabajo, la vía intraperitoneal resultó la más útil para estimular la respuesta inmune de rechazo contra las células L5178Y. Los resultados de inmunización intraperitoneal con células tratadas con neuraminidasa, pueden considerarse mejores que los obtenidos ya sea con células radiadas⁴⁰, sonificadas³⁹ o tratadas con los otros reactivos empleados en este trabajo.

En los animales inmunizados con células tratadas con neuraminidasa, no se encontraron anticuerpos por la técnica de microcitotoxicidad. Dado que esta es una técnica sensible³⁹,

puede pensarse que la respuesta inmune producida no fue por la presencia de anticuerpos contra las células malignas. Por lo tanto, puede considerarse que la respuesta inmune hubiera sido preponderantemente de tipo celular. Esta suposición se comprobó en este mismo trabajo, al encontrarse que la inmunidad producida por las células tratadas con neuraminidasa es transferible por medio de linfocitos esplénicos. Por los resultados obtenidos en este grupo experimental, puede deducirse que la modificación del antígeno de las células tumorales por medio de la neuraminidasa, despierta una respuesta inmune de rechazo y no una de facilitación inmunológica hacia las células malignas, por lo cual este tipo de modificación enzimática de las células neoplásicas puede considerarse el método más racional de la inmunoprolifaxis o inmunoterapia del cáncer, lo cual concuerda con otros trabajos previos realizados con otros tumores^{64,35}.

Inmunización con células tratadas con otras enzimas:

Se ha reportado que las células de diversos tipos de cáncer deben su resistencia a la respuesta inmune del receptor debido al glicocálix³⁶. Con base a esto, se trataron células L5178Y con tripsina y papaína con el objeto de remover la cubierta exterior por un mecanismo proteolítico.

Después de someter a las células a la acción de estas en-

zimas se encontraron íntegras, no lisadas y luego fueron lavadas. El tratamiento de las células malignas en estas circunstancias ha demostrado que es capaz de solubilizar el glicocálix⁶⁵

Los resultados demostraron que la inmunización con células tripsinizadas solo prolongó un poco la sobrevivencia de los ratones los cuales fueron falleciendo gradualmente del 11^o al 25^o día post-transplante.

Análisis de resultados obtenidos en ratones inmunizados con líquido de ascitis sin células (antígenos solubles):

Los resultados en los ratones inmunizados con líquido sobrenadante permiten observar que se obtuvo una prolongación de la sobrevivencia de los animales inmunizados y un porcentaje de protección contra el reto de las células neoplásicas intactas por las mismas vías: intraperitoneal (46.1%) y subcutánea (50%). La diferencia en el porcentaje de animales inmunizados y protegidos por ambas vías no se considera significativa, pero puede verse que fué ligeramente mayor cuando la vía de inmunización fue la subcutánea.

El que en este grupo se haya obtenido un porcentaje de protección inferior al de los ratones inmunizados con células tratadas con neuraminidasa, puede atribuirse a que el antígeno

que contenía el líquido sobrenadante no fue modificado en su estructura química por la neuraminidasa, cuyo uso no se intentó con este material. No se usó la enzima en este caso porque hubiera sido difícil separarla del material antigénico y su inclusión hubiera oscurecido la interpretación de los resultados obtenidos, a más de tener efectos tóxicos⁶⁶.

Otro motivo por el que no se logró una mayor inmunización de rechazo hacia las células neoplásicas, posiblemente haya sido el pequeño volumen de líquido sobrenadante (0.1 ml) empleado en cada una de las cuatro dosis inmunizantes. Posiblemente mediante el empleo de estímulos antigénicos mayores o por períodos más largos se hubieran obtenido porcentajes más elevados de protección.

En el suero de los 16 animales de este grupo resistentes al reto con células neoplásicas, se investigó la presencia de anticuerpos citotóxicos contra las células neoplásicas. No se encontraron los anticuerpos empleando la técnica de microcitotoxicidad, por lo cual se infiere que la resistencia de este grupo pudiera haber sido debida a la inmunidad de tipo celular. Esto último no lo comprobamos por transferencia de inmunidad pasiva con células esplénicas.

Por los resultados anteriores, puede considerarse que las

células L5178Y liberan a los líquidos extracelulares ANE, lo cual es congruente con la suposición de otros autores⁴⁹.

La importancia de demostrar la presencia de antígenos neoplásicos en los líquidos extracelulares, se deriva del hecho de que éstos pueden inactivar a distancia los linfocitos inmunes antes de que entren en contacto con las células malignas y ejerzan su efecto citocídico sobre ellas. Este mecanismo de bloqueo se ha considerado que constituye un medio más de supervivencia de las células neoplásicas in vivo. Por otra parte, los ANE pueden combinarse en otro tipo de neoplasias con los anticuerpos ya sea de rechazo o facilitación y formar complejos antígeno anticuerpo con ellos. El resultado de esto se ha considerado favorable al crecimiento neoplásico⁶⁷.

La inyección de líquido sobrenadante no produjo tumor en los sitios de aplicación, por lo cual puede pensarse que si las células de este tumor contienen partículas oncogénicas virales no fueron capaces de producir el tumor a expensas de las células del receptor.

Comprobación de la efectividad de la inmunización activa con células tratadas con neuraminidasa:

Pruebas de microcito-toxicidad:

Se ha demostrado en trabajos previos^{70,71} que los anticuerpos contra células de neoplasias linfoides no fijan complemento autólogo ni alogénico; pero que sí son capaces de fijar complemento xenogénico de conejo. Por tal motivo, se emplearon en estas pruebas varias fuentes de complemento pero aun así los resultados fueron negativos. En este trabajo se observó que sólo el suero de conejo tiene una acción citotóxica heterofílica contra los linfocitos normales y células L5178Y. A juzgar por los testigos incluidos en la prueba, este efecto heterogénico es inespecífico tanto contra células linfoideas como contra células malignas.

Linfocitotoxicidad in vitro:

Por medio de esta prueba, pudo observarse en seis casos que los linfocitos esplénicos de los animales inmunizados, son capaces de efectuar una reacción citotóxica o citocídica por contacto directo contra las células malignas y que esto se presenta entre las 36 y 48 horas en cultivo in vitro.

Dado que los testigos pertinentes fueron congruentes con este resultado y que los linfocitos de ratones normales no mostraron este efecto, puede considerarse esta prueba como una evidencia adicional de que la inmunidad de rechazo hacia las células tumorales es de tipo celular mediada por linfocitos. La realización de esta prueba se vió facilitada por el hecho de que las células empleadas se mostraron adherentes al vidrio, a pesar de haberse informado en la literatura que las células no son adherentes^{27,72}.

Ratones inmunizados por transferencia de células linfoides:

Los seis animales que recibieron por vía intraperitoneal 25×10^6 linfocitos procedentes de animales inmunizados contra la neoplasia con células tratadas con neuraminidasa, resistieron el reto con células malignas intactas.

Este es un ejemplo de inmunidad adoptiva que puede ser transferida por medio de linfocitos inmunes. La eficiencia de este fenómeno queda de manifiesto por el hecho de que 25×10^6 linfocitos inmunes fueron capaces de proteger contra el inóculo por la misma vía de 8×10^7 células neoplásicas en los seis ratones así tratados.

Se ha descrito el fenómeno de inmunidad adoptiva como

aquél que se produce mediante la transferencia de información por células linfoideas y ya se ha reportado en inmunidad de transplante de tejido normales y neoplásicos e inclusive se ha ensayado como un procedimiento de inmunoterapia del cáncer 68,69 .

De este grupo, llama la atención el que las 8×10^7 células L5178Y inoculadas por vía intraperitoneal son rechazadas aparentemente antes de que el tumor prospere. Esto habla en favor de que esa cantidad de células malignas no son capaces de producir y liberar el medio la cantidad suficiente de ANE para llevar a cabo el bloqueo de los linfocitos inmunes.

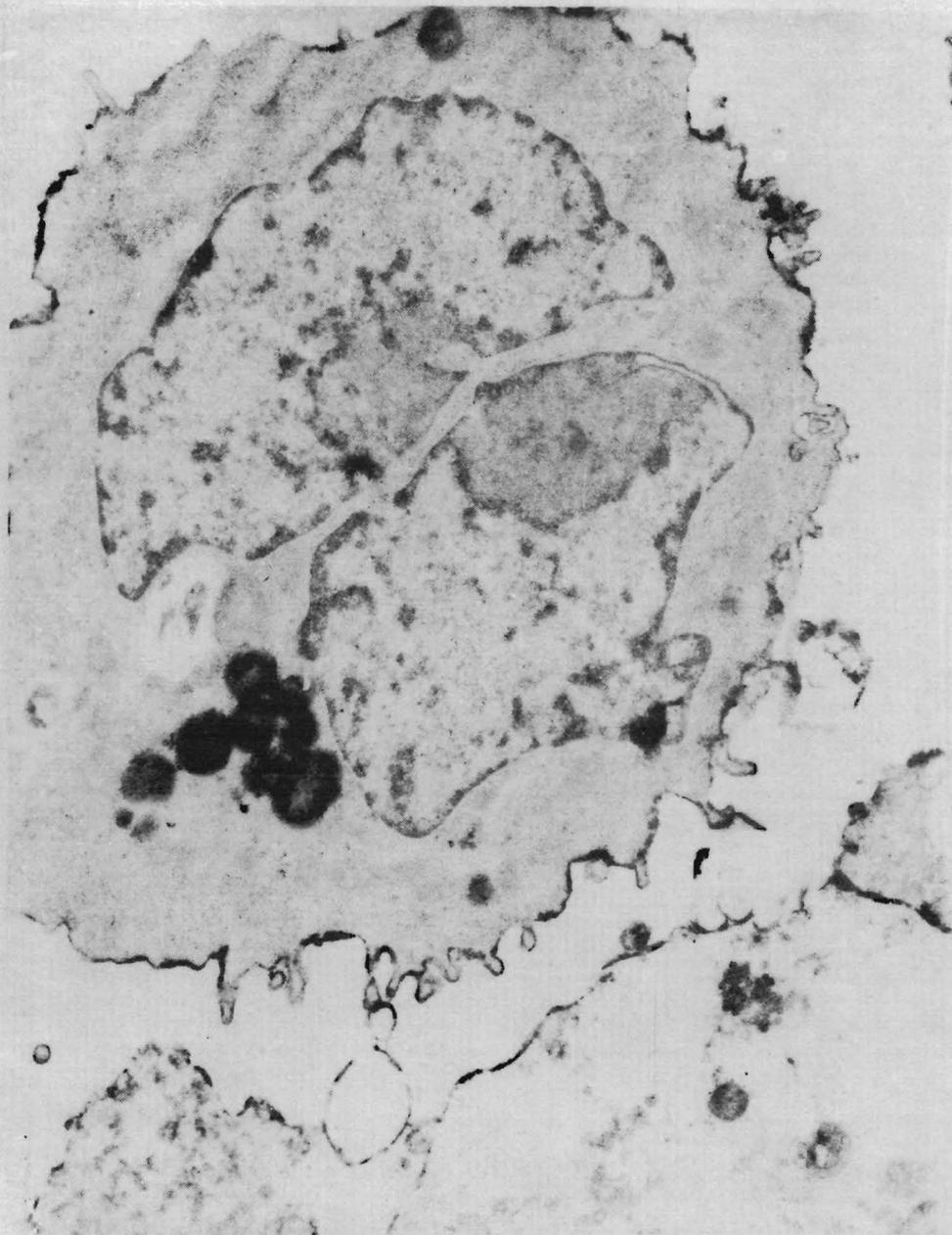
En este experimento se demuestra, una vez más, que los linfocitos de ratones inmunizados con células tratadas con neuraminidasa son capaces de llevar a cabo una reacción de rechazo contra las células intactas.

Estudios de microscopía electrónica de la neoplasia L5178Y en este laboratorio, han demostrado que las células L5178Y son portadoras de una gruesa capa de glicoproteínas, la cual no se pierde con el tratamiento de las células con neuraminidasa ni con yoduro de potasio (Figs. 4 y 5). Al parecer, la resistencia de las células tumorales hacia la respuesta inmune de rechazo del receptor radica en la cubierta de glico-

proteínas (glicocálix) que recubre a las células malignas. De los reactivos químicos empleados para modificarla, sólo la neuraminidasa de Vibrio cholerae fué capaz de inducir una respuesta inmune de rechazo hacia las células tumorales transplantadas posteriormente. Desgraciadamente esta enzima no puede ser empleada in vivo dado los efectos tóxicos que presenta, lo cual invalida su uso en casos de neoplasias ya establecidas.

Resulta interesante comprobar que la modificación de las glicoproteínas de las células tumorales con neuraminidasa sea capaz de inducir una respuesta inmune de tipo celular de rechazo contra la neoplasia. Sin embargo, la utilidad que esto puede tener con fines de inmunoterapia de las neoplasias resulta disminuida debido a que las células tumorales liberan a los líquidos extracelulares parte de las glicoproteínas de su cubierta exterior, las cuales tienen la capacidad de bloquear los sitios de reconocimiento antigénico de los linfocitos o el sitio de combinación de los posibles anticuerpos de rechazo que se formaron contra las células tumorales. En este sentido, es necesario llevar a cabo estudios posteriores tendientes a resolver este problema.

FIGURA 4 Células L5178Y con tinción de rojo de Rutenio para el glicocálix, como se observaron al microscopio electrónico X. La superficie celular es lisa y el -- grosor del glicocálix fué de 312 nm 14,000 X.



Células L5178Y tratadas con KI 0.4 M 30 minutos y teñidas con rojo de Rutenio. La superficie celular mostró abundantes prolongaciones citoplásmicas y conservó la capa de glicoproteínas teñida con rojo de Rutenio 7,142 X.

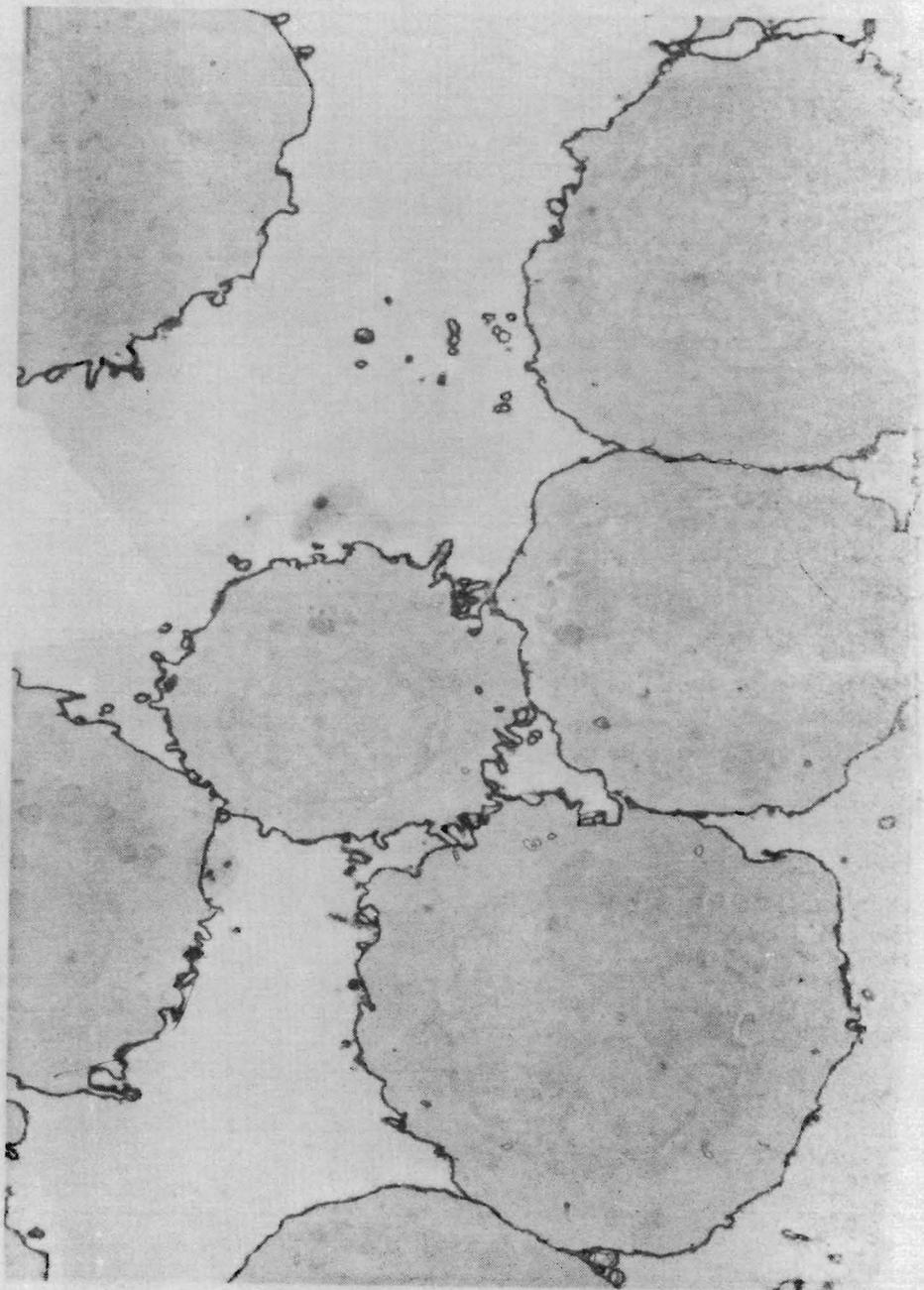
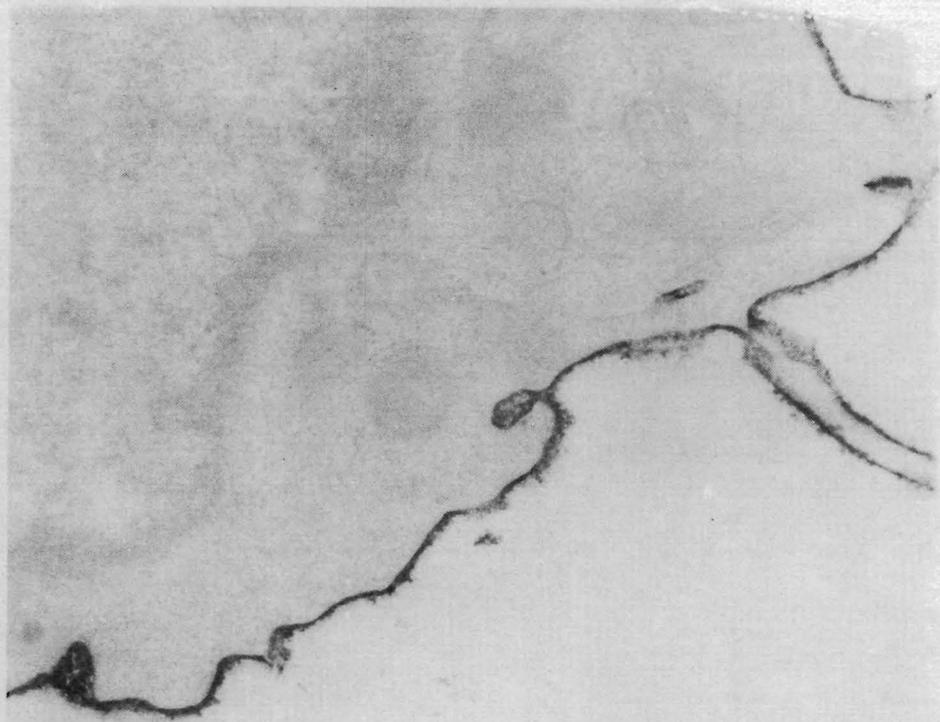


FIGURA 5 Células L5178Y tratadas con Neuraminidasa 30 minutos a 37^o C y teñidas con rojo de Rutenio. Se aprecia la superficie celular lisa y que la capa de glicoproteínas se conservó después del tratamiento. 42,857X.



RESUMEN

El propósito de este trabajo fue explorar diferentes métodos de modificación antigénica de los ANE de las células L5178Y para inducir una respuesta inmune de rechazo antitumoral efectiva.

Para ello se utilizó el linfoma murino L5178Y el cual fue transplantado a receptores BALB/c por vía intraperitoneal.

Las células L5178Y fueron tratadas con los siguientes reactivos: DTT, glutaraldehído, yodacetamida, yoduro de potasio, mercaptoetanol, mertioate, urea y peryodato de sodio. Se modificaron con las siguientes enzimas: papaína, papaína y EDTA, tripsina, tripsina y EDTA, y neuraminidasa a fin de modificar las proteínas del glicocálix. Al inmunizar a ratones con esas células se logró prolongación variable de la sobrevivencia a los 30 días del reto: neuraminidasa 100%, yoduro de potasio 70%, DTT 40%, mercaptoetanol 40%, mertiolate 30%.

Sólo la inmunización de los ratones con células tratadas con neuraminidasa logró inducir una respuesta inmune de rechazo hacia las células tumorales intactas. La respuesta inmune fue de tipo celular. No se demostró la presencia de anticuerpos en el suero de los animales resistentes al tumor.

La transformación de linfocitos de animales inmunizados a ratones sanos, volvió a estos inmunes adoptivamente al trasplante neoplásico.

La inmunización activa de ratones con el líquido de ascitis libre de células en el que probablemente hubiera antígenos solubles L5178Y produjo sobrevida del 50%.

BIBLIOGRAFIA

1. Anuario Estadístico de la Secretaría de Industria y Comercio. 1969.
2. De la Loza, S.A., Saldaña, J.M.: 1972 La mortalidad en el Distrito Federal en 1970. Bol. Med. IMSS 14: 173
3. Alexander, P.: 1972 Foetal "antigens" in cancer. Nature 235: 137.
4. Foley, E.J.: 1953 Antigenic properties of methylcholantrene induced tumors in mice of the strain or origin. Cancer Res. 13: 835.
5. Prehn, R.T.: 1957 Specific immunity to methylcholantrene induced sarcomas J. Nat. Cancer Inst. 18: 769.
6. Kirby, D.P.S., Billington, W.D., James, D.A. 1966 Transplantation of eggs to the kidney and uterus of immunised mice. Transplantation 4: 713.
7. Coggin, J.H., Ambrose, K.R., Anderson, N.G. 1970 Fetal antigen capable of inducing transplantation immunity against SV 40 hamster tumor cells. J. Immunol. 105: 525
8. Peterson, G., Freeman, G.: 1968 Evidence suggesting a relationship between polyoma virus induced transplantation antigen and normal embryonic antigen. Cancer Res 28: 1965.
9. Ambrose, K.R., Anderson, N.G., Coggin, J.H. 1971 Interruption of SV 40 oncogenesis with human foetal antigen Nature 233: 194

10. Old, L.J., Boyce, E.A.: 1964 Immunology of experimental tumor. Ann. Rev. Med. 15: 167.
- ✓ 11. Klein, G.: 1969 Experimental studies in human tumor immunology. Fed. Proc. 28: 1739.
12. Abelev, G.I.: 1968 Production of embryonal serum alpha globulin by hepatomas. Review of experimental and clinical data. Cancer Res 28: 1344
13. Gold, P., Freedman, S.O.: 1965 Specific carcinoembrion-
c antigens of the human digestive system. J. Exp. Med. 22:
467.
14. Laurence, B.J., Munroe, N.A.: 1972 Foetal antigens and
their role in the diagnosis and clinical managements of
human neoplasias: a review Br. J. Cancer 26: 335
15. Bardawill, W.A., Toy, B.L.: 1959 The natural history of
choriochorcinoma. Problems of immunity and spontaneous
regression. Ann. N.Y. Acad. Sci 80: 197
16. Ralph, M., Winn, M.D. 1967 Fetomaternal cellular rela-
tions in the human basal plate: an ultrastructural study of
the placenta. Ann. J. Obst. Gynecol 97: 832
17. Prehn, R.I. 1965. Cancer antigens in tumors induced by
chemicals. Fed. Proc. 24: 1018.
18. Haughton, G.A., Amos, D.B.: 1968 Immunology of carci-
nogenesis. Cancer Res 28: 1839.
19. Klein, G.: 1966 Tumor antigens. Ann Rev. Microbiol 20:
233.
20. Smith, R.T.: 1968 Tumor specific immune mechanism.
New Eng J. Med. 278: 1207

21. Hamilton, F.S.: 1969 Immunity to malignant diseases in man. Brit. Med. J. 2: 467.
22. Kaliss, N., Kandusch, A.A.: 1956 Acceptance of tumor homografts by mice injection with antiserum. I Activity of serum fractions . Proc. Soc Exp. Biol. Med 9: 118.
23. Hutchins, P. 1968 Mechanism and functions of immunological enhancement. Surg. Gynecol. Obst. 126: 1331
24. Currie, G.A. Bagshawe, K.: 1967 The masking of antigens in trophoblast and cancer cells. Lancet 1: 708
25. Inbar, M., Sachs, L.: 1969 Structural differences insites of the surface membrane of normal and transformed cells. Nature 233: 710.
26. Wallach, D.F.H.: 1968 Cellular membranes and tumor behavior . A new hypothesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 673.
27. Fisher, G.A.: 1957 Studies of the culture of leukemia cells invitro. Ann. NY Acad. Sci. 76: 673.
28. Cleland, W.W.: 1964 Dinitroreitol, a new protective agent for SH groups. Biochemistry 3: 480..
29. Richards, F.M. Knowles, J.R. 1968 Glutaraldehyde as a cross linking reagent. J. Mol. Biol. 37: 231
30. Parish, C.R.: 1972 Response to Chemically modified Flagellin. I. Induction of antibody tolerance to Flagellin by Aceto-acetylated derivatives of the Protein. J. Exp. Med. 134: 1
31. Jasmin, C., Piton, C. y Rosenfeld, C.: 1968. Effect de l'Iodacetamide sur les Cellules de la Léucemie viral de Rauscher. Intern. J. Cancer 3: 254

32. Treviño, G.M.N., Castañeda, M., Magdaleno, V.M., Fera, V.A.: 1973 Eritrofagia y leucofagia por trofozoitos de *E. histolytica* con cubierta exterior o sin ella. Arch. Inv. Med. Suppl. 1 5: 49
33. Carter, J.R.: 1973 Role of the sulphhydryl groups in erythrocytes membrane structure. Biochem 12: 171
34. Gray, B.N., y Watkins, E. 1975 Immunological approach to cancer therapy. Medical Clinics of North America 59 2: 327
35. Simmons, R.L., Rios, A., Ray, P.K.: 1971 Immunogenicity and antigenicity of lymphoid cells treated with neuraminidase. Nature New Biol. 231: 179.
36. Burger, M.M. 1969 A difference in the architecture of the surface membrane of normal and viral transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 69: 3727.
37. Weston, J.A., Hendricks, K.L: 1972 Reversible transformation by urea of contact inhibited fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci 69: 3727
38. Novogradsky, A., Katchalsky, E.: 1972 Membrane site modified on the induction of the transformation of lymphocytes by periodate. Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 673
39. Mittal, K.K., Mickey, M.R., Singal, D.P., Terasaki, P.I. 1968 Serotyping for homotransplantation. XVIII Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. Transplantation 6: 913
40. Bjum. A.: 1968 Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 Suppl. 97: 77.
41. Burnet, F.M. 1961 Immunological recognition of self. Science 133: 307

42. Keast, D.: 1970 Immunosurveillance and cancer. Lancet 2: 710
43. Rosenau, W., Moon, H.D.: 1961 Lysis of homologous cells by sensitized lymphocytes in tissue culture. J. Nat. Cancer Inst. 27: 471.
44. Grant, C.K., Denham, S., Hall, J.G., Alexander, P.: 1970 Antibody and complement like factors in cytotoxic action immune lymphocytes. Nature 227: 509
45. Denham, S., Grant, C.K., Hall, J.G., Alexander, P.: 1970 The occurrence of two types of cytotoxic lymphoid cells in mice immunized with allogeneic tumor cells. Transplantation 9: 366
46. Hellström, K.E., Hellström, I., Braun, J.: 1969 Abrogation of cellular immunity to antigenically foreign mouse embryonic cells by a serum factor. Nature 224: 914
47. Kaliss, N., Bryant, B.F.: 1958 Factors determining homograft destruction and immunological enhancement in mice receiving successive tumor inocula. J. Nat. Cancer Inst. 20: 691
48. Thomson, D.M., Krupey, J., Freedman, S.A. Gold. P.: 1969 The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. Proc. Nat. Acad. Sci. 64: 161
49. Currie, G.A., Basham, C.: 1972 Serum mediated inhibition of the immunological reactions of the patient to his own tumor. A possible role of circulating antigen. Br. J. Cancer 26: 427
50. Mc Sween, J., Warner, N.L., Bankhurst, A.D., Mc Kay, J.R.: 1972 Carcinoembryonic antigen in whole serum. Br. J. Cancer 26: 356.

51. Marshall, W.E., Porath, J.: 1965 The structure of glycoproteins. I. The nature and number of oligosaccharide side chains of alpha 1 acid glycoprotein, ceruloplasmin and alpha 2 globulin and metha globulin of human serum. J. Biol. Chem. 240: 209
 52. Rosenberg, S.A., Einstein, A.B.: 1972 Sialic acids on the plasma membrane of cultured human lymphoid cells. Chemical aspects and biosynthesis. J. Cell. Biol. 53: 466.
 53. Hamilton, W.J., Boyd, J.D.: 1966 Specialization of the syncytium of the human chorion Br. Med. J. 1: 1501
 54. Stonehill, E.H., Bandich, A.: 1970 Retrogenetic expression the reappearance of embryonal antigens in cancer cells. Nature 228: 370
 55. Sinkovics, J.G., Di Saia, P.J., Rutledge, F.M.: 1970 Tumor immunology and evolution of placenta. Lancet 11: 1190
 56. Currie, G.A.: 1972 Eighty years of immunotherapy: a review of immunological methods used for the treatment of human cancers. Br. J. Cancer 25: 141
 57. Sanderson, C.J., Frost, P.: 1974 The induction of tumor immunity in mice using glutaraldehyde treated tumor cells Nature 248: 190
 58. Prager, M., Derr, L., Swann, A., Cotropia, J.: 1971 Immunization with chemically modified lymphoma cells. Cancer Res. 31: 1488
 59. Prager, M.D., Baechtel, S.D., Ribble, R.J., Meths, J.M. 1974: Immunological stimulation with modified lymphoma cells in a minimally responsive tumor host system. Cancer Res. 34: 3203
-

60. Kraemer, P.M.: 1966 Sialic acid of mammalian cell lines. J. Cell. Comp. Physiol. 67: 23
61. Currie, G.S., Bagshawe, K.D.: 1968 The role of sialic acid in antigen expression. Further studies in the Land-schütz ascitis Tumor. Br. J. Cancer. 22: 843
62. Reif, A.E., Allen, J.M.V.: 1964 The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. J. Expl Med. 120: 413
63. Sclesinger, M., Yron, I.: 1969 Antigenic changes in lymphnode cells after administration of antiserum to thymus cells. Science 164: 1412
64. Currie, G.A., Bagshawe, K.P.: 1969 Tumor specific immunogenicity of methyl cholantrene induced sarcomas cells after incubation in neuraminidase. Br. J. Cancer 23: 141
65. Burger, M.M.: 1970 Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of Growth. Nature 227: 170
66. Gasic, G.J., Gasic, G.B.: 1970 Total supression of pregnancy in mice by post coital administration of neuramini-dase. Proc. Nat. Acad. Sci. 67: 793
67. Hellström, K.E., Kellström, I.: 1971 Some aspects of the immune defense against cancer. I. - In vitro studies on animal tumors. Cancer Res. 28: 1266
68. Mitchison, N.A.: 1954 Passive transfer of transplantation immunity. Proc. Roy Soc. Med. 142: 72
69. Prehn, R.T.: 1972 The immune reaction as a stimulator of tumor growth. Science 176: 170

70. Gomez, E.H., Arechavala, J., Issasi, Ch.A., Fernández Q.P., Luján, P.A.: 1971 Anticuerpos a células leucémicas. Patología 9: 195
71. Gomez, E.H., Hernández, J.P., Arellano, B.J., Fernández, Q.P.: Citotoxic antibodies in venereal sarcoma of the dog. (en prensa en Arch. de Investigación).
72. Manson, L.A., Foschi, G.V., Duplan, J.F.: 1960 Isolation of transplantation antigens from a cultured lymphoblast L5178Y Nature 188: 598