

25
2^a Edición



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Facultad de Estudios Superiores
" CUAUTITLAN "**

**"COMPORTAMIENTO DE LAS CELULAS PORTADORAS
DE RECEPTORES Fc Y C3 EN PACIENTES CON CANCER
TRATADOS CON RADIOTERAPIA "**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE CARMEN ORUETA MADRIGAL

DIRECTOR : DR. MARIO GUTIERREZ ROMERO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION.....	2
III.- GENERALIDADES.....	4
1.- RECEPTORES CELULARES DE MEMBRANA Y CELULAS QUE .. PARTICIPAN EN LA RESPUESTA INMUNE Y FAGOCITATIA..	4
-Receptores para Fc.....	4
-Receptores para C3.....	7
-Linfocitos T.....	8
-Linfocitos B.....	11
-Monocitos.....	13
-Polimorfomucleares.....	14
-Células K.....	16
-Células NK.....	16
2.- CANCER CERVICO-UTERINO.....	18
-Estudios epidemiológicos y factores riesgosos.....	18
-Aspectos inmunológicos.....	21
-Clasificación clínica.....	23
-Radioterapia.....	24
3.- EFECTO BIOLÓGICO DE LA RADIACION.....	25
-Efecto de la radiación sobre células de la médula ósea.....	27
-Efecto de la radiación sobre linfocitos T y B.....	30
IV.- OBJETIVO.....	34

V.- MATERIAL Y METODOS.....	35
-Material biológico.....	35
-Separación de leucocitos.....	35
-Sensibilización de eritrocitos de carnero para la formación de rosetas EAC.....	36
-Sensibilización de eritrocitos de bovino para la formación de rosetas EA.....	37
-Determinación de rosetas EAC.....	37
-Determinación de rosetas EA.....	38
VI.- RESULTADOS.....	39
-Comparación de las diferentes etapas clinicas con el valor del hematocrito.....	39
-Comportamiento de las rosetas EA (receptor para Fc).....	39
-Comportamiento de las rosetas EAC (receptor para C3b).....	48
VII.- DISCUSION.....	56
VIII.- CONCLUSION.....	59
IX.- GLOSARIO.....	60
X.- BIBLIOGRAFIA.....	68

RESUMEN

Es sabido que la radiación ionizante, dependiendo de la dosis, produce daño a las células hematológicas con capacidad de reproducción, fundamentalmente al tejido linfóide. En el cáncer existe también un desarreglo inmunológico que deteriora las defensas del huésped, por lo que es importante la valoración de éstas en los pacientes cancerosos tratados con radioterapia. El porcentaje de células formadoras de rosetas con eritrocitos de bovino e inmunoglobulina G, para detectar receptores para Fc (rosetas EA), con eritrocitos de carnero, inmunoglobulina M y complemento para detectar receptores para C3b (rosetas EAC) fueron determinadas en 21 pacientes con diagnóstico de cáncer cervico-uterino, quienes recibieron radioterapia. 76.19% de las pacientes mostraron estar afectadas cuando menos en una de las propiedades para formar rosetas antes del tratamiento, 9.53% mostraron porcentajes bajos de rosetas EA, 38.09% de rosetas EAC, y 28.57% en ambos tipos de rosetas. Al final del tratamiento todas mostraron porcentajes normales de rosetas EA. Los porcentajes de rosetas EAC de las pacientes que al inicio del tratamiento mostraron valores bajos, permanecieron inalterados. En las pacientes con valores normales de rosetas EAC y EA no se observó disminución de éstas por el efecto de la radiación. Estos resultados nos indican que existe daño sobre ambos tipos de células debido a la actividad tumoral y, que la radioterapia cuando elimina al tumor proporciona una aparente recuperación en las defensas del huésped. Así podemos observar que en ningún caso se observó daño en el roseteo como consecuencia de la radiación, detectado por éste método.

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

Desde hace varios años se ha observado que las neoplasias malignas humanas, a menudo se asocian con las alteraciones inmunológicas aún no bien definidas y de una complejidad todavía no totalmente comprendida. Estas alteraciones involucran tanto la respuesta inmune mediada por células como la respuesta inmune humoral.

La capacidad de montar una respuesta inmunitaria para controlar el desarrollo neoplásico se ve complicado por las propiedades biológicas de las células cancerosas, que provocan el fracaso de la respuesta inmune en su papel de controlador de la identidad celular (1-15).

Los objetivos de la inmunología del tumor son dilucidar las complejas interrelaciones inmunológicas entre el huésped y el tumor, y manejar estas relaciones con el propósito de diagnosticar, prevenir y tratar el cáncer. En la actualidad en el tratamiento del cáncer cervico-uterino, la radiación ionizante es muy usada, debido a que es capaz de curar todos los casos de cáncer, excepto un pequeño grupo radorresistente (6, 15, 16).

Es sabido que la radiación ionizante dependiendo de la dosis, produce daño a las células hematológicas con capacidad de reproducción, fundamentalmente al tejido linfoide, produciendo así alteraciones en el sistema inmunológico (16-32). Por lo que a la fecha se sabe poco como la radiación ionizante y el cáncer, afectan a las células portadoras de receptores para Fc y C3 involucradas en la respuesta inmune (1-4, 10, 14,

25, 34- 40).

Entre las pruebas diseñadas para la enumeración de células portadoras de éstos receptores se encuentran las de formación de rosetas EA (para receptores Fc), y las de rosetas EAC (para receptores del tercer factor del complemento) (5, 14, 37, 38, 41-47).

G E N E R A L I D A D E S

RECEPTORES CELULARES DE MEMBRANA Y CELULAS QUE PARTICIPAN EN LA RESPUESTA INMUNE Y FAGOCITARIA.

El camino que sigue la respuesta inmune esta determinada por las características del antígeno y por la interacción entre los linfocitos y macrófagos, así, sabemos que existen antígenos que requieren ser procesados por el macrófago para ser presentados a los linfocitos B, también los hay que requieren la cooperación entre células B y T, y algunos que solo requieren células B para la generación de inmunidad humoral. En la hipersensibilidad retardada ciertos antígenos solo requieren la presencia de linfocitos T (1, 2, 3, 5, 48).

El reconocimiento de estos antígenos es llevado a cabo por estas células a través de su membrana donde existen receptores específicos. Los diferentes tipos de células involucradas en la respuesta inmune tienen determinados tipos de receptores específicos; sabemos que existen receptores para eritrocitos, receptores para complemento, receptores para la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas (Fc), así como inmunoglobulinas de superficie sobre células B que sirven como receptores de antígeno (1-5, 34-40).

-Receptores para Fc.

La naturaleza del receptor para la porción cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas no esta entendido por completo, pero parece ser una proteína ó glicoproteína que es resis-

te a la tripsina y sensitiva a las proteasas, y distintas de las moléculas de inmunoglobulina sintetizadas por las células B (1, 34, 35).

Este receptor ha sido demostrado en una subpoblación de linfocitos T (36, 45); en linfocitos B (1, 44-46), en los que una de las funciones es su participación en ciertas formas de citotoxicidad; en macrófagos y en polimorfonucleares (1, 2, 5, 34, 35), en los que participan en los procesos de fagocitosis; en células K (5, 42, 44, 46), responsables de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos; y recientemente se demostró en células NK (5, 9), en las que produce un aumento de la citotoxicidad natural, se ha demostrado que la mayor parte de la actividad de citotoxicidad natural la poseen las células que portan el receptor Fc (9); este receptor también ha sido demostrado en células neoplásicas (14).

Así mismo, se han demostrado receptores diferentes para las porciones Fc de las diferentes clases de inmunoglobulinas en los distintos tipos de células.

Los receptores Fc_γ se han detectado sobre monocitos humanos, linfocitos B, linfocitos no-B y no-T, y en una subpoblación de linfocitos T; este receptor parece tener un papel importante en varias funciones inmunológicas tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la fagocitosis de partículas opsonizadas y la regulación de la respuesta inmune (5,34).

Cohen y col. (34) determinaron el peso molecular de este receptor en los diferentes tipos celulares, encontrando que el receptor Fc_γ de los monocitos tiene un peso molecular de 60000 a 68000, el de los linfocitos no-B de 52000 a 58000, y

los linfocitos B tienen un receptor Fc_{γ} con un peso molecular de 43000.

Otros investigadores (35) reportaron haber determinado el número de receptores Fc en macrófagos siendo éstos 6.5×10^5 receptores por célula, de naturaleza proteica y con un peso molecular de 45000 a 70000.

Los receptores Fc_E (36) han sido determinados en linfocitos B y T así como en basófilos y células cebadas; se ha observado que los linfocitos T que soportan este receptor aumentan cuando se presentan condiciones de una elevación de IgE.

El receptor Fc_{γ} se ha detectado en células T auxiliadoras y el receptor Fc_{γ} en células T supresoras. Igualmente se ha determinado un pequeño grupo de linfocitos T que soportan receptor para Fc_{γ} y Fc_E (36).

En la sangre periférica, la mayor densidad de receptor se encuentra en leucocitos polimorfonucleares, presentando los linfocitos una cantidad moderada, siendo los monocitos circulantes los que presentan una menor densidad (2, 5, 35).

El receptor Fc puede detectarse por medio de agregados de inmunoglobulinas, ó de complejos antígeno-anticuerpo marcados con material fluorescente ó radiactivo.

La técnica de rosetas EA es un método cualitativo de visualización de receptores Fc en superficies celulares, siendo su principio el siguiente: las células sospechosas de portar receptor son mezcladas con las células marcadoras llevando éstas unidas a ellas inmunoglobulinas que presentan la porción Fc la cual será captada por el receptor. Las células marcadoras más usadas son células rojas de bovino cubiertas con anticuer

pos contra ellas producidos en conejo (1, 4, 5, 14, 25-32, 41-47).

-Receptor para C3.

El receptor para la porción C3 del complemento ha sido demostrado en linfocitos T, linfocitos B, monocitos, polimorfonucleares y en células K; así como en células neoplásicas y glomerulares humanas. Es de naturaleza proteica con un peso molecular de 250000 (1, 2, 4, 5, 10, 14, 39-41, 47, 48).

La porción C3 se deposita en las células como C3b el cual subsecuentemente es transformado por el factor I para formar C3b₁ sin reducción del peso molecular, el C3b₁ se convierte a C3d por remoción enzimática del fragmento C3c. Los tres fragmentos unidos a las células aumentan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, pero el C3b₁ y el C3d aumentan la reacción mucho más fuertemente que el C3b (10). La existencia de receptores para estos tres fragmentos ha sido determinada en los diferentes tipos celulares. El receptor C3b esta presente en eritrocitos, linfocitos, polimorfonucleares y monocitos; y reacciona con la molécula intacta de C3b. El receptor C3d esta presente sobre linfocitos pero no sobre polimorfonucleares ó monocitos; el receptor C3b₁ se encuentra sobre polimorfonucleares y monocitos humanos.

La distribución de los receptores C3b en los linfocitos de sangre periférica humana no es homogénea, ya que los linfocitos que presentan receptor C3b son distintos a los que presentan C3b₁ y/o C3d (10). Las células que soportan receptores C3b₁ y C3d parecen ser células T (10, 39).

La función de estos receptores es diferente en los diversos tipos celulares; en las células B se ha sugerido que este receptor tiene la función de estimular la proliferación y diferenciación de las mismas, así como interactuar con los antígenos dependientes de células T (1). En macrófagos y polimorfonucleares interviene en los procesos de fagocitosis, lo cual se ha comprobado al observar que los antígenos son fagocitados más eficientemente en presencia de inmunoglobulinas y complemento (2). Recientemente se demostró que aproximadamente 40% de las células efectoras que participan en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos tienen receptores para C3b (10); también en linfocitos T en los cuales el 97% de las células con receptor Fc tienen también receptor para C3b (de 14 a 18% de los linfocitos identificados como T) (39).

Las células que soportan receptor C3 inducen la liberación de linfotoxinas, lo que aumenta la citotoxicidad de los linfocitos para células blanco nucleadas. Las células blanco que unen fragmento C3 aumentan fuertemente la citotoxicidad por mejoramiento del contacto célula blanco-célula efectora (39, 10).

Este receptor se determina por medio de anticuerpos de conejo desarrollado contra el receptor C3 y marcados con material fluorescente ó radiactivo; con células blanco cubiertas con las diferentes fracciones del C3; y por formación de rosetas EAC (29, 31, 41-43).

-Linfocitos T.

Los linfocitos tímicos aparecen a las nueve semanas de ges

tación, mucho antes de su aparición en los tejidos linfoides periféricos, como los ganglios linfáticos y el bazo. A pesar de que en el pasado algunos autores consideraban a los linfocitos tímicos como derivados de células epiteliales del timo, las investigaciones han comprobado que los linfocitos provienen de células emigrantes de células pluripotenciales de la médula ósea ó del hígado fetal. La parte cortical del timo tiene un moderado porcentaje de reproducción, alrededor del 95% de los linfocitos tímicos se reemplazan cada tres ó cuatro días mientras que el 5% restante parece tener una vida más larga. La mayoría de los linfocitos tímicos resultan de una serie de divisiones reduccionales dentro de la corteza del timo a partir de las células linfoides más primitivas, las que se reemplazan continuamente por un número importante de células maduras inmigrantes. En contraste con los linfocitos corticales, las células linfoides de la médula del timo tienen poca ó ninguna actividad mitótica, y es aquí donde se localizan las pequeñas cantidades de linfocitos tímicos de larga vida.

El 5% de las células del timo migran hacia las áreas timodependientes de los ganglios linfáticos y del bazo, donde actúan como progenitores de células involucradas en la respuesta inmunológica mediada por células, y como colaboradores en la producción de anticuerpos (1, 2, 3).

Una propiedad única de los linfocitos T humanos es su capacidad de formar rosetas con células rojas sanguíneas de cerro, dependiendo del método puede haber una gran variación en el porcentaje de linfocitos que forman rosetas; el aumento en

el tiempo de incubación así como la disminución de la temperatura de incubación, el tratamiento con hidrobromuro de 2-aminoetilisotiouranio ó con neuraminidasa aumenta el porcentaje de células formadoras de rosetas (4). La formación de rosetas con eritrocitos de carnero (rosetas E) requieren de iones positivos bivalentes y puede ser bloqueada por el uso de EDTA también puede ser bloqueada por enzimas proteolíticas, drogas adrenérgicas y colinérgicas, corticoides y sueros antilinfocíticos. Se ha demostrado que solo las células vivas forman rosetas E y que este receptor se forma a través de un proceso metabólico activo (37, 38).

Yodoi y col. (36) en 1979, reportaron haber encontrado un número significativo de células T que soportan receptores para Fc_{ϵ} , por formación de rosetas con eritrocitos de buey cubiertos con IgE humano, y por la unión de la fracción $F(ab')_2$ fluoresceinada de anti-IgE acomplejada con IgE, tanto en ratas como en humanos. También obtuvieron evidencia de que el receptor Fc_{ϵ} es distinto del receptor Fc_{γ} , el cual se demostró por la formación de rosetas con eritrocitos de buey cubiertos con IgG de conejo. La mezcla de rosetas probadas mostró que más de la mitad de las células T humanas que soportan al receptor Fc_{ϵ} fallaron en la unión de eritrocitos de buey cubiertos con IgG, y que algunas células formaban las dos clases de rosetas, lo que indica que tienen ambos receptores Fc_{ϵ} y Fc_{γ} (5, 45, 46).

En 1983 Wilson y col. (39) reportaron haber encontrado linfocitos T con receptores para C3b los cuales fueron identificados por la fracción $F(ab')_2$ de conejo anti-C3b sensibilizados

con isotiocianato de tetrametilrodamina y complejado con anti-F(ab')₂ de conejo para teñir los linfocitos formadores de rosetas E. El 97% de los linfocitos T que soportan receptor para la fracción C3b del complemento también fueron capaces de unir agregados IgG, lo cual indica la presencia de receptores Fc para IgG en estas células. Las células T que expresan los receptores C3b tuvieron gran núcleo y citoplasma con rebordes finos y basófilo. Esto indica que este receptor se encuentra presente en linfocitos con características determinadas.

-Linfocitos B.

Las células precursoras linfoides bajo la influencia de la bolsa de Fabricio en aves, ó de su equivalente en los mamíferos, pueden diferenciarse eventualmente en células plasmáticas productoras de anticuerpos (y responsables de la inmunidad humoral). Estas células son conocidas como linfocitos B (células bolsa dependiente ó célula médula ósea dependiente) siendo las células plasmáticas la forma extrema de la diferenciación.

Los linfocitos T y B pueden diferenciarse por su aspecto cuando se observan al microscopio electrónico, ya que las células T muestran una superficie lisa, mientras que las células B están cubiertas con microvellosidades. En el laboratorio las células T y B se identifican fácilmente por la presencia ó ausencia de marcadores de superficie.

Las células B se caracterizan por la presencia de inmunoglobulinas ligadas a la membrana (IgS) la cual se determina con antisueros heterólogos ó específicos contra un tipo de cadena, marcados con fluoresceína; por esta técnica 15 a 30% de

las células de sangre periférica se han identificado como células B. El uso de antisueros específicos contra las inmunoglobulinas individuales ha proporcionado la posibilidad de identificar las diferentes clases de inmunoglobulinas de superficie que existen en los linfocitos B, siendo que se expresan con mayor frecuencia en condiciones normales IgM, IgG e IgA, y en menor IgE e IgD las cuales son muy escasas. Existen diversos reportes respecto a la frecuencia con que se presentan estas inmunoglobulinas en las células B y en algunos casos se da la IgM como la más abundante, mientras que en otros se reporta la IgG. Las razones para estas discrepancias en los diferentes estudios no están claras aun, pero puede depender de la diferencia de los marcadores fluorescentes usados (1-5, 42).

El receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas es otro marcador de superficie de linfocitos B, este receptor fue usado para diferenciar linfocitos B de T, ya que se consideraba exclusivo de éstos, pero en años recientes también se ha demostrado en una población considerable de linfocitos T, así como en células no-B no-T. Se ha sugerido que la función de este receptor es participar en cierta forma de citotoxicidad mediada por células B (1-5, 34-38, 41-47). También se ha demostrado que un poco más de la mitad de las células Ig⁺ portan receptor de complemento, este receptor no es una sola especie molecular, y así se han detectado receptores para C3b, C3b₁, C3d, C4 y C1q, estos receptores son diferentes a los receptores para Fc (39). La función de este receptor en células B parece ser la de estimular la proliferación y diferenciación

de éstas a células plasmáticas (1-5, 39-43, 47).

-Monocitos.

El monocito es un leucocito fagocitario que se encuentra en la sangre de los vertebrados, es fácilmente distinguible de las otras células sanguíneas por ser de mayor tamaño (17-20 μm) y posee un gran núcleo oval endido en su porción media.

La renovación de monocitos sanguíneos es de alrededor de 168×10^6 células/kg/día (2). Después de abandonar la sangre y entrar en los tejidos, los monocitos se transforman en macrófagos y se tornan fagocíticos.

El sistema monocito-macrófago no es una célula en su etapa final y por lo tanto sus propiedades y funciones son más variadas y complejas que las de los demás fagocitos. El macrófago sobrevive más tiempo en los tejidos que los neutrófilos, es capaz de dividirse y transformarse, y puede ser estimulado para sintetizar diferentes enzimas y otras sustancias de acuerdo con las necesidades del momento (1, 2, 3). Es un hecho conocido desde hace tiempo que la ingestión de partículas por los fagocitos se incrementa por la presencia de factores séricos, anticuerpos específicos, anticuerpos naturales, y quizás por otros factores.

Los monocitos tienen receptores en la membrana plasmática para el reconocimiento de IgG_1 e IgG_3 y para el tercer componente activado del complemento, teniendo éstos la función de participar en los procesos de fagocitosis (1, 2, 5, 48). Además de tener una activa liberación de proteínas que están

involucradas en los procesos inmunes.

-Polimorfonucleares.

Del 60 al 75% de los leucocitos circulantes en el humano esta compuesto de neutrófilos polimorfonucleares, poseen un diámetro de 10 a 20 μ m, y su núcleo posee de 3 a 5 lóbulos con hilos estrechos de cromatina. El neutrofilo maduro es primordialmente una célula fagocitaria con dos tipos de granulos; los granulos azurófilos contienen hidrolasas ácidas, peróxidasas y lisosomas, y los granulos específicos contienen lactoferrina, algo de lisozima, y fosfatasa alcalina (2, 3, 5).

Los neutrofilos tienen una vida media de 6 a 20 horas en la sangre periférica, y son producidas a una velocidad de 1.6×10^9 células/kg/día. Estas células son capaces de emigrar hacia los estímulos (quimiotáxis) en presencia de numerosos factores quimiotácticos, incluyendo productos bacterianos, proteasa de los tejidos y componentes del complemento. El neutrofilo es capaz de fijar e ingerir materiales apropiadamente opsonizados una vez localizados en los tejidos, en virtud de portar receptores para Fc y C3.

Los neutrofilos formados en la médula ósea fluyen hacia la sangre donde se distribuyen en dos sitios: 1) en la población de granulocitos circulantes ó 2) en la población de granulocitos marginales, donde se adhieren a las paredes de las venulas postcapilares. Las células que se encuentran en estos dos sitios estan en continuo equilibrio y tienen aproximadamente igual tamaño (2).

A pesar de que la concentración leucocitaria se mantiene en el hombre normal dentro de límites definidos, puede produ-

cirse fluctuaciones por diferentes factores y condiciones, así, se ha reportado leucocitosis durante el ejercicio, los vómitos, y la ansiedad, así como en la crisis convulsivas náuseas y dolor (2, 3, 5).

Los basófilos se caracterizan por tener granulos ovaes e lectrodensos que contienen compuestos biológicamente activos, incluyendo la heparina y la histamina. Estas células se encuentran a menudo en tejido conjuntivo de la piel que rodea a los pequeños vasos sanguíneos, los folículos pilosos y el tejido adiposo. Los basófilos portan receptores que ligan la porción Fc de la inmunoglobulina IgE. Hay de cien mil a un millón de sitios receptores por célula y es univalente (2); este receptor esta relacionado con el desencadenamiento de la liberación de la histamina después de la interacción de la inmunoglobulina con el antígeno específico. Los basófilos son blancos para las inmunoglobulinas IgE en la anafilaxia y en los fenómenos alérgicos; estas células también poseen receptor para el tercer factor del complemento (2, 3, 5).

Los eosinófilos circulantes comprenden de 2 a 5% de los leucocitos de la sangre periférica poseen un diámetro de $12 \mu\text{m}$ y morfológicamente se caracterizan por sus granulos que se tiñen de color rojo amarillento con colorante de Wright. Los granulos eosinófilos son considerablemente más grandes que los granulos neutrófilos, están compuestos de una proteína básica que contiene zinc y peróxidasa pero carecen de fosfatasa alcalina, lisosima y proteínas bactericidas. La actividad principal de los eosinófilos es la defensa contra los parásitos, durante la cual se produce un aumento de eosinófilos los cuales

aumentan sus receptores con el objeto de acelerar la destrucción del parásito. Los eosinófilos tienen potencial fagocitario que ingiere complejos antígeno-anticuerpo y desempeñan un papel importante en los fenómenos alérgicos (2, 3, 5).

-Células K.

Las células K son linfocitos que carecen de los marcadores característicos de las células T y B, se encuentran presentes en tejido linfoide y sangre, soportan receptores para Fc y actúan como células efectoras en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC). Esta citotoxicidad requiere un contacto íntimo célula efectora-célula blanco, esta interacción es facilitada por la unión de las células efectoras a la porción Fc del anticuerpo, el cual está adherido a las células blanco por su porción Fab. El proceso lítico desencadenado puede ser bloqueado por la presencia de complejos inmunitarios, por agregados de inmunoglobulina y por la proteína A unida a la porción Fc de la IgG específica.

Las células K juegan un papel importante en la destrucción de células tumorales recubiertas con anticuerpo "in vivo" (5, 42, 46, 47).

-Células NK.

Las células "asesinas naturales" (NK) se han identificado repetidas veces en el bazo, ganglios linfáticos, médula ósea y sangre; carecen de inmunoglobulina de superficie ó de receptor para C3 pero poseen receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y contienen concentraciones extremadamente

bajas de antígeno marcador de células T. Las células NK no muestran actividad fagocítica y no se adhieren a la lana ó al vidrio. Por lo tanto las células NK carecen de las características de las células T, los linfocitos B ó los macrófagos. Las células NK pueden distinguirse funcionalmente de las células K, ya que la actividad NK no depende de la presencia de anticuerpos y no es inhibida por la presencia de complejos antígeno-anticuerpo. Las células NK se caracterizan por su capacidad de lisar a una extensa variedad de tipos celulares especialmente linfomas y otras células tumorales inespecíficamente (5, 9, 42).

CANCER CERVICO-UTERINO

El cáncer cervico-uterino por su gran frecuencia ha sido el mayormente estudiado entre los diversos tipos de cáncer. En nuestro medio ocupa el primer lugar de frecuencia, en relación a todas las neoplasias malignas. El cáncer cervical ocupa el sexto lugar en frecuencia en el mundo y es la novena causa de muerte (6).

El cáncer sintomático invasor puede desarrollarse a partir de pequeñas alteraciones en el epitelio, por un proceso lento el cual puede durar de 5 a 10 años antes de que aparezca el carcinoma intraepitelial (6, 15).

-Estudios epidemiológicos y factores riesgosos.

Los cánceres de las diferentes partes del tracto genital femenino tienen epidemiologías diferentes, desafortunadamente pocos estudios epidemiológicos toman en consideración la histología del tumor. Se han realizado muchos estudios epidemiológicos sobre cáncer cervical y endometrial, y el número de factores riesgosos reportados es bastante elevado. Un factor riesgoso es aquel agente que aumenta la probabilidad de contraer la enfermedad, pero esto no quiere decir que sea el agente causal.

El cáncer cervical presenta una frecuencia más alta en mujeres mayores que en mujeres jóvenes, y es el doble en mujeres negras que en blancas; en las áreas urbanas la frecuencia es mayor que en las áreas rurales, presentándose una mayor incidencia en las mujeres de zonas pobres (49).

Otros factores riesgosos que han sido reportados para este tipo de cáncer son: la actividad sexual a edad temprana, la actividad sexual con distintas personas, la preñez a edad temprana, y el número de hijos (a mayor número de hijos, mayor frecuencia). Debido a estas asociaciones, algunos autores ven al cáncer cervical como una enfermedad venérea, en el sentido de que un agente carcinogénico puede ser transferido durante el contacto sexual. Debido a que el herpes virus tipo 2 (HSV-2) se ha encontrado frecuentemente relacionado con el cáncer cervical, se ha sugerido que probablemente éste sea el factor venéreo (6, 15, 49).

Estudios sobre este aspecto realizado por Aurelian y col. (50, 51) han demostrado que mujeres con cervicitis herpética tienen un alto riesgo de 4 a 16 veces mayor de desarrollar cáncer cervical, que aquellas que no tuvieron relación con el HSV-2. La presencia de anticuerpos contra el HSV-2 es indicativo de la infección previa con el virus, y es significativamente frecuente en mujeres con cáncer cervical. La infección con el virus precede por 5 años el desarrollo de displasia, la asociación es específica y no se obtuvieron resultados similares con otros virus, ó con cáncer en otras regiones del cuerpo.

Los datos inmuno-virológicos demostraron que los pacientes con cáncer cervical, son positivos para anticuerpos contra al menos 2 antígenos virales. Estas dos proteínas son específicamente reconocidas por linfocitos en 75% de los pacientes con displasia cervical, en contraste con el 13% de los controles (51). Otro dato que sugiere que el virus herpes tipo 2

es posiblemente un factor de causa es que cuando se infectaron monos con el virus por vía vaginal, un 35% de ellos desarrollaron displasia severa no regresiva 5 años después (50).

También se ha sugerido como un carcinógeno químico el esmegma, debido a que puede producir cáncer en animales, y a que la velocidad de aparición de cáncer cervical fue baja en muchas poblaciones donde la circuncisión es común (6).

Recientemente se ha encontrado una asociación definitiva entre el uso de contraceptivos orales y el cáncer cervical. También se ha sugerido que el fumar aumenta el riesgo de neoplasia, pero debido a que siempre se ha encontrado interacción entre el fumar y otros factores riesgosos, clase social, actividad sexual, y el uso de anticonceptivos, no se ha podido dilucidar si es un agente causal directo (15, 49). Algunos autores consideran la carcinogénesis como el resultado de un conjunto de estímulos endógenos y exógenos.

En el cáncer endometrial el factor riesgoso primario es la administración de estrógeno por tiempo prolongado. En la clase social alta, se ha encontrado una frecuencia elevada de este tipo de cáncer, y aunque no se ha podido estudiar directamente, se puede determinar un mayor uso de estrógeno prescrito (49).

La menopausia latente, la irregularidad menstrual, y la ausencia ó el bajo número de hijos, son factores riesgosos para cáncer endometrial, ya que todos pueden ser evidencia directa de la secreción persistente de estrógeno. En pacientes obesas existe una mayor liberación de estrógeno por lo que la obesidad es un factor riesgoso; también la hipertensión y la

diabetes han sido relacionados con el cáncer endometrial, pero éstos están asociados con la obesidad (6, 49).

-Aspectos inmunológicos.

Existen por lo menos 5 diferentes tipos celulares que juegan un papel importante en la defensa inmune contra el tumor: 1) linfocitos T, 2) linfocitos B, 3) células K, 4) macrófagos, 5) células NK; sin embargo, es evidente que los neoplasmas se desarrollan y progresan a pesar de estas defensas del huésped. La pregunta es, ¿cómo evade el tumor la respuesta inmunológica? Varios mecanismos de escape del tumor a la destrucción por el sistema inmunitario han sido identificados, siendo los más importantes: 1) la escases ó ausencia de inmunogenicidad que presentan los tumores, 2) inmunosupresión por antígenos tumorales ó complejos antígeno-anticuerpo, 3) inducción de células supresoras, 4) inducción de factores inmunosupresivos (8).

Es evidente que las células portadoras de receptor Fc y C3 juegan un papel importante en los procesos de citotoxicidad que intervienen en la destrucción de células tumorosas, las cuales se han reportado con función deficiente en pacientes que cursan con una neoplasia maligna; así, entre muchos otros reportes encontramos los de Steinhauer y col. (11) quienes reportaron haber encontrado el mismo número de células NK en pacientes y controles, pero con una citotoxicidad bastante disminuída. Esto también fue encontrado por Fernández-Cruz y col. (12) en ratas que soportaban tumor, en las que se presentaba un elevado número de células nulas pero con escasa citotoxicidad. Encontraron también un elevado número de células

T supresoras y una disminución de células T ayudantes. La existencia de un factor inmunosupresivo liberado por los linfocitos T supresores, el cual bloquea el rechazo de un tumor en ratones inmunes fue reportado por Greene y col. (13).

Así también se ha demostrado que los complejos antígeno-anticuerpo pueden estimular células supresoras e inhibir la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

Por lo tanto, el bloqueo ó supresión de las células citotóxicas puede ser producido por complejos antígeno-anticuerpo, por factores inmunosupresivos ó por la interacción simultánea de células efectoras con células supresoras, ó por los distintos procesos activados en conjunto.

Otros factores que favorecen el desarrollo del tumor son: inmunosupresión debido a la vejez, el uso de ciertas drogas, timectomía neonatal, anestesia, cirugía, ó algún daño que suprime el mecanismo inmune (5-8, 11, 12, 13, 15).

Un factor importante es la tolerancia inmunológica, si uno es expuesto a antígenos en vida temprana ó si el paciente falla para reconocer un antígeno como extraño el proceso de la enfermedad puede continuar expandiéndose. Ya que los tumores permanecen como una sola célula es probable que en cierto instante el huésped considere a clones particulares de células como propios, y no desarrolle una respuesta inmune (5, 6, 8).

La tolerancia adquirida también es una razón para la falla de la respuesta inmune, muy frecuentemente pequeñas cantidades de antígeno dan repetidamente estímulos al desarrollo de una tolerancia adquirida (5, 8). Otro factor en la falla de la respuesta inmune es el aumento inmunológico, se ha demostrado

que el suero canceroso puede proteger al animal, sin embargo, ciertas inmunoglobulinas humorales no son citolíticas, cuando estos anticuerpos recubren a las células tumorales, ellas producen complejos que protegen a las células contra ataques de células destructoras (3, 5-8).

La inmunoselección es otra falla de la respuesta inmune, las células cancerosas continúan y constantemente mutan, algunas contienen más antígeno que otras, y éstas atraen más anticuerpos a su superficie y son eliminadas, esto aumenta la sobrevivencia de las células antigénicamente débiles (7).

-Clasificación clínica.

La clasificación clínica del cáncer cervico-uterino más usada es la publicada por la International Federation of Gynecology and Obstetrics (6, 15).

Etapa 0 .- Carcinoma "in situ" conocido como carcinoma preinvasor ó intraepitelial.

Etapa I .- El carcinoma se halla estrictamente limitado al cuello.

Etapa Ia.- Microinvasión.

Etapa Ib.- Los demás casos de la etapa I.

Etapa II.- El carcinoma se extiende más allá del cuello pero no ha alcanzado las paredes pelvianas, afecta la vagina pero no en su tercio inferior.

Etapa IIa.- Sin invasión del parametrio.

Etapa IIb.- Con invasión del parametrio.

Etapa III.- El carcinoma ha alcanzado la pared pelviana.

Afecta el tercio inferior de la vagina.

Etapa IV .-El carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis, ó ha invadido la mucosa de vejiga y recto.

Etapa IVa.-Invasión a vejiga y recto.

Etapa IVb.-Extensión más allá de la pared pélvica.

-Radioterapia.

En el tratamiento del cáncer cervico-uterino la radiación es más usada pues es capaz de curar todos los casos de cáncer, excepto un pequeño grupo de radiorresistentes. Puede utilizarse para cualquier estadio de la enfermedad y es aplicable a pacientes muy obesas, a las de edad avanzada ó a las de mal pronóstico. Los resultados últimos de la radiación varían mucho según la etapa clínica, los diversos reportes indican que es más efectiva en las etapas clínicas I y II decreciendo según aumenta la etapa (6).

Sabiendo que la radiación es oncogénica, se ha sugerido que el tratamiento de cáncer cervico-uterino con radioterapia puede producir leucemia y enfermedades mieloproliferativas debido a la irradiación de la médula ósea activa de la pelvis. También se ha sugerido la asociación entre la irradiación del cáncer cervico-uterino y la aparición subsecuente de cáncer de colón, vejiga y tejido linfoide (16).

EFECTO BIOLÓGICO DE LA RADIACIÓN

El mecanismo por medio del cual las células cancerosas son destruidas por la radiación se desconocen aun. Pero se sabe que tiene un mayor efecto sobre las células que se dividen activamente, en las cuales se detiene el proceso mientras persiste la radiación, pero la velocidad de recuperación vuelve a la normalidad prontamente después, si la dosis no fue demasiado grande; con una dosis mayor aparecerán células degeneradas es decir, células que mueren antes de que sufran una nueva división, y su pérdida es compensada por las células normales; pero si la dosis es masiva, la proporción de células degeneradas formadas se hace mayor y aun aumenta más cuando se para la irradiación conduciendo así a la destrucción del tejido. Por lo tanto, los tejidos que se dividen activamente son propensos a sufrir mayor daño, es decir, son más radiosensitivos, y en éstos se incluyen médula ósea, órganos reproductores, los recubrimientos internos de esófago y los recubrimientos de intestinos. Los menos sensibles son los vasos sanguíneos, músculos, cerebro y células nerviosas. El efecto producido por la irradiación en el cuerpo depende del área irradiada (5, 15, 17, 20).

Dosis grandes de irradiación producen enrojecimiento de la piel y pueden dar origen eventualmente a su destrucción ó a un cáncer de piel, también puede destruir los órganos de reproducción produciendo esterilidad en el sujeto. Dependiendo de la dosis los daños pueden ser permanentes ó temporales (17).

El efecto de la radiación puede ser dividido en tres categorías: el efecto somático ó lesión a las células del cuerpo. Incluido en esta categoría esta la lesión del sarcoma osteogénico, que se forma a consecuencia del depósito de material radioactivo en los huesos. La segunda categoría consiste en las lesiones genéticas, como las alteraciones de las células germinales que desempeñan un papel en procesos hereditarios. Los efectos somáticos estan limitados a los individuos expuestos, mientras que los efectos genéticos pueden ser transmitidos por generaciones.

Un tercer efecto es la reducción del tiempo de vida en relación a la que se espera sea el tiempo de vida de un individuo, ésto ha sido demostrado en animales pero no en humanos (18).

El daño cromosómico debido a la radiación ionizante es conocido desde hace mucho tiempo, y ha sido objeto de estudio tanto "in vivo" como "in vitro". Las alteraciones cromosómicas que se pueden observar son estructurales fundamentalmente, rompimiento, traslocación, cromosomas disétricos ó en anillos. Si las alteraciones ocurren en las células somáticas, el desequilibrio cromosómico puede en teoría llevar a una neoplasia maligna, y si las alteraciones se presentan en tejido gonadal el problema potencial es de teratogénesis.

En un estudio realizado por Azyadeh Cobo y col. (19) en un grupo de personas expuestas a la radiación ionizante por tiempos variables y un grupo control no expuesto, obtuvo evidencia de que el número de rompimientos cromosómicos es suficientemente mayor en los individuos expuestos, y que se

presenta correlación entre el tiempo de exposición y los daños cromosómicos (19).

-Efecto de la radiación sobre células de la médula ósea.

En 1970 Senn y McCulloch (20) midieron la sensibilidad a la radiación de las células de la médula ósea en un medio de cultivo, encontrando que la dosis requerida para reducir la sobrevivencia en un 37% con respecto al control (D_0) era igual a 137 rads, reportaron también que la habilidad para formar colonias disminuía con el aumento de la dosis de radiación.

Este último resultado también fue observado por Neumann, Lühr y Fauser en 1981 (21), quienes al medir la sensibilidad a la radiación para reuniones de progenitores de la médula ósea encontraron una D_0 de 114 ± 8 rads, y la sensibilidad a la radiación para progenitores hematopoyéticos pluripotentes, los cuales fueron separados por gradiente de centrifugación como células con una densidad menor a 1.077 g/ml, fue $D_0 = 91 \pm 7$ rads.

La diferencia en el valor de D_0 para reuniones de progenitores de la médula ósea encontrados por ellos y el reportado por Senn y McCulloch (20) fue interpretado como debido al uso del factor estimulante de colonia usado para las células irradiadas, ya que éste puede influir el valor de D_0 .

En el mismo año Mori y col. (22) diseñaron un sistema de cultivo en el cual proliferan las células tallo hematopoyéticas las cuales fueron suspendidas en una colonia de células adherentes y reportaron haber observado con este método que las células de la médula ósea irradiadas "in vitro" en estas

condiciones, pueden repoblar a la misma velocidad que aquellas bajo condiciones "in vivo". Por lo que se sugirió que la función que soporta la hematopoyésis es radiorresistente. También observaron que la concentración de células tallo pluripotentes, y de células precursoras de granulocitos macrófagos fue mayor en los cultivos irradiados que en los cultivos controles no irradiados tres semanas después de la irradiación. Concluyeron que esto puede deberse a la modificación del microambiente por las células estromales irradiadas, las cuales liberan un factor estimulante de colonia para el crecimiento de estas células. A los pocos días Mori publicó un experimento diseñado para dilucidar si las células de la médula ósea irradiadas recibían algún estímulo para la replicación y la diferenciación de las colonias de células estromales. Para ello cultivaron células tallo de la médula ósea irradiadas y no irradiadas, sobrepuestas en las colonias adherentes normales, en este cultivo la proliferación de las células tallo fue sostenida. En cambio cuando se irradiaron las colonias de células estromales adherentes resultó en un aumento de autorreplicación de las células tallo de la médula ósea reinoculadas, lo que indica la liberación de factores estimulantes de la proliferación de las células tallo por células estromales.

La concentración de células hematopoyéticas pluripotentes disminuyó grandemente después de la irradiación, seguida de un aumento significativo con el tiempo cuando el sistema de cultivo completo fue irradiado. Concluye que la diferenciación y replicación de las células tallo ocurre cuando el microam-

biente es alterado, y que la recuperación puede deberse a la diferencia en el estado de las células en el ciclo celular, el cual depende de la concentración de éstas (23).

Bouteiller y col. (24) en el mismo año reportaron haber encontrado un aumento en el número de células B en ratones irradiados a los cuales se les protegió de los miembros traseros. El ratón recibió 750 rads, la médula ósea fue extraída 24 horas después y colocada en un medio de cultivo por 2 y 24 horas, al termino de las cuales las células con un alto nivel de inmunoglobulinas (IgS), y células con bajo nivel de ellas fueron medidas. A las 2 horas de cultivo no se encontró diferencia entre los controles y los irradiados; a las 24 horas las células contadas en ambos cultivos mostraron un aumento, pero al considerar las células con alto contenido de inmunoglobulinas de superficie y las células con bajo nivel de éstas por separado, se pudo observar que en los cultivos controles el aumento se debió a ambos tipos de células, mientras que en los cultivos experimentales fue esencialmente debido a un aumento en las células con alto contenido de inmunoglobulinas. En otra prueba, en la que las células de la médula ósea fueron cultivadas en presencia de timidina tritiada, mostró, que las células con alto contenido de inmunoglobulina de superficie no incorporaron timidina tritiada, lo que indica que la mayoría de estas células no muestran síntesis de DNA "in vitro".

De lo anterior se deduce que la diferenciación se lleva a cabo durante el cultivo y no "in vivo", y del hecho de que las células con alto contenido de IgS incorporasen muy poca

timidina tritiada "in vivo" se dedujo que el aumento de células B no se debe a la reproducción celular sino a una diferenciación. De la observación de que las células con alto contenido de inmunoglobulinas de superficie aumentará en los cultivos irradiados y disminuirán las células con bajo contenido de ésta, sugiere la posibilidad de que éstas se conviertan en células con alto contenido de inmunoglobulinas de superficie (24).

En 1983 (25) fue publicado un trabajo realizado en el laboratorio de investigación del servicio de hematología del Hospital General de la S.S.A. demostrando que la radiación ionizante no solo lesiona al tejido hematopoyético sino que también causa disminución de los receptores para inmunoglobulina (receptor Fc) encontrando una $D_0 = 60$ rads para las células hematopoyéticas de ratón que expresan este receptor (25).

Extrapolando estos resultados a seres humanos hacen la observación de que a la dosis usual, aplicada a enfermos, se lesiona la expresión de los receptores Fc antes de que se inicie la disminución celular provocando un deterioro en los mecanismos inmunológicos.

-Efectos de la radiación sobre linfocitos T y B.

La radiosensibilidad de poblaciones de células T y células B ha sido estudiado ampliamente pero aun existen contradicciones entre los diferentes reportes, siendo a pesar de ello muy importantes. (Así encontramos que en el año de 1977 Anderson y col. (26) después de irradiar ratones con dosis de 5, 50, y 500 rads y sacrificarlos a diferentes tiempos postirradiación, evaluaron el número de células dependientes del timo y células

dependientes de la médula ósea en el bazo, nudo linfoide, placa de Peyer, ducto torácico y sangre periférica. Encontraron que la depleción de las células B ocurre más aprisa y es más pronunciada en el bazo y en los nudos linfoides que la caída de las células T, la caída de las células T y B fue aproximadamente igual en sangre periférica y en el ducto linfoide torácico, también observaron que la regeneración de las células T ocurre más prontamente que la restauración de las células B (26). En el mismo año, en otro trabajo publicado valoraron el número de células T recirculantes en ratas después de la irradiación, reportaron que se presenta una aguda disminución de células T relacionada con la dosis. Presentándose una caída dependiente entre cero y 50 rads, una meseta entre 50 y 300 rads, y una aguda caída entre 300 y 500 rads.

Cuando un injerto de piel histoincompatible fue aplicado en los ratones que recibieron de 5 a 50 rads, el injerto fue tolerado por 5 días, en cambio cuando la radiación fue de 50 a 300 rads esta tolerancia fue eliminada y el injerto rechazado, en cambio cuando el ratón fue irradiado con 500 rads el injerto fue aceptado en contraste con los grupos controles no irradiados. Por lo que ellos concluyeron que los linfocitos T involucrados en el rechazo de injerto son más radiorresistentes que los involucrados en el desarrollo de tolerancia (27).

Entre los trabajos realizados en sangre periférica de humanos se encuentran los de Stjernswärd y col. en 1972 (28) quien estudió los cambios en la distribución de linfocitos T y B en pacientes con carcinoma mamario y reportó haber encontrado

una linfopenia marcada inmediatamente después de la irradiación la cual es prolongada por más de un año, y una respuesta disminuída a la estimulación de la fitohemaglutinina, también que los linfocitos B de sangre periférica varían de 35% antes de la radiación a 56% después de ésta, y los linfocitos T que forman rosetas E disminuyeron de 55 a 50%, concluyendo que la irradiación destruye selectivamente a los linfocitos T (28).

En cambio, Nordman y Toivanen en 1978 (29) en estudios realizados en pacientes con cáncer de mama, pulmón, y de cabeza y cuello reportaron que los porcentajes y la relación de células T y B permanece inalterado. Aunque encontraron una linfopenia marcada inmediatamente después de la irradiación, siendo mayor en los grupos de pacientes con cáncer de mama y pulmón, y es más moderada en aquellos pacientes con cáncer de cabeza y cuello, también reportaron haber encontrado una baja respuesta a la estimulación con fitohemaglutinina.

Como se puede observar, al comparar estos resultados con los de Stjernswärd, ellos están de acuerdo en la existencia de una leucopenia duradera y en que el funcionamiento de los linfocitos T se encuentra alterado; no así, en cual de las subpoblaciones de células T ó B se presenta más radiosensibilidad (29).

Nordman y Toivanen en 1981 (30) reafirmaron sus observaciones de que en las pacientes con cáncer de mama, después de la radiación, existe un número reducido de linfocitos, pero que la relación de linfocitos T y B no sufre alteración.

Otros estudios respecto a los efectos de la radiación sobre los linfocitos humanos es el realizado por Birkeland (31)

quien irradió linfocitos humanos "in vitro" y midió la capacidad de formación de rosetas con eritrocitos de carnero a 18 horas de incubación (rosetas E), a 30 min de incubación (rosetas E espontáneas), así como la formación de rosetas usando eritrocitos humanos del grupo A, anti-A de conejo y complemento de ratón (rosetas HEAC). Estos estudios demostraron que la capacidad de los linfocitos para formar rosetas E espontáneas fue inhibida después de 100 rads. La capacidad para formar rosetas E normales fue inhibida a 500 rads; y la capacidad para formar rosetas HEAC (células B) fue radiorresistente. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Szczylik (32) cuando midió la radisensibilidad de los linfocitos "in vitro"; ya que él encontró, que las células más radiosensitivas eran las que forman rosetas E espontáneas, siguiendo en orden de radisensibilidad las células formadoras de rosetas EAC (células B), siendo las más radiorresistentes las células formadoras de rosetas E normales. Estas contradicciones pueden deberse a las diferencias de métodos.

Un trabajo muy importante es el realizado por Agarwal y col. (33) quienes midieron el efecto de los rayos X sobre la replicación del DNA en linfocitos humanos. Para ello midieron la incorporación de timidina tritiada en leucocitos estimulados con fitohemaglutinina después de la radiación "in vitro" obteniendo una D_0 de 340 rads. En comparación con la síntesis de DNA encontraron que el efecto de la radiación X sobre el RNA y la síntesis de proteína en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina fue menos marcada, así mismo que los rayos X no inhibieron ni la inducción ni la síntesis continua de DNA polimerasa en respuesta a la fitohemaglutinina (33).

O B J E T I V O

Se propone demostrar "in vitro" en pacientes con cáncer cervico-uterino y tratados con radioterapia el comportamiento de las células portadoras de receptores Fc y C3, cuantificadas por formación de rosetas EA y EAC respectivamente, durante el tratamiento de radiación.

Así mismo valorar el estado inmunológico que presentan las pacientes antes del tratamiento.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

-Material biológico.

Pacientes: fueron estudiados 21 pacientes con diagnóstico de cáncer cervico-uterino (Ca Cu) elegidos al azar en diferentes etapas clínicas candidatos a recibir radioterapia con una unidad de Cobalto 60 (Atomic Energy of Canadá. Modelo Dorado 78), la fuente de Co-60 con diámetro de 1.5 cm. tiene un rendimiento actual de 61 rads por min. a 80 cm. de distancia para un campo de 35 X 35 cm.

El tratamiento consistió en 20 a 25 sesiones recibiendo 2 Gy (medida de radiación equivalente a 100 rads) dosis-tumor por sesión, siendo el total de la dosis al finalizar el tratamiento de 32 a 50 Gy dosis-tumor.

Muestras de sangre venosa de 5 a 10 ml. fueron obtenidas en tubos con heparina antes y después de la primera dosis de radiación, siendo seguidas durante todo el tratamiento mediante muestreo semanal hasta concluir el tratamiento de radiaciones.

Controles: los controles fueron 47 personas voluntarias de edades similares a la de las pacientes a quienes se les practicó biometría hemática como control de salud, fueron muestreadas con 5 ml. de sangre venosa la cual fue trabajada paralelamente con las muestras de las pacientes.

-Separación de leucocitos.

Muestras de 5 a 10 ml. de sangre venosa fresca son mezcladas con 0.1 ml. de heparina (Lipo-heparin, 1000 UI/ml, Lab. Riker S.A. de C.V., México) en un tubo de ensaye y centrifugadas 20

min. a 2000 rpm (Centrifuga; CRU-5000, Damon/IEC Division, EE.UU.) después de lo cual la capa leucocitaria que queda encima de la capa de eritrocitos, es retirada con una pipeta Pasteur y pasada a un tubo de Wintrobe, centrifugada de nuevo 15 min. a 2000 rpm. A continuación la capa de leucocitos se separa y se lava con solución amortiguadora de fosfatos pH=7.2 (PBS) durante 10 min. a 1500 rpm tres veces consecutivamente. Inmediatamente después éstos son resuspendidos en un ml. de PBS pH = 7.2 y se precede a realizar una cuenta celular viable, se ajusta la suspensión a una concentración de 4×10^6 células/ml en PBS (37, 40).

-Sensibilización de eritrocitos de carnero para la formación de rosetas EAC.

Se lavan por centrifugación 2 ml. de sangre total de carnero con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH = 7.2 durante 10 min. a 1500 rpm tres veces consecutivamente. Ya lavados se prepara una solución de eritrocitos de carnero al 5% en PBS, de esta suspensión se toman 5 ml. y se incuban 30 min. a 37°C , en baño de agua con 5 ml. de amboceptor (anticuerpos IgM de conejo anti.células rojas de carnero. Amboceptor 6000, Behring Institute, Germany) diluída 1/2000 en PBS.

Después de la incubación las células son lavadas tres veces y resuspendidas en PBS pH = 7.2, a continuación 5 ml. de complemento humano (suero fresco) diluído 1/50 en PBS son añadidos y la suspensión es incubada a 37°C durante 10 min.

Finalmente las células son lavadas tres veces y ajustadas a una solución al 2% en PBS (28, 37, 40).

-Sensibilización de eritrocitos de bovino para la formación de rosetas EA.

Se lavan por centrifugación 2 ml. de eritrocitos de bovino con PBS pH = 7.2 durante 10 min. a 1500 rpm consecutivamente tres veces. Ya lavados se prepara una suspensión de eritrocitos de bovino al 2% en PBS pH = 7.2. De esta suspensión se toman 5 ml. y se incuban 30 min. a 37°C en baño de agua con 5 ml. de IgG (IgG de conejo anti-células rojas de bovino, producida por el laboratorio de Investigación Hematológica del Hospital General de la Ciudad de México S.S.A.) diluída 1/100 en PBS.

Después del período de incubación las células son lavadas tres veces consecutivamente en PBS pH = 7.2 y ajustadas a una concentración al 2% en PBS (32, 36).

-Determinación de rosetas EAC.

De la suspensión de eritrocitos de carnero sensibilizados con amboceptor y complemento, 0.25 ml. son adicionados a 0.25 ml. de la suspensión de leucocitos de 4×10^6 células/ml, y mezcladas. La suspensión centrifugada a 1500 rpm durante un min. al termino del cual los tubos son colocados en posición vertical e incubados por 60 min. a 4°C, finalmente las células son resuspendidas con agitación suave y se procede a realizar una cuenta de 200 leucocitos, tomando como rosetas aquellos leucocitos que ligen más de tres eritrocitos de carnero (28, 31, 32, 37, 40).

-Determinación de rosetas EA.

De la suspensión de eritrocitos de bovino sensibilizados con IgG, 0.25 ml. son adicionados a 0.25 ml. de la suspensión de leucocitos de 4×10^6 células/ml. La suspensión se centrifuga a 1500 rpm durante un min., al final del cual los tubos son colocados en posición vertical e incubados por 60 min. a 4°C , finalmente las células son resuspendidas con agitación suave, y se procede a realizar una cuenta de 200 leucocitos, tomando como rosetas aquellos leucocitos que ligan más de tres eritrocitos (4, 32, 36).

R E S U L T A D O S

-Comparación de las diferentes etapas clínicas con el valor del hematocrito.

En la tabla I se muestra la relación de 21 pacientes involucradas en el estudio, edad, hematocrito antes del tratamiento, diagnóstico, así como la dosis-tumor de radiación total recibida.

El número de casos en las diferentes etapas clínicas fueron: un caso en etapa clínica Ia, 3 en la IIa, 7 en la IIb, 2 en la IIIa, 6 en la IIIb y, 2 casos en los cuales la etapa clínica no se pudo determinar por haber sufrido cirugía fuera del hospital.

Al comparar la etapa clínica con el hematocrito no se observa que exista relación entre ellos, tampoco entre el hematocrito y la edad.

Solo 6 casos (28.57%) tuvieron hematocrito menor del 40%.

-Comportamiento de las rosetas EA (receptor para Fc).

En la tabla II se muestran los porcentajes de rosetas EA (valor promedio de dos determinaciones contando 200 leucocitos y tomando como roseta aquellos leucocitos que ligan más de tres eritrocitos), obtenidos para las 21 pacientes a diferentes dosis de radiación.

Se puede observar que de las 21 pacientes, 13 de ellas (61.90%) presentaron porcentajes normales de rosetas EA antes del tratamiento y, 8 (38.09%) mostraron bajo porcentaje de éstas (referido a $41.66 \pm 5.2\%$ de los controles).

RELACION DE PACIENTES INVOLUCRADAS EN EL ESTUDIO

Pacientes	Edad (Años)	Hematocrito %	Diagnostico	Dosis (Gy)
1	39	48.0	Ca Cu I	40
2	37	42.1	Ca Cu IIa	50
3	35	32.4	Ca Cu IIa	40
4	56	40.0	Ca Cu IIa	40
5	42	34.9	Ca Cu IIb	32
6	60	42.2	Ca Cu IIb	40
7	75	45.6	Ca Cu IIb	40
8	36	44.2	Ca Cu IIb	40
9	55	41.1	Ca Cu IIb	40
10	64	40.0	Ca Cu IIb	40
11	62	40.9	Ca Cu IIb	40
12	69	45.7	Ca Cu IIIa	40
13	60	41.0	Ca Cu IIIa	40
14	32	20.9	Ca Cu IIIb	40
15	59	46.0	Ca Cu IIIb	50
16	56	40.4	Ca Cu IIIb	40
17	25	34.8	Ca Cu IIIb	40
18	54	46.0	Ca Cu IIIb	40
19	26	34.0	Ca Cu IIIb	40
20	38	29.6	Rec. a cirugía	38
21	48	43.2	Rec. a cirugía	40

TABLA I.- Relación de 21 pacientes con diagnóstico de cáncer cervico-uterino en diferentes etapas clínicas, con edades que fluctuaron de 25 a 75 años, y hematocrito de 20.9 a 48.0% antes del tratamiento. Las dosis de radiación aplicadas variaron de 32 a 50 Gy.

El total de casos con diagnóstico de Ca Cu antes del tratamiento mostró en promedio valores de 37.95% de células portadoras de receptor Fc, lo cual comparado con el promedio de $41.66 \pm 5.2\%$ obtenido de 47 casos de los controles manifiesta una diferencia significativa, estadísticamente ($\alpha = 0.05$), como se muestra en el estudio estadístico de la tabla de cálculos 1.

Al finalizar el tratamiento el promedio de rosetas EA de todos los casos se encontró en 46.28%, lo cual cae dentro del rango normal. Se observa que de las 8 pacientes que antes del tratamiento mostraron porcentajes bajos de rosetas EA, al finalizar éste, el total de éstas se recuperó. Aquellas pacientes (13 casos) que al inicio presentaron valores normales se conservaron sin variación durante el tratamiento.

En la tabla III se comparan los porcentajes de rosetas EA obtenidos antes del tratamiento y al finalizar éste, de las 21 pacientes involucradas en el estudio.

Cuando se tomó en cuenta el promedio total de los porcentajes de rosetas EA antes del tratamiento y al finalizar éste ($\bar{x} = 37.95\%$ y $\bar{x} = 46.28\%$, respectivamente), el análisis estadístico realizado usando la prueba t de student en pares apareados, mostró un aumento significativo estadísticamente ($\alpha = 0.001$), como se muestra en el estudio estadístico de la tabla de cálculos 2.

PORCENTAJE DE CELULAS FORMADORAS DE ROSETAS EA (PARA P_c) A DIFERENTES DOSIS DE RADIACION

Pacientes	Etapa Clínica	Dosis en Gy																				
		0	2	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	36	38	40	42	50
1 ^a	I	33 ^b	34	-	-	-	51	-	-	-	-	-	-	52	-	-	41	-	-	43	-	-
2	IIa	46	47	-	-	-	-	46	-	-	40	-	-	44	-	-	32	-	-	-	48	43
3	IIa	50	48	-	-	-	46	-	-	-	-	52	-	-	-	50	-	-	48	-	-	
4	IIa	45	57	-	-	-	44	-	-	-	-	49	-	-	-	41	-	-	50	-	-	
5 ^a	IIb	26	25	-	-	-	28	-	-	-	-	-	40	-	-	45	-	-	-	-	-	
6 ^a	IIb	28	28	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	43	-	-	46	-	46	-	-	
7	IIb	39	42	-	42	-	-	-	-	-	-	36	-	-	-	40	-	-	41	-	-	
8 ^a	IIb	26	29	-	46	-	-	-	-	-	-	32	-	-	-	47	-	-	47	-	-	
9 ^a	IIb	25	28	-	-	-	59	-	-	-	-	55	-	-	-	47	-	-	56	-	-	
10	IIb	44	44	-	-	-	53	-	-	-	-	43	-	-	-	41	-	-	43	-	-	
11	IIb	41	52	-	-	-	51	-	-	-	-	48	-	-	-	45	-	-	48	-	-	
12	IIIa	42	37	-	-	-	57	-	-	-	-	48	-	-	-	14	-	-	49	-	-	
13	IIIa	37	32	49	-	-	-	-	-	-	-	-	44	-	-	47	-	-	47	-	-	
14	IIIb	40	44	-	-	43	-	-	34	-	-	-	-	46	-	45	-	-	40	-	-	
15	IIIb	43	46	-	-	-	-	38	-	-	38	-	-	-	42	-	-	-	40	-	38	
16	IIIb	36	34	-	-	-	59	-	-	-	-	-	53	-	-	53	-	-	53	-	-	
17	IIIb	52	50	-	-	-	48	-	-	-	-	54	-	-	-	53	-	-	49	-	-	
18 ^a	IIIb	33	42	-	-	-	53	-	-	-	-	51	-	-	-	52	-	-	45	-	-	
19	IIIb	46	46	-	-	-	48	-	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	50	-	-	
20 ^a	Hpc. y cirugía	33	36	-	-	40	-	-	-	-	43	-	-	-	40	-	-	46	-	-	-	
21 ^a	Hpc. y cirugía	32	30	-	-	41	-	-	-	-	38	46	-	-	-	40	-	-	45	-	-	

^a Pacientes con valores bajos de rosetas EA, antes del tratamiento.

^b Porcentaje promedio de dos determinaciones de rosetas EA, contando 200 leucocitos.

TABLA II.- Porcentaje de rosetas EA obtenidos para 21 pacientes con diagnóstico de cáncer cervico-uterino a diferentes dosis de radiación aplicada con una unidad de Cobalto 60 (rayon Gamma). 8 de las pacientes mostraron porcentajes bajos de rosetas EA antes del tratamiento.

CALCULOS ESTADISTICOS.

Pacientes	Basal	x^2
1	33	1089
2	46	2116
3	50	2500
4	45	2025
5	26	676
6	28	784
7	39	1521
8	26	676
9	25	625
10	44	1936
11	41	1681
12	42	1764
13	37	1369
14	40	1600
15	43	1849
16	36	1296
17	52	2704
18	33	1089
19	46	2116
20	33	1089
21	<u>32</u>	<u>1024</u>
	797	31529

Tabla de calculos 1.- Prueba de t de student para rosetas EA (para Fc). Comparación entre el porcentaje de rosetas de las pacientes antes del tratamiento y los valores de los controles.

Pacientes

$$\bar{x} = 37.95$$

$$(\sum x)^2 = 635209$$

$$S^2 = \frac{31529 - \frac{635209}{21}}{20} = 64.05$$

$$Sd = 8.003$$

Planteando la hipótesis:

 $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ corresponden a la misma población. $H_a = \mu_1 \neq \mu_2$ corresponden a diferentes poblaciones.

$$V = \sqrt{\frac{21(64.05) + 47(27.04)}{66}} = 6.3$$

$$t = \frac{37.95 - 41.66}{6.3 \sqrt{1/21 + 1/47}} = \frac{-3.71}{1.65} = -2.2484$$

Para $\alpha = 0.05$, $t_{0.95} = 2.09$ (de tablas)

$$|2.24| > 2.09$$

Siendo $|2.24|$ mayor que 2.09 rechazamos la hipótesis de que las medias corresponden a la misma población, y aceptamos que las medias corresponden a diferentes poblaciones.

Controles

$$\bar{x} = 41.66$$

$$Sd = 5.2$$

$$n = 47$$

ROSETAS EA PARA RECEPTOR Fc

COMPARACION ENTRE LA BASAL (S/RAD) Y ULTIMA DOSIS DE RADIACION

Pacientes	Etapa Clínica	% Rosetas EA Basal	Final
1°	I	33	43
2	IIa	46	43
3	IIa	50	48
4	IIa	45	50
5°	IIb	26	45
6°	IIb	28	46
7	IIb	39	41
8°	IIb	26	47
9°	IIb	25	56
10	IIb	44	43
11	IIb	41	48
12	IIIa	42	49
13	IIIa	37	47
14	IIIb	40	40
15	IIIb	43	38
16	IIIb	36	53
17	IIIb	52	49
18°	IIIb	33	45
19	IIIb	46	50
20°	Rec. a cirugía	33	46
21°	Rec. a cirugía	32	45
		$\bar{x} = 37.95\%$	$\bar{x} = 46.28\%$

*Pacientes con bajo porcentaje de rosetas EA antes del tratamiento

TABLA III.- Comparación de los resultados obtenidos antes del tratamiento e inmediatamente después de finalizar éste. Se observa que al final del tratamiento todos los pacientes muestran valores normales.

CALCULOS ESTADISTICOS

Par no.	Final	Basal	d	d ²
1	43	33	+10	100
2	43	46	-3	9
3	48	50	-2	4
4	50	45	+5	25
5	45	26	+19	361
6	46	28	+18	324
7	41	39	+2	4
8	47	26	+21	441
9	56	25	+31	961
10	43	44	-1	1
11	48	41	+7	49
12	49	42	+7	49
13	47	37	+10	100
14	40	40	0	0
15	38	43	-5	25
16	53	36	+17	289
17	49	52	-3	9
18	45	33	+12	144
19	50	46	+4	16
20	46	33	+13	169
21	45	32	+13	169
			<u>175</u>	<u>3249</u>

Tabla de calculos 2.- Prueba t de student para rosetas EA (para Fc). Comparación entre la basal y última muestra postirradiación.

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n}$$

$$\bar{d} = 8.333$$

$$S^2 = \frac{3249 - \frac{30625}{21}}{20} = 89.53$$

$$S_d = 9.46$$

Para probar que $\mu_d = \mu_2 - \mu_1 = 0$

proponemos la siguiente hipótesis:

$H_0 = \mu_d = 0$ no existe diferencia entre las muestras.

$H_a = \mu_d \neq 0$ existe una diferencia entre las muestras.

$$t = \frac{8.33}{2.064} = 4.035$$

Para $\alpha = 0.001$, $t_{0.999} = 3.55$ (de tablas)

$$|4.035| > 3.55$$

Siendo $|4.035|$ mayor que 3.55 podemos afirmar que existe una diferencia significativa entre las medias de las muestras.

-Comportamiento de las rosetas EAC (receptor para C3b).

En la tabla IV se muestran los porcentajes de rosetas EAC (valor promedio de dos determinaciones contando 200 leucocitos y tomando como rosetas aquellos leucocitos que liguen más de tres eritrocitos), obtenidos para las 21 pacientes a diferentes dosis de radiación.

Se puede observar que antes del tratamiento solo 7 de las 21 pacientes (33.33%) mostraron porcentajes normales de rosetas EAC, las 14 restantes (66.66%) mostraron porcentajes por debajo del porcentaje promedio de los controles.

El total de los casos con diagnóstico de Ca Cu antes del tratamiento mostró en promedio valores de células portadoras de receptor C3 de 16.66%, lo cual comparado con el promedio de $23.94 \pm 4.02\%$ obtenido de 47 casos de los controles manifiesta una diferencia significativa estadísticamente, $= 0.005$, como se puede observar en el estudio estadístico de la tabla de calculos 3.

Al final del tratamiento se observa que de aquellas pacientes que al inicio del tratamiento mostraron porcentajes bajos de células formadoras de rosetas EAC solo 2 de ellas (2 de 14 (14.28%)), mostraron valores normales, y de las 7 pacientes que mostraron valores normales al inicio, al final 2 de ellas mostraron valores bajos. En suma, al final del tratamiento 14 (66.66%) pacientes se encontraron con valores bajos de rosetas EAC.

En la tabla V se comparan los porcentajes de rosetas EAC, obtenidos antes del tratamiento y al finalizar éste, de las 21 pacientes involucradas en el estudio.

PORCENTAJE DE CELULAS FORMADORAS DE ROSETAS EAC (PARA C3) A DIFERENTES DOSIS DE RADIACION

Pacientes	Etapa Clínica	Dosis en Gy																				
		0	2	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	36	38	40	42	50
1°	I	7 ^b	6	-	-	-	19	-	-	-	-	-	19	-	-	9	-	-	13	-	-	-
2	IIa	47	39	-	-	-	-	12	-	-	8	-	-	18	-	-	14	-	-	-	16	19
3	IIa	19	15	-	-	-	14	-	-	-	-	19	-	-	-	38	-	-	20	-	-	-
4	IIa	26	20	-	-	-	17	-	-	-	-	27	-	-	-	22	-	-	25	-	-	-
5°	IIb	16	10	-	-	-	27	-	-	-	-	-	13	-	-	14	-	-	-	-	-	-
6	IIb	24	19	-	-	16	-	-	-	11	-	-	-	-	15	-	-	12	-	12	-	-
7°	IIb	15	10	-	10	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	14	-	-	11	-	-	-
8°	IIb	13	8	-	13	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	3	-	-	15	-	-	-
9°	IIb	9	16	-	-	16	-	-	-	-	-	17	-	-	-	3	-	-	13	-	-	-
10°	IIb	10	6	-	-	-	20	-	-	-	-	5	-	-	-	5	-	-	8	-	-	-
11°	IIb	12	11	-	-	-	11	-	-	-	-	18	-	-	-	18	-	-	25	-	-	-
12	IIIa	23	17	-	-	-	22	-	-	-	-	19	-	-	-	7	-	-	24	-	-	-
13°	IIIa	5	4	17	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	2	-	-	13	-	-	-
14°	IIIb	17	12	-	-	10	-	-	17	-	-	-	-	16	-	19	-	-	13	-	-	-
15°	IIIb	11	10	-	-	-	9	-	-	15	-	-	-	-	14	-	-	-	7	-	7	-
16°	IIIb	8	10	-	-	-	11	-	-	-	-	12	-	-	-	20	-	-	22	-	-	-
17	IIIb	19	14	-	-	-	19	-	-	-	-	23	-	-	-	25	-	-	27	-	-	-
18°	IIIb	15	16	-	-	-	17	-	-	-	-	22	-	-	-	34	-	-	16	-	-	-
19°	IIIb	10	10	-	-	-	17	-	-	-	-	13	-	-	-	19	-	-	13	-	-	-
20	Rec. y cirugía	26	18	-	-	18	-	-	-	11	-	-	-	-	10	-	-	15	-	-	-	-
21°	Rec. y cirugía	17	12	-	-	18	-	-	-	8	5	-	-	-	-	9	-	-	16	-	-	-

*Pacientes con valores bajos de rosetas EAC antes del tratamiento.

^bPorcentaje promedio de dos determinaciones de rosetas EAC contando 200 leucocitos.

TABLA IV.- Relación de los porcentajes de rosetas EAC obtenidos para 21 pacientes con diagnóstico de cáncer cervico-uterino. Se puede observar que 13 pacientes mostraron porcentajes bajos de rosetas EAC antes del tratamiento.

CALCULOS ESTADISTICOS

Pacientes	Basal	x^2
1	7	49
2	47	2209
3	19	361
4	26	676
5	16	256
6	24	576
7	15	225
8	13	169
9	9	81
10	10	100
11	12	144
12	23	529
13	5	25
14	17	289
15	11	121
16	8	64
17	19	361
18	15	225
19	10	100
20	26	676
21	<u>17</u>	<u>289</u>
	364	7525

Tabla de calculos 3.- Prueba de t de student para rosetas EAC (para C3). Comparación entre el porcentaje de rosetas de las pacientes antes del tratamiento y los valores de los controles.

Pacientes

$$\bar{x} = 16.61$$

$$(\sum x)^2 = 121801$$

Controles

$$\bar{x} = 23.94$$

$$Sd = 4.02$$

$$n = 47$$

$$S^2 = \frac{7525 - \frac{121801}{21}}{20} = 86.25$$

$$S = 9.3$$

Planteando la hipótesis:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 \text{ corresponden a la misma población.}$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \text{ corresponden a diferentes poblaciones.}$$

$$V = \sqrt{\frac{21(86.25) + 47(16.61)}{66}} = 6.24$$

$$t = \frac{16.61 - 23.94}{6.24 \sqrt{1/21 + 1/47}} = -4.47$$

Para $\alpha = 0.005$, $t_{0.995} = 2.85$ (de tablas)

$$|4.47| > 2.85$$

Siendo $|4.47|$ mayor que 2.85 rechazamos la hipótesis de que las medias corresponden a la misma población, y aceptamos que las medias corresponden a diferentes poblaciones.

Se puede observar que los valores medios de rosetas EAC anteriores y posteriores al tratamiento de radiación, $\bar{x}=16.61\%$ y $\bar{x}=16.38\%$ respectivamente, se encuentran por debajo de la media normal ($23.94 \pm 4.02\%$).

El análisis estadístico utilizando la prueba t de student en pares apareados, mostró que no hay diferencia significativa estadísticamente entre los porcentajes de rosetas formadas antes y al final del tratamiento, como se muestra en el estudio estadístico de la tabla de calculos 4.

ROSETAS EAC PARA RECEPTOR C3

COMPARACION ENTRE LA BASAL (S/RAD) Y ULTIMA DOSIS DE RADIACION

Pacientes	Etapa	% Rosetas EAC	
	Clínica	Basal	Final
1°	I	7	13
2 ^b	IIa	47	19
3 ^b	IIa	19	20
4 ^b	IIa	26	25
5°	IIb	16	14
6	IIb	24	12
7°	IIb	15	11
8°	IIb	13	15
9°	IIb	9	13
10°	IIb	10	8
11 ^{ab}	IIb	12	25
12 ^b	IIIa	23	24
13°	IIIa	5	13
14°	IIIb	17	13
15°	IIIb	11	7
16 ^{ab}	IIIb	8	22
17 ^b	IIIb	19	27
18°	IIIb	15	16
19°	IIIb	10	13
20	Rec. a cirugía	26	15
21°	Rec. a cirugía	17	16
		$\bar{x}=16.61$	$\bar{x}= 16.24$

°Pacientes con bajo porcentaje de rosetas EAC antes del tratamiento.

^bPacientes con valores normales de rosetas al final del tratamiento.

TABLA V.- Comparación de los resultados obtenidos antes del tratamiento e inmediatamente después de éste. Se observa que al inicio del tratamiento 14 pacientes muestran porcentajes bajos de rosetas.

CALCULOS ESTADISTICOS

Par no.	Final	Basal	d	d ²
1	13	7	+6	36
2	19	47	-28	784
3	20	19	+1	1
4	25	26	-1	1
5	14	16	-2	4
6	12	24	-12	144
7	11	15	-4	16
8	15	13	+2	4
9	13	9	+4	16
10	8	10	-2	4
11	25	12	+13	169
12	24	23	+1	1
13	13	5	+8	64
14	13	17	-4	16
15	7	11	-4	16
16	22	8	+14	196
17	27	19	+8	64
18	16	15	+1	1
19	13	10	+3	9
20	15	26	-11	121
21	16	17	-1	1
			<u>-8</u>	<u>1668</u>

Tabla de calculos 4.- Prueba t de student para rosetas EAC (para C3). Comparación entre la basal y última muestra postirradiación.

$$\bar{d} = -0.381$$

$$s^2 = \frac{1668 - \frac{64}{20}}{20} = 83.4$$

$$S_d = 9.13$$

Para probar que $\mu_d = \mu_2 - \mu_1 = 0$

proponemos la siguiente hipótesis:

$H_0 = \mu_d = 0$ no existe diferencia entre las muestras.

$H_a = \mu_d \neq 0$ existe una diferencia entre las muestras.

$$t = \frac{-0.381}{1.99} = -0.1911$$

Para $\alpha = 0.05$, $t_{0.95} = 1.73$ (de tablas)

$$|0.1911| < 1.73$$

Siendo $|0.1911|$ menor que 1.73 podemos afirmar que no existe una diferencia entre las medias de las muestras.

DISCUSION

Se ha observado que en los pacientes que cursan con neoplasias malignas se presentan alteraciones inmunológicas que afectan tanto la respuesta inmune mediada por células, como la respuesta inmune humoral.

En el presente estudio se encontró diferencia estadística significativa en el porcentaje de células formadoras de rosetas entre las pacientes con cáncer cervico-uterino y los controles tanto para rosetas EA como para rosetas EAC, observándose que el 76.19% de ellas mostraron valores bajos cuando menos en un tipo de rosetas, lo que refleja que en éstas puede existir una alteración inmunológica.

Las células que portan receptores Fc y C3 juegan un papel importante en los procesos de citotoxicidad que intervienen en la destrucción de células tumorales, así tenemos que, los linfocitos T, linfocitos B, células K, macrófagos y células NK destruyen e impiden la proliferación de células cancerosas (1-7). Sin embargo, es evidente que el neoplasma es capaz de evadir ó bloquear el ataque de estas células; varios mecanismos de escape del tumor a la destrucción por el sistema inmunitario han sido identificados, encontrándose entre los más importantes: 1) la escases ó ausencia de inmunogenicidad que presentan algunos tumores, 2) inmunosupresión por antígenos tumorales liberados, ó formación de complejos antígeno-anticuerpo, 3) inducción de células supresoras, 4) inducción de factores inmunosupresivos. Entre los trabajos sobre este aspecto encontramos los de Steinhauer y col. (11) quienes reportaron haber encontrado en pacientes con neoplasias que el número de

células NK era igual tanto en pacientes como en controles, pero con una citotoxicidad bastante disminuída. Fernández-Cruz y col. (12) encontraron que en ratas que soportaban tumor se presentaba un alto número de células nulas con escasa citotoxicidad, así mismo, que en éstos existía un elevado número de células T supresoras. Greene y col. (13) reportaron la existencia de un factor inmunosupresivo liberado por los linfocitos T supresores, el cual bloquea el rechazo de un tumor en ratones inmunizados. Así mismo se ha demostrado que los complejos antígeno-anticuerpo pueden estimular células supresoras e inhibir la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

Por lo tanto, el bloqueo ó supresión de las células citotóxicas puede ser producido por complejos antígeno-anticuerpo, por factores inmunosupresivos, ó por la interacción simultánea de células efectoras con células supresoras, ó por los distintos procesos activados en conjunto.

Los resultados obtenidos en este estudio antes del tratamiento mostraron que los porcentajes de células formadoras de rosetas EA (para Fc) y EAC (para C3b) se encontraban por debajo del rango normal, el 9.53% de las pacientes mostró valores bajos de rosetas EA y el 38.09% de rosetas EAC, y 28.57% en ambos tipos de rosetas. Esta baja en células formadoras de rosetas puede reflejar el efecto del tumor sobre el sistema inmunológico. Así también, la evidencia de que los porcentajes de células formadoras de rosetas EA al finalizar el tratamiento se encontraban dentro del rango de normalidad, concuerda con las observaciones realizadas por varios investigadores (6-8), de que al suprimir el tumor, el paciente suele convertirse de un paciente inmunoincompetente en uno que es immuno-

competente. También con la observación de que las células inmunosupresoras son muy radiosensitivas y son eliminadas por el tratamiento radioterapéutico, retornando el sistema inmune a su actividad normal.

Aunque existen muchos reportes (20-32) sobre el efecto de la radiación sobre las células del sistema inmunológico, la mayoría de ellos se contradicen, y por lo general la radiación es llevada a cabo en sistemas "in vitro", ó en ratones a los que se aplica radiación de cuerpo entero, siendo las condiciones muy diferentes a las que prevalecen cuando la radiación se aplica a una porción limitada del cuerpo, en la que es difícil calcular el volumen sanguíneo irradiado así como la dosis de radiación que las células sanguíneas reciben. Además, el sistema inmunológico sufre constantemente una renovación regulada por diversos factores fisiológicos, por lo que si el sistema inmune sufre algún daño por efecto de la radiación, no es posible dilucidarlo por éste método, ya que en ningún momento se presentó una disminución en el número de células formadoras de rosetas que pudiera atribuirsele.

Estos resultados abren una puerta de interes, y aunque no son concluyentes indican que se debe estudiar más a fondo al respecto.

C O N C L U S I O N

De acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo podemos concluir que:

- 1.- En las pacientes con cáncer cervico-uterino se presenta una posible alteración inmunológica que afecta a las células portadoras de receptores para Fc y/o C3b.
- 2.- Las células con receptor para C3b son posiblemente afectadas más frecuentemente que las portadoras de receptor para Fc.
- 3.- El tratamiento de radioterapia produjo un aumento en el porcentaje de rosetas EA formadas.
- 4.- No se observa daño por la radioterapia sobre las células portadoras de receptor para Fc y/o C3b detectable por este método.

G L O S A R I O

AMBOCEPTOR (Inmunoglobulina M): anticuerpo que fija complemento.

ANTICUERPO: proteína producida como resultado de la introducción de algún antígeno y que tiene la capacidad para combinarse con el antígeno que estimuló su producción.

ANTIGENO: sustancia que puede ó no inducir una respuesta inmunitaria localizable cuando es introducida en un animal.

BOLSA DE FABRICIO: el órgano del intestino posterior (terminal) localizado en la cloaca de las aves que controla la ontogenia de los linfocitos B.

BASOFILOS: leucocitos pertenecientes a los granulocitos ó polimorfonucleares que toman los colores básicos de la anilina tiñéndose de color azul.

CANCER: cualquier clase de tumor maligno no importando su localización.

CARCINOGENO: todo aquello capaz de inducir la aparición de tumores malignos.

CELULAS B (Linfocitos B): células estrictamente derivadas de la bolsa de Fabricio en las aves, y por analogía, células equivalentes a las derivadas de la bolsa en especies no aviares. Las células B son las precursoras de las células plasmáticas que producen anticuerpos.

CELULAS CEBADAS: células de los tejidos que se parecen a los basófilos de la sangre periférica y que contienen granulos con serotonina e histamina.

CELULAS EFECTORAS: son las causantes de la reacción inmunita-

ria mediada por células, como la respuesta de hipersensibilidad cutánea retardada, el rechazo de tejidos extraños de injertos y de tumores, y la eliminación de células infectadas por virus.

CELULAS ESTROMALES: células provenientes del tejido fibroso conectivo de sostén de un órgano.

CELULAS K: células destructoras "Killer" responsables de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.

CELULAS NK (Células asesinas naturales): células citotóxicas que pertenecen a la clase celular responsable de la citotoxicidad celular sin sensibilización previa.

CELULAS NULAS: células que carecen de marcadores específicos identificadores de superficie para los linfocitos T ó B.

CELULAS PLASMATICAS: células sintetizadoras de anticuerpos totalmente diferenciadas que provienen de los linfocitos B.

CELULAS PLURIPOTENTES: capacidad de una célula para diferenciarse en diferentes tipos celulares.

CELULAS T (Linfocitos T): células derivadas del timo que participan en diversas reacciones inmunitarias mediadas por células.

CELULAS T AUXILIADORAS: subpoblación de linfocitos T que cooperan con las células B en la formación de anticuerpos.

CELULAS T SUPRESORAS: subpoblación de linfocitos T que suprimen la producción de anticuerpos por las células B, ó inhiben otras reacciones de inmunidad celular por las células T efectoras.

CIRCUNCISION: escisión total ó parcial del prepucio.

CITOLISIS: destrucción celular.

CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS DEPENDIENTES DE ANTICUERPOS (ADCC): forma de citotoxicidad mediada por linfocitos, en la cual algunas células efectoras destruyen células blanco recubiertas de anticuerpos, probablemente por el reconocimiento de la región Fc del anticuerpo fijado a la célula, a través de un receptor Fc presente en el linfocito receptor.

COMPLEMENTO: sistema de proteínas séricas que es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo. Sustancia termolábil del suero normal, que destruye las bacterias y otras células con las que se pone en contacto por medio del amboceptor.

CRÓMOSOMA: nombre de pequeños cuerpos en forma de bastoncillos en asa en que se divide la cromatina del núcleo celular en la mitosis.

DISPLASIA: es una anomalía, una irregularidad del proceso formativo y del desarrollo de un tejido, órgano ó parte corporal.

D₀: dosis requerida para producir una reducción en la sobrevivencia de una población en un 37% con respecto al control.

DROGAS ADRENERGICAS: fármaco de acción similar a la de la adrenalina, se aplica a todas las aminas estimulantes de las terminaciones postganglionares simpáticas, como efedrina, amfetaminas y similares.

DROGAS COLINERGICAS: se aplica a los medicamentos que directa ó indirectamente estimulan las terminaciones nerviosas parasimpáticas.

ENDOGENO: de origen interno.

ENDOMETRIO: es la mucosa del útero que tapiza las paredes de la cavidad interna del órgano.

ENFERMEDAD VENEREA: se denominan venereas aquellas infecciones que se contraen después de la cúpula carnal con personas infectadas, efectuada por vía normal ó anormal, también puede ser contraída fuera de todo contacto sexual, por objetos infectados.

ESMEGMA: sustancia blanquesina parecida al queso reblandecido y algo seco formado entre el prepucio y el glande, parte del pene, representa el producto de secreción de algunas glandulas locales.

ESTROGENO: hormona del ovario y placenta, que estimula las formaciones y características sexuales secundarias en la hembra, y cuya producción aumenta en el embarazo.

EOSINOFILOS: leucocitos pertenecientes a los granulocitos ó polimorfonucleares que toman la eosina (color ácido de la anilina) coloreándose de rojo.

EXOGENO: de origen externo.

FACTORES BLOQUEADORES: sustancia que se encuentra en el suero de animales portadores de tumor y que son capaces de bloquear la cualidad de los linfocitos inmunizantes para destruir las células tumorales.

FACTOR DE RIESGO: todos aquellos agentes ó factores que aumentan el riesgo de contraer la enfermedad.

FAGOCITOSIS: ingestión de microorganismos ó de partículas por los leucocitos.

FRAGMENTO F(ab')₂: fragmento fijador de antígeno formado por

la digestión peptica de las moléculas de inmunoglobulinas.
FRAGMENTO Fc: fragmento cristalizabile obtenido por la digestión de moléculas de IgG con papaína, no tiene capacidad fijada de antígeno, pero determina características importantes de la molécula intacta.

GONODAS: glándulas sexuales (testículo y ovario).

Gy: medida de la radiación que equivale a 100 rad.

HEMATOPOYESIS: producción de glóbulos rojos y blancos de la sangre por parte de la médula ósea, del bazo y de los ganglios linfáticos.

HAPTENO: sustancia no inmunógena que puede reaccionar con un anticuerpo de especificidad apropiada.

HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA: reacción inmunitaria mediada por células que puede ser provocada por la inyección subcutánea de antígeno, con un infiltrado celular subsiguiente y edema que son máximos entre 24 y 48 horas después de la provocación con el antígeno.

HISTAMINA: amina bioactiva que provoca contracciones del músculo liso, de los bronquiolos humanos y de sus vasos pequeños, aumento de la permeabilidad capilar y de la secreción de las glándulas mucosas de bronquios y nariz.

INMUNIDAD HUMORAL: aquella cuyos factores activos son los anticuerpos en los líquidos orgánicos.

INMUNIDAD CELULAR: inmunidad en la cual la participación de los linfocitos y macrófagos es predominante.

INMUNOGLOBULINA: una glucoproteína compuesta de cadenas pesadas y ligeras que funcionan como anticuerpo. Todos los anticuerpos son inmunoglobulinas, pero no es cierto que to

das las inmunoglobulinas tengan la función de anticuerpo.

LEUCEMIA: la alteración sanguínea que caracteriza a esta grave afección no consiste solamente en el aumento de los leucocitos normales, sino sobre todo en la aparición en la circulación de la sangre de numerosos glóbulos blancos jóvenes e inmaduros.

LINFOCINAS (llamadas también mediadores de la inmunidad celular): productos solubles de los linfocitos que son responsables de los múltiples efectos de la reacción inmunitaria celular.

LINFOTOXINAS: linfocina que da como resultado la citólisis directa después de su liberación a partir de los linfocitos estimulados.

MACROFAGOS: fagocitos mononucleares que derivan de los monocitos de la médula ósea y desempeñan papeles accesorios en la inmunidad celular.

MENOPAUSIA: fenómeno fisiológico de involución senil del organismo femenino que consiste en el cese definitivo de las menstruaciones.

MITOSIS: proceso de reproducción celular.

MONOCITOS: fagocitos mononucleares, precursores de los macrófagos de los alveolos pulmonares y de las cavidades peritoneal y pleural.

NEOPLASIA: formación de tejido nuevo tanto normal como patológico.

NEUTROFILOS: se denominan así aquellos leucocitos polimorfo nucleares de la sangre que se colorean solo mediante la combinación de dos colorantes, uno ácido y uno básico.

ONCOGENO: significa generador de tumor según la etimología griega, por lo tanto, es oncógeno cualquier agente físico ó químico capaz de provocar el desarrollo de una formación tumoral.

ONTOGENIA: la historia del desarrollo de un organismo individual dentro de un grupo de animales.

OPSONIZACION: significa preparar el alimento. Es el proceso de recubrimiento de los microorganismos por los anticuerpos preparandolos para ser fagocitados.

PARAMETRIO: tejido conectivo laxo que circunda la superficie externa del útero.

PBS: solución buffer de fosfatos.

PINOCITOSIS: ingestión de material soluble por las células.

POLIMORFONUCLEARES (granulocitos): células fagocíticas compuestas por tres tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos y basófilos, portadores de vacuolas fagocíticas y lisosomas.

QUIMIOTAXIS: proceso mediante el cual los fagocitos son atraídos a la vecindad de los patógenos invasores.

REACCION LINFOCITARIA MIXTA: una prueba in vitro para la inmunidad celular, en la cual los linfocitos ó leucocitos de individuos genéticamente diferentes están mezclados y estimulan de manera natural la síntesis de DNA.

RECEPTORES Fc: receptores presentes sobre diversas subpoblaciones de leucocitos para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.

RECEPTOR C3: receptor presente en diversos tipos celulares para la porción C3 del complemento.

ROSETAS EA: rosetas formadas con eritrocitos sensibilizados

con inmunoglobulina G, para determinar receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas sobre linfocitos B, macrófagos y granulocitos.

ROSETAS EAC: grupo de eritrocitos sensibilizados con antígeno (IgM) y complemento alrededor de los linfocitos B humanos.

TERATOGENESIS: origen ó modo de producción de un ser deforme.

TIMO: glándula de secreción interna situada en la raíz anterior del cuello de los niños.

TRICOMONIASIS: infección por tricomonas vaginalis, protozoo que se desarrolla parasitariamente en las paredes de la vagina.

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

- 1.- Rowlands, D.T., y Daniele, R.P.: Surfaces receptors in the immune response. *New Eng. J. Med.* 293: 26-32, 1975.
- 2.- Wintrobe, M.M., Lee, G.R., Bithelli, T.C., Boggs, D.R., Athens, J.W., y Foester, J.: *Hematología Clínica. Inter-Medicina*, Buenos Aires, 1979, pag. 290-344.
- 3.- Gordon, B.L.: Lo esencial de la inmunología. *Manual Moderno S.A.*, México, 1982, pag. 6-26.
- 4.- Bowman, W.P., Malvin, S., y Mauer, A.M.: Cell markers in lymphomas and leukemias. *Adv. Internal. Med.*, 25: 391-425. 1980.
- 5.- Stites, D.P., Fudenberg, H.H., Stobo, J.D., y Wells, J.V.: *Inmunología básica y clínica. El manual moderno*, México, 1983, pag. 17-19, 90-8, 273-4.
- 6.- Novak, E.R., Seegar, J.G., y Jones, H.W.: *Tratado de ginecología*. Editorial Interamericana S.A. de C.V., 1977, 239-81.
- 7.- Barber, H.R.K., y Dorsett, B.: Immunologic aspects of gynecologic cancer. *Cancer*, 48: 472-83, 1981.
- 8.- Kumar, K., y Peny, R.: Escape of tumors from immunological destruction. *Pathology*, 14: 173-9, 1982.
- 9.- Herberman, B., Bartram, S., Stephen, H.J., Nunn, M., Holden, T., y West, H.W.: Fc receptors on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells. *J. Immunol.*, 119: 322-5, 1977.
- 10.- Perlmann, H., Perlmann, P., Schreiber, R., y Müller-Eberhard, H.: Interaction of target cell-bound C3bi and C3d with

human lymphocyte receptors. Enhancement of antibody-mediated cellular cytotoxicity. *J. Exp. Med.*, 153: 1592-1603, 1981.

- 11.-Steinhauer, H., Doyle, T., Reed, J., y Kadish, S.: Defective natural cytotoxicity in patients with cancer: normal number of effector cells but decreased recycling capacity in patients with advanced disease. *J. Immunol.*, 129: 2255-59, 1982.
- 12.-Fernández-Cruz, E., Gilman, S., y Feldman, D.J.: Altered levels of mononuclear leukocytes in tumor-bearing rats: decrease of helper T lymphocytes and increase of suppressor cells. *J. Immunol.*, 129: 1324-8, 1982.
- 13.-Greene, M.I., Fujimoto, S., y Schon, A.H.: Regulation of the immune response to tumor antigens. Characterization of thymic suppressor factor(s) produced by bearing hosts. *J. Immunol.*, 119: 757-63, 1977.
- 14.-Noltenius, H.W.: Fc and complement receptors on malignant tumor cells. *Cancer*, 48: 1761-7, 1981.
- 15.-Pelayo, C., Arias, S.J., Perez, T.R., y Carbonell, L.: Texto de patología. La prensa médica mexicana, México, 1970, pag. 486-511, 548-55.
- 16.-Messerschmidt, G.L., Hoover, R., y Young, R.: Gynecologic cancer treatment: Risk factors for therapeutically induced neoplasia. *Cancer*, 48: 442-50, 1981.
- 17.-Strettan, J.S.: Radiaciones ionizantes. Alhambra S.A., Madrid, 1967, pag. 153-73.
- 18.-Taylor, L.S.: Responsabilidad médica en el uso de la radiación. *Rev. Med. Radiol.*, XVIII: 22, 1964.

- 19.-Cobo, A., Gabilondo, F., y Lisker, R.: Alteraciones cromosómicas en radiólogos y técnicos en radiología. Rev. Mex. Radiol., 25: 63-7, 1971.
- 20.-Senn, J.S., y McCulloch, E.A.: Radiation sensitivity of human bone marrow cells measured by a cell culture method. Blood, 35: 56-60, 1970.
- 21.-Neumann, H.A., Löhr, G.W., y Fauser, A.A.: Radiation sensitivity of pluripotent hemapoietic progenitors (CFU_{GEMM}) derived from human bone marrow. Exp. Hematol., 9: 742-44, 1981.
- 22.-Mori, K.J., Kumagai, K., Seto, A., e Ito, Y.: In vitro repopulation of haemopoietic stem cells after irradiation. J. Radiat. Res., 22: 312-22, 1981.
- 23.-Mori, K.J.: Patterns of proliferation and differentiation of irradiated haemopoietic stem cells cultured on normal 'stromal' cell colonies in vitro. J. Radiat. Res., 22: 344-51, 1981.
- 24.-Le Bouteiller, P.P., Asherson, G.L., y Edwards, A.J.: Control of B-cell maturation in mice. I.-Increased B-cell maturation in vitro by bone marrow protected during whole body irradiation. Immunol., 42: 267-76, 1981.
- 25.-Weiss, S.B., Diaz, P.R., Gutierrez, R.M., Sámano, G.G., Villanueva, T.L., Nieto, R.F., y Gaminio, G.E.: Efecto de la radiación ionizante sobre la inducción a la aparición de receptores Fc en células de médula ósea. Rev. Mex. Radiol., 37: 139-42, 1983.
- 26.-Anderson, E.R., Olson, G.B., Autry, J.R., Howart, J.L., Troup, G.M., y Bartels, P.H.: Radiosensitivity of T and B

- lymphocytes. IV.-Effects of whole irradiation upon various lymphoid tissues and numbers of recirculating lymphocytes. *J. Immunol.*, 118: 1191-99, 1977.
- 27.-Anderson, R.E., y Williams, W.L.: Radiosensitivity of T and B lymphocytes. V.-Effects of whole-body irradiation on numbers of recirculating T cells and sensitization to primary skin grafts. *Am. J. Pathol.*, 89: 367-78, 1972.
- 28.-Stjernswärd, J., Jondal, M., Vánky, F., Wigzell, H., y Sealy, R.: Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet*, 2: 1352-6, 1972.
- 29.-Nordman, E., y Toivanen, A.: Effects of irradiation on the immune function in patients with mammary, pulmonary or head and neck carcinoma. *Acta Radiol. Onc.* 17: 3-8, 1978.
- 30.-Toivanen, A., y Nordman, E.: Long-term effect of post-operative irradiation on the immune function in patients with mammary carcinoma. *Acta Radiol. Onc.*, 20: 119-24, 1981.
- 31.-Birkeland, S.: Influence of irradiation on the capacity of human T and B lymphocytes to form E and HEAC rosettes. *Transplantation*, 29: 23-4, 1980.
- 32.-Szczylik, C., y Wiktor-Jedrzejczak, W.: The effects of X-irradiation in vitro on subpopulations of human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 39: 253-63, 1981.
- 33.-Agarwal, S.S., Katz, E.J., Krishan, A., y Loeb, L.A.: DNA replication in X-irradiated human lymphocytes. *Cancer*, 41: 3973-8, 1981.
- 34.-Cohen, L., Sharp, S., y Kulcsycki, A.: Human monocytes, B lymphocytes, and non-B lymphocytes each have structurally

- unique Fc_γ receptors. *J. Immunol.*, 131: 378-83, 1983.
- 35.-Yagawa, K., Onoue, K., y Aida, Y.: Structural studies of Fc receptors. I.-Binding properties, solubilization, and partial characterization of Fc receptors of macrophages. *J. Immunol.*, 122: 366-73, 1979.
- 36.-Yodoi, J., e Ishizaka, K.: Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. I.-Presence of human and rat T lymphocytes with Fc_γ receptors. *J. Immunol.*, 122: 2577-83, 1979.
- 37.-Jondal, M., Holm, G., y Wigzell, H.: Surface markers on human T and B lymphocytes. I.-A large population of lymphocytes forming non immune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.*, 136: 207-15, 1972.
- 38.-Barriga, C., y Peña, J.: Receptores de linfocitos T que forman rosetas E y su mecanismo de síntesis. *Sangre*, 24: 129-34, 1979.
- 39.-Wilson, J., Tedder, T.F., y Pearson, D.T.: Characterization of human T lymphocytes that express the C3b receptor. *J. Immunol.*, 131: 684-9, 1983.
- 40.-Bianco, C., Patrick, R., y Nussenzweig, V.: A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I.-Separation and characterization. *J. Exp. Med.*, 132: 702-20, 1970.
- 41.-Bertoglio, J., y Dore, J.F.: Techniques de separation et d'identification des lymphocytes humains: Identification de sous-populations de lymphocytes humains par certains marqueurs de surface. *Inserm*, 57: 89-95, 1976.
- 42.-Fournier, C., y Bach, J.F.: Techniques de separation et d'identification des lymphocytes humains: Les techniques

des rosettes E, EAC, et EA chez l'homme. Inserm 57: 105-12, 1976.

- 43.-Pepys, M.B.; Techniques de separation et d'identification des lymphocytes humains: Characterization and enumeration of lymphocyte populations in whole peripheral blood. Application to B cells. Inserm, 57: 145-51, 1976.
- 44.-Froland, S.S.: Techniques de separation et d'identification des lymphocytes humains: Identification of human Fc-receptor-bearing lymphocytes. Inserm, 57: 191-6, 1976.
- 45.-Samarut, C., Brochier, J., y Revillard, J.P.: Techniques de separation et d'identification des lymphocytes humains: Identification des cellules a recepteur Fc par une methode de rosettes EA. Inserm, 57: 197-201, 1976.
- 46.-Gordier, G., y Samarut, C.: Techniques de separation et d'identification des lymphocytes humains: Identification et proprietes des cellules a recepteurs de haute avidite pour le fragment Fc des IgG. Inserm, 57: 203-7, 1976.
- 47.-Perlmann, H., Wahlin, B., y Perlmann, P.: Techniques de separation et d'identification des lymphocytes humains:
 1.-Detection of antibody dependent lymphocytic effector cells (K-cells) in human blood by a plaque assay.
 2.-Depletion of C3-receptor lymphocytes by an EAC-rosette depletion technique. Inserm, 57: 231-4, 1976.
- 48.-North, R.J.: The concept of the activated macrophage. J. Immunol., 121: 806-8, 1978.
- 49.-Berg, J.W., y Lampe, J.G.: High-risk factors in gynecologic cancer. Cancer, 48: 429-41, 1981.
- 50.-Aurelian, L.: Variants and antigens of herpes type 2 in

cervical carcinoma. *Cancer Res.*, 33: 1539-47, 1973.

51.-Aurelian, L., Kessler, I.I., Rosenshein, N.B., y Barbour, G.: Viruses and gynecologic cancers: Herpes virus protein (ICP 10/AG-4); a cervical tumor antigen that fulfills the criteria for a marker of carcinogenicity. *Cancer*, 48: 455-71 , 1981.