

2ij: 49

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

"EVALUACION DEL EFECTO MICROBICIDA DE  
LEUCOCITOS HUMANOS EN PACIENTES CON  
CANCER CERVICO UTERINO"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :

VERONICA VAZQUEZ MONTERO



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

	<u>PÁGINA</u>
INTRODUCCION.....	1
FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
OBJETIVOS.....	12
HIPOTESIS.....	13
MATERIAL.....	14
METODOS.....	19
RESULTADOS.....	28
DISCUSION.....	45
CONCLUSIONES.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	50

## EVALUACION DEL EFECTO MICROBICIDA DE LEUCOCITOS HUMANOS EN PACIENTES CON CANCER CERVICO UTERINO

### INTRODUCCION.

LA IMPORTANCIA DE LA INMUNOLOGÍA FUE AMPLIAMENTE RECONOCIDA CUANDO SE LE RELACIONÓ A LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR AGENTES INFECCIOSOS, VISUALIZÁNDOSE LA NECESIDAD DE QUE EXISTIERAN DEFENSAS EN CONTRA DE TALES MICROORGANISMOS Y DE QUE PUDIERA PREVENIRSE LOS EFECTOS DAÑINOS OCASIONADOS POR ELLOS.

EL SISTEMA INMUNITARIO (SI) PROVEE AL ORGANISMO DE UNA COMPLEJA RED DE MECANISMOS, LOS CUALES INTERACCIONAN ENTRE SÍ PARA PROTEGERLO CONTRA LOS AGENTES INFECCIOSOS. ADEMÁS, EL SI PROTEGE TAMBIÉN AL HUÉSPED CONTRA LAS CÉLULAS QUE HAN ESCAPADO A SUS MECANISMOS NORMALES DE CONTROL.<sup>(1)</sup> LA RESPUESTA INMUNE (RI) QUE GENERA DICHA PROTECCIÓN ES INDUCIDA GRACIAS A LA PRESENCIA DE MATERIAL EXTRAÑO QUE EL SI DESCONOCE COMO PROPIO. LA RI SE DIVIDE EN ESPECÍFICA E INESPECÍFICA AUNQUE EN AMBAS CATEGORÍAS SE UBICAN ELEMENTOS CÉLULARES Y HUMORALES.

COMO PARTE DE LA RI INESPECÍFICA (RII) TENEMOS LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS QUE CONSTITUYEN UNA DE LAS PRIMERAS BARRERAS DE DEFENSA PARA LA ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS Y CÉLULAS EXTRAÑAS AL INDIVIDUO, ESTAS CÉLULAS SE CARACTERIZAN POR EMIGRAR AL SITIO DONDE SE INICIA LA INFECCIÓN, RECONOCER Y FAGOCITAR AL MICROORGANISMO INVASOR. LOS TIPOS PRINCIPALES DE FAGOCITOS SON LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMNs), LOS MONOCITOS Y LOS MACRÓFAGOS, SIENDO LOS PMNs LOS MÁS NUMEROSOS EN LA CIRCULACIÓN SANGUÍNEA. COMO SU NOMBRE LO INDICA, LA PRINCIPAL ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS ES LA INGESTIÓN DE MICROORGANISMOS.

LA FAGOCITOSIS SE LLEVA A CABO EN CUATRO FASES INTERRELACIONADAS QUE SON: QUIMIOTAXIS, OPSONIZACIÓN, INGESTIÓN Y DESTRUCCIÓN. LA QUIMIOTAXIS ES LA MIGRACIÓN DIRIGIDA DE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS HACIA EL SITIO DE INFECCIÓN COMO RESPUESTA A UN ESTÍMULO QUIMIOTÁCTICO PRODUCIDO POR SUSTANCIAS QUÍMICAS GENERADAS COMO PARTE DE UNA REACCIÓN INFLAMATORIA, (28) ENTRE LAS SUSTANCIAS INDUCTORAS DE QUIMIOTAXIS PODEMOS CITAR A FACTORES SÉRICOS GENERADOS POR LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO, PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE LINFOCITOS, MONOCITOS, MACRÓFAGOS Y PMNs (NEUTRÓFILOS), ASÍ COMO LOS PRODUCTOS DE LAS BACTERIAS Y VIRUS INVASORES. (5)

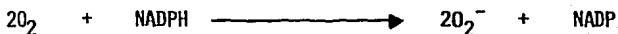
LA OPSONIZACIÓN PROMUEVE LA FAGOCITOSIS DE PARTÍCULAS EXTRAÑAS HACIÉNDOLAS MÁS SUSCEPTIBLES A LA INGESTIÓN POR LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS MEDIANTE SUSTANCIAS DENOMINADAS OPSONINAS QUE INCLUYEN INMUNOGLOBULINAS Y COMPLEMENTO.

POSTERIORMENTE SE INICIA UN MOVIMIENTO DE LA MEMBRANA POR MEDIO DE MICROFILAMENTOS DE ACTINA Y MIOSINA QUE PERMITEN LA EMISIÓN DE PSEUDÓPODOS, QUE RODEAN A LA PARTÍCULA EXTRAÑA HASTA FUSIONARSE Y RODEAR DICHA PARTÍCULA DE UNA PORCIÓN DE MEMBRANA DENTRO DE LA CÉLULA. DICHAS ESTRUCTURAS CONOCIDAS COMO FAGOSOMAS SE FUSIONAN POSTERIORMENTE CON LOS LISOSOMAS, PARA FORMAR UN FAGOLISOSOMA. ESTA FUSIÓN DA COMO RESULTADO LA EXPULSIÓN DEL CONTENIDO DE LOS GRÁNULOS LISOSOMALES DENTRO DEL FAGOSOMA PARA LLEVAR A CABO LA DESTRUCCIÓN DEL MATERIAL INGERIDO. (28)

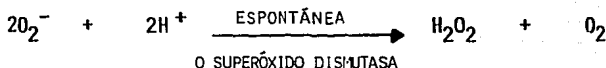
LA FAGOCITOSIS VA ACOMPAÑADA DE UNA COMBUSTIÓN RESPIRATORIA Y POR LA PRODUCCIÓN DE UNA VARIEDAD DE METABOLITOS TÓXICOS DERIVADOS DEL OXÍGENO. ESTOS INCLUYEN EL ANIÓN SUPERÓXIDO ( $O_2^-$ ), PERÓXIDO DE HIDRÓGENO ( $H_2O_2$ ) Y EL RADICAL HIDROXILO ( $OH^-$ ). LA PRODUCCIÓN DE ESTAS ESPECIES MOLECULARES INVOLUCRA UN SISTEMA UNIDO A LA MEMBRANA QUE ACEPTA PIRIDIN NUCLEÓTIDOS REDUCIDOS

COMO SUSTRATO Y UNA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES. LA PRESENCIA DE ESTA MAQUINARIA ENZIMÁTICA EN LA MEMBRANA FAGOSÓMICA ASEGURA QUE LOS DERIVADOS DEL OXÍGENO SE PRODUZCAN EN LA VECINDAD DE LA PARTÍCULA QUE VA A SER DESTRUIDA. (13)

LA OXIDASA MENCIONADA ANTERIORMENTE CATALIZA LA REACCIÓN: (3,5)



GENERANDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO A PARTIR DEL IÓN SUPERÓXIDO:



LOS MECANISMOS ANTIMICROBIANOS DE LOS FAGOCITOS HUMANOS PUEDEN DIVIDIRSE EN: MECANISMOS DEPENDIENTES DEL OXÍGENO Y MECANISMOS INDEPENDIENTES DEL OXÍGENO. DENTRO DE LOS MECANISMOS DEPENDIENTES DEL OXÍGENO SE ENCUENTRAN LOS INTERMEDIARIOS DEL METABOLISMO DEL OXÍGENO (PRINCIPALMENTE  $H_2O_2$ ) Y MIELOPEROXIDASA (MPO). ENTRE LOS MECANISMOS INDEPENDIENTES DEL OXÍGENO ESTÁN LAS PROTEÍNAS CATIONICAS, LACTOFERRINA, HISTONAS NUCLEARES Y PROTEASAS. (28)

ENTRE LOS MECANISMOS ANTIMICROBIANOS DE LOS FAGOCITOS ESTÁ UNO QUE CONSISTE DE PEROXIDASA (PO),  $H_2O_2$  Y UN HALURO, QUE PUEDE ESTAR REPRESENTADO POR IONES YODURO, BROMURO O CLORURO. (7,16,17,18,26) LA PEROXIDASA DE NEUTRÓFILO (MPO) ES LIBERADA DE LOS GRÁNULOS CITOPLÁSMICOS DENTRO DEL FAGOSOMA DONDE REACCIONA CON EL  $H_2O_2$  FORMADO POR LA INDUCCIÓN DE LA FAGOCITOSIS DE LA COMBUSTIÓN RESPIRATORIA Y UN HALURO, FORMANDO AGENTES TÓXICOS PARA LOS MICROORGANISMOS. (18) LOS LEUCOCITOS PMNS, SON EXCEPCIONALMENTE RICOS EN MPO. SCHULTZ Y KAMINKLER SUGIEREN QUE

EN EL NEUTRÓFILO HUMANO NORMAL EL CONTENIDO DE PEROXIDASA ES MAYOR AL 5% DEL PESO SECO DE LA CÉLULA. ESTA ENZIMA FUE ORIGINALMENTE LLAMADA VERDOPEROXIDASA POR AGNER, DEBIDO A SU COLOR VERDE. SIN EMBARGO, EL NOMBRE DE MPO FUE ADOPTADO JUNTO CON EL DESCUBRIMIENTO DE LA PO DE LA LECHE (LACTOPEROXIDASA) QUE TAMBIÉN ERA VERDE. (17) OTRA PEROXIDASA DIFERENTE ESTÁ EN LOS GRÁNULOS DEL EOSINÓFILO, LA CUAL SE CONOCE COMO PEROXIDASA DE EOSINÓFILO (EPO) Y PUEDE SER LIBERADA DENTRO DEL FOGOSOMA O EXTRACELULARMENTE SOBRE LA SUPERFICIE DE ALGÚN BLANCO. (18)

LA FUNCIÓN ESPECIAL DEL EOSINÓFILO EN EL MECANISMO DE DEFENSA DEL HUÉSPED NO SE HA DEFINIDO CLARAMENTE. LOS EOSINÓFILOS ESTÁN PRESENTES EN PEQUEÑO NÚMERO EN LA CIRCULACIÓN Y SE ACUMULAN EN CIERTOS TEJIDOS EN CONDICIONES NORMALES, AUMENTAN EN LOS INDIVIDUOS QUE PADECEN ALGÚN PARASITISMO HELMINTICO, O CON ESTADOS ATÓPICOS, CIERTAS NEOPLASIAS Y REACCIONES CON DROGAS. (14)

LOS MONOCITOS CONTIENEN UNA PEROXIDASA QUE ES IDÉNTICA A LA DEL NEUTRÓFILO. PARECE SER QUE EL SITIO DONDE SE ALOJAN LOS MONOCITOS AL ABANDONAR LA CIRCULACIÓN INFLUYE SOBRE EL PROCESO DE MADURACIÓN. DICHA MADURACIÓN COMPRENDE MAYOR PRODUCCIÓN DE ENZIMAS Y SÍNTESIS DE ALGUNAS NUEVAS, AUMENTO DEL TEJIDO EN DOPLÁSMICO Y QUIZÁ, LA SÍNTESIS DE MÁS GRÁNULOS. AL MISMO TIEMPO SE PIERDEN CIERTAS ENZIMAS (COMO LA PEROXIDASA) DE LOS GRÁNULOS MIENTRAS MADURAN Y SE CONVIERTEN EN MACRÓFAGOS. (5,29)

LAS INVESTIGACIONES ACERCA DE LOS MECANISMOS ANTIMICROBIANOS DE LOS FAGOCITOS HUMANOS SE HAN DIRIGIDO, PRINCIPALMENTE, HACIA LOS MECANISMOS OXIDATIVOS AL IDENTIFICARSE EN FORMA CONCLUYENTE LA IMPORTANCIA DE SU FALLA EN LOS NEUTRÓFILOS DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA (EGC) PARA MONTAR UNA COMBUSTIÓN RESPIRATORIA ADECUADA. (22) ESTA ENFERMEDAD CASI SIEMPRE ES MORTAL EN LA ETAPA INFANTIL Y LOS NIÑOS QUE LA

PADECEN SUFREN DE INFECCIONES GRANULOMATOSAS CRÓNICAS CAUSADAS POR BACTERIAS CONSIDERADAS COMÚNMENTE DE BAJA VIRULENCIA. ASIMISMO, LOS LEUCOCITOS PMNS DE PACIENTES CON EGC MUESTRAN UN DEFECTO MARCADO EN LA DESTRUCCIÓN DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS DE CÉLULAS TUMORALES, POR LO QUE APARENTEMENTE EL  $O_2^-$  Y EL  $H_2O_2$  ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA LISIS DE CÉLULAS TUMORALES.

OTRO DEFECTO DEL METABOLISMO NORMAL DE LOS NEUTRÓFILOS ES LA DEFICIENCIA HEREDITARIA DE LA MPO POR LO QUE NO PUEDE HABER UN EFECTO MICROBICIDA NORMAL, PERO SE OBSERVA UNA DESTRUCCIÓN NORMAL DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS, LO QUE APOYA LO ANTERIORMENTE DICHO. (12)

ÉN CUANTO A ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS SE REFIERE, EL SISTEMA INMUNE CUENTA CON LO QUE SE CONOCE COMO "VIGILANCIA INMUNOLÓGICA", BAJO ESTE TÍTULO SE ENGLOBAN TODOS AQUELLOS MECANISMOS DE LA RI QUE PARTICIPAN DE ALGUNA MANERA EN LA PREVENCIÓN O ELIMINACIÓN DE TUMORES. LA RESPUESTA SE GENERA DEBIDO AL ESTÍMULO QUE CONSTITUYE LA APARICIÓN DE NEOANTÍGENOS SOBRE LAS PROPIAS CÉLULAS DEL HUÉSPED Y QUE SON RECONOCIDAS AHORA COMO ELEMENTOS EXTRAÑOS. LA RESPUESTA PUEDE SER CELULAR O HUMORAL, REPRESENTADAS ÉSTAS POR LOS LINFOCITOS T Y LOS LINFOCITOS B RESPECTIVAMENTE. LA RESPUESTA DE TIPO CELULAR ES LA QUE SE CONSIDERA PRIMORDIAL, MANIFESTÁNDOSE POR LA PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES CON ACCIÓN SOBRE OTRAS CÉLULAS NORMALES O ALTERADAS Y POR LA ACCIÓN DIRECTA DEL LINFOCITO PARA LOGRAR LA DESTRUCCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES, CON O SIN LA PARTICIPACIÓN DE MOLÉCULAS PRODUCIDAS POR OTRAS CÉLULAS. ADEMÁS, TAMBIÉN PARTICIPAN OTRO TIPO DE LEUCOCITOS CON FUNCIONES FAGOCÍTICAS Y CITOTÓXICAS. (1)

AUNQUE LA RESPUESTA DE TIPO CELULAR ES LA QUE ESTÁ DIRECTAMENTE INVOLUCRADA EN LOS MECANISMOS QUE INTEGRAN LA VIGILANCIA INMUNOLÓGICA COMO SISTEMA DE ELIMINACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES, TAMBIÉN ES IMPORTANTE DESTACAR EL PAPEL DEL LINFOCITO B QUE AL



TRANSFORMARSE EN CÉLULA PLASMÁTICA PARTICIPA CON LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS. SIN EMBARGO, LA PRESENCIA DE ESTOS ANTICUERPOS NO GUARDAN RELACIÓN DIRECTA CON UNA BUENA EVOLUCIÓN DEL HUÉSPED. MÁS AÚN, FRECUENTEMENTE ESTOS ANTICUERPOS RECUBREN A LAS CÉLULAS TUMORALES SIN CAUSARLES DAÑO Y EVITAN LA ACCESIBILIDAD DE LOS LINFOCITOS T U OTRAS CÉLULAS CITOTÓXICAS QUE SI SERÍAN EFECTIVAS, LO CUAL DA COMO RESULTADO LA EVASIÓN DE LA RI POR PARTE DE LA CÉLULA TUMORAL Y LA FACILITACIÓN PARA SU DE SARROLLO. (23)

EL CARCINOMA DEL CÉRVIX UTERINO ES UNA DE LAS NEOPLASIAS MALIGNAS MÁS FRECUENTES EN LA MUJER MEXICANA. NO SE CONOCE SU ETIOLOGÍA CON PRECISIÓN, PERO HAY EVIDENCIAS DE QUE SU APARICIÓN ESTÁ RELACIONADA CON FACTORES EXTRÍNSECOS.

EL CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CACU) ES MÁS FRECUENTE EN MUJERES QUE INICIAN SUS RELACIONES SEXUALES A TEMPRANA EDAD, QUE TIENEN RELACIONES FRECUENTES Y CON DIVERSOS INDIVIDUOS, QUE TIENEN GRAN MULTIPARIDAD Y SE ENCUENTRAN EN CONDICIONES SOCIO-ECONÓMICAS Y CULTURALES BAJAS (ENTRE LAS QUE SE INCLUYEN HÁBITOS DEFICIENTES DE HIGIENE PERSONAL). (15,20)

EL CARCINOMA IN SITU DEL CÉRVIX UTERINO PUEDE RESISTIR COMO TAL POR MUCHO TIEMPO (8-10 AÑOS). EN ALGÚN MOMENTO LA LESIÓN SE TORNA INVASIVA. A PARTIR DE ENTONCES SE PUEDEN PRESENTAR LAS SIGUIENTES ETAPAS CLÍNICAS, DE ACUERDO CON EL COMITÉ DE CÁNCER DE LA FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA (FIGO):

#### CARCINOMA PRE-INVASOR.

ETAPA 0            CANCINOMA IN SITU, CARCINOMA INTRAEPITELIAL.

#### CARCINOMA INVASOR.

ETAPA I            CARCINOMA ESTRICTAMENTE CONFINADO AL CÉRVIX.

- ETAPA II EL CARCINOMA SE EXTIENDE MÁS ALLÁ DEL CÉRVIX UTERINO E INVADE EL TERCIO DE UNO O AMBOS PARAMETRIOS, PERO NO ALCANZA LA PARED PÉLVICA. EL CÁNCER INVADE LA VAGINA PERO NO EL TERCIO INFERIOR.
- ETAPA III EL CARCINOMA SE EXTIENDE EN LA PARED PÉLVICA. EL TUMOR INVOLUCRA HASTA EL TERCIO INFERIOR DE LA VAGINA.
- ETAPA IV EL CARCINOMA SE EXTIENDE MÁS ALLÁ DE LA PELVIS VERDADERA O HA INVADIDO LA VEJIGA, EL RECTO, O AMBOS, O BIEN HAN OCURRIDO METÁSTASIS A DISTANCIA.

## FUNDAMENTACION DEL TEMA.

LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS PMNS ES LA DESTRUCCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS MEDIANTE EL PROCESO DE FAGOCITOSIS. SIN EMBARGO, TAMBIÉN PARTICIPAN EN LA RESPUESTA INMUNE DE OTROS ASPECTOS IGUALMENTE IMPORTANTES COMO SON LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS, CITOTOXICIDAD Y SECRECIÓN DE SUSTANCIAS CON ACCIÓN BIOLÓGICA, COMO EL INTERFERÓN. ADEMÁS, EXISTEN SUSTANCIAS CON PROPIEDADES BACTERICIDAS YA PRESENTES EN EL LEUCOCITO, COMO SON LA LISOZIMA Y LACTOFERRINA, O QUE SON ELABORADOS DURANTE LA FAGOCITOSIS, COMO EL  $H_2O_2$ . TAMBIÉN EXISTEN EVIDENCIAS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS LEUCOCITOS PMNS SOBRE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS Y DE LA PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DE LA PEROXIDASA EN DICHA ACTIVIDAD. (9, 10, 12, 19)

SE HA DEMOSTRADO QUE LOS NEUTRÓFILOS LIBERAN CANTIDADES CITOTÓXICAS DE  $H_2O_2$  Y MIELOPEROXIDASA (MPO), QUE AL COMBINARSE CON UN HALURO PRODUCEN LISIS DE CÉLULAS TUMORALES MURINAS. ADEMÁS, SE HA DEMOSTRADO QUE EL NEUTRÓFILO INCUBADO CON UN ESTIMULANTE DEL METABOLISMO OXIDATIVO, COMO EL ACETATO DE FORBOL MIRISTATO (AFM), ES CITOTÓXICO PARA LÍNEAS CÉLULARES LINFOBLÁSTICAS-T HUMANAS Y QUE DICHA ACTIVIDAD SE DEBE A LA FORMACIÓN DE ÁCIDO HIPICLOROSO (HOCl), PRODUCIDO POR LA OXIDACIÓN DEL  $Cl^-$ . (27) LA PARTICIPACIÓN DE LA MPO DEL NEUTRÓFILO, EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO BACTERINO FUE CONFIRMADA AL OBSERVARSE UNA ACTIVIDAD DISMINUIDA EN LOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON DEFICIENCIAS HEREDITARIA DE MPO LA CUAL SE CORRIGIÓ AL AGREGAR MPO PURIFICADA. (10)

EL CÁNCER CÉRVICO UTERINO ES LA NEOPLASIA MÁS FRECUENTE EN LA MUJER, EN NUESTRO MEDIO, Y CONSTITUYE UN GRAVE PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA DEBIDO A QUE AFECTA A UN NUMEROSO SECTOR DE LA POBLACIÓN EN SU EDAD REPRODUCTIVA Y DE BAJO ESTRATO SOCIOECONÓMICO. ES POR ELLO MUY IMPORTANTE DESARROLLAR ESTUDIOS QUE PERMI

TAN EVALUAR LA RESPUESTA INMUNE EN DICHS PACIENTES, PARA PROFUNDIZAR EN EL CONOCIMIENTO DE LOS MECANISMOS QUE PODRÍAN ESTAR INVOLUCRADOS EN LA DESTRUCCIÓN DE UN TUMOR, EN PARTICULAR CONSIDERAMOS IMPORTANTE LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA DE PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y DENTRO DE ELLA LA ACTIVIDAD DE LOS LEUCOCITOS PMNS CON O SIN LA PRESENCIA DE SUERO AUTÓLOGO. ADEMÁS, SE HA INCLUIDO EN EL ESTUDIO LA DETERMINACIÓN DE MPO EN LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CÁNCER PARA VER SI LA CONCENTRACIÓN DE ÉSTA SE HALLA ALTERADA EN COMPARACIÓN A LAS CIFRAS NORMALES.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

SE HAN DESCRITO SISTEMAS DE PEROXIDACIÓN DENTRO DE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS QUE CONSTITUYEN PARTE IMPORTANTE DE SUS MECANISMOS DEPENDIENTES DEL OXÍGENO PARA LA DESTRUCCIÓN DEL MATERIAL INGERIDO. DENTRO DE ESOS SISTEMAS NO SE HAN ESTABLECIDO LAS CONCENTRACIONES ÓPTIMAS DE CADA COMPONENTE. SE HA DESCRITO QUE EL  $H_2 O_2$  TIENE PROPIEDADES BACTERICIDAS POR SÍ SOLO, EN UN RANGO DE CONCENTRACIÓN DE  $10^{-4} M$  A  $10^{-2} M$  DISMINUYENDO SI SE EMPLEAN MENORES CONCENTRACIONES Y AUMENTANDO AL INCREMENTARLAS. SE SABE QUE EL CLORURO ES EFECTIVO A CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS DE 0.1M A UN PH DE 5.0, MIENTRAS QUE SE DESCONOCE COMO PUEDE SER LA PARTICIPACIÓN DEL YODURO Y BROMURO. (11, 14, 17)

ENTRE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS, LOS LEUCOCITOS PMNS SON CONSIDERADOS DE GRAN IMPORTANCIA EN LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA, DEBIDO A SU PARTICIPACIÓN EN LA ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS Y CÉLULAS TUMORALES POR MEDIO DEL PROCESO DE FAGOCITOSIS Y/O ACTIVIDAD CITOTÓXICA.

CONSIDERANDO QUE HAY DISMINUCIÓN EN LA EFECTIVIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE EN LAS PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO, RESULTA DE GRAN IMPORTANCIA INVESTIGAR LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS PMNS DE DICHAS PACIENTES. ADEMÁS, SE HAN DESCRITO DIFERENTES ALTERACIONES EN PACIENTES CON CÁNCER TALES COMO; LEUCOPENIA, LINFOPENIA, ALTERACIONES EN SUBPOBLACIONES CÉLULARES Y EN ALGUNOS COMPONENTES SÉRICOS.

ASIMISMO, SE HA OBSERVADO QUE LAS PACIENTES CON CACÚ PRESENTAN GRANULOCITOSIS POR LO QUE SE PRETENDE ENCONTRAR UN DISEÑO EXPERIMENTAL QUE NOS PERMITA CONOCER MÁS DE CERCA LA FUNCIÓN DE DICHAS CÉLULAS. PARA ELLO SE TRATARÁ DE OBSERVAR LA ACTIVIDAD MICROBICIDA IN VITRO DE LOS LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CACÚ Y EL EFECTO QUE PRODUCE EL SUERO AUTÓLOGO POR SÍ SOLO O EN COMBINACIÓN CON LAS CÉLULAS.

PARA DETERMINAR EL EFECTO MICROBICIDA DE LOS LEUCOCITOS SE ANALIZARÁN LAS VARIABLES DE TIEMPO, TEMPERATURA Y CONCENTRACIONES DE CÉLULAS Y BACTERIAS MÁS CONVENIENTES PARA ESTUDIAR EL CONTROL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR LAS CÉLULAS DE LAS PACIENTES CON CAÚ HACIENDO UNA COMPARACIÓN CON CÉLULAS DE UN GRUPO DE PERSONAS SANAS, EMPLEADAS COMO CONTROL.

ADEMÁS SE TRATARÁ DE DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA CELULAR Y LA ACTIVIDAD DE MPO EN RELACIÓN CON LA CANTIDAD DE PROTEÍNA.

**OBJETIVOS.**

1. ANALIZAR UN SISTEMA BACTERICIDA IN VITRO CONSISTENTE EN PEROXIDASA DE RÁBAHO,  $H_2 O_2$  Y  $Cl^-$ , UTILIZANDO COMO BLANCO DOS CEPAS DE UNA BACTERIA PATÓGENA (E. COLI INVASIVA Y NO INVASIVA) CON EL FIN DE CONFIRMAR LA CAPACIDAD DEL SISTEMA EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.
2. EVALUAR EL EFECTO MICROBICIDA DE LOS LEUCOCITOS Y SUERO DE PACIENTES CON CACU. REALIZAR COMO CONTROL COMPARATIVO LA EVALUACIÓN DEL EFECTO MICROBICIDA DE LEUCOCITOS Y SUERO DE PERSONAS SANAS.
3. DETERMINAR SI EXISTE ALGUNA ALTERACIÓN EN EL NÚMERO DE LEUCOCITOS PRESENTES EN LA CIRCULACIÓN SANGUÍNEA EN PACIENTES CON CACU CON RESPECTO A LOS CONTROLES NORMALES.
4. DETERMINAR LOS NIVELES ENZIMÁTICOS DE MPO EN LEUCOCITOS TOTALES EN PACIENTES CON CACU, ASÍ COMO DE CONTROLES NORMALES, UTILIZANDO MÉTODOS FOTOCOLORIMÉTRICOS.

## **HIPOTESIS.**

CONSIDERANDO QUE PUEDE HABER UNA ALTERNACIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA DE LAS PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO, AL EVALUAR LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE LOS LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN UN SISTEMA IN VI-TRO SE PODRÍA ENCONTRAR UNA DEFICIENCIA EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO SUSCEPTIBLE DE MODIFICARSE O NO POR ADICIÓN DEL SUERO AUTÓLOGO. ADEMÁS SE ESPERA OBSERVAR LEUCOPENIA, EOSINOFILIA Y GRANULOCITOSIS, COMO HA SUCEDIDO EN OTROS ESTUDIOS DE PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO. EN CASO DE QUE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE LOS LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CÁNCER SEA INFERIOR A LA DE LAS CÉLULAS DE CONTROLES NORMALES SE TRATARÁ DE ENCONTRAR SI SE DEBE A UNA DIMINUCIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LA MPO.



## MATERIAL

### 1. MATERIAL DE CONSUMO.

- . TUBOS DE ENSAYE (13 x 100, 15 x 100 MM)
- . TUBOS DE ENSAYE CON TAPÓN DE ROSCA (13 x 100, 15 x 100  
15 x 150 MM)
- . MATRACES AFORADOS (25, 50, 250, 500, 1000 ML.)
- . MATRACES EARLENMEYER (25, 50, 250, 500, 1000, 4000 ML)
- . PIPETAS SEROLÓGICAS (0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 ML)
- . PIPETAS VOLUMÉTRICAS (3.0, 5.0 ML)
- . VASOS DE PRECIPITADOS (50.0, 100.0, 250.0, 1000.0 ML)
- . CAJAS DE PETRI
- . PORTAOBJETOS
- . PIPETAS AJUSTABLES GILSON (P200, P1000)
- . TERMÓMETRO DE MERCURIO (-10°C A 110°C)
- . GRADILLA METÁLICA
- . ALGODÓN
- . GASA
- . MASKING TAPE
- . PAPEL ALUMINIO
- . AGUJAS DESECHABLES (20 x 32, 21 x 32, 22 x 32 MM)
- . MECHERO BUNSEN

- . ESPÁTULA
- . CÁMARA DE NEUBAUER
- . PIPETA DE THOMA PARA GLÓBULOS BLANCOS
- . EMBUDOS
- . MICROTUBOS EPPENDORF DE POLIPROPILENO (1.5 ML)
- . PIPETAS PASTEUR (2" DE LARGO)
- . CUBREOBJETOS (22 X 22 MM)
- . CUBREBOCA
- . CELDAS PARA ESPECTROFOTÓMETRO

2. EQUIPO DE LABORATORIO

- |                                   |                                |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| . ESTUFA DE 0 A 110°C             | LAB-LINE                       |
| . REFRIGERADOR                    | ACROSS                         |
| . CONGELADOR (0 A -20°C)          | AMERICAN                       |
| . CONGELADOR (0 A -76°C)          | ULTRA COLD                     |
| . BALANZA GRANATÁRICA 2 PLATILLOS | OHAUS                          |
| . VÓRTEX                          | GENIS                          |
| . MICROSCOPIO ÓPTICO              | ZEISS                          |
| . CENTRÍFUGA CLÍNICA              | SOLBAT 115                     |
| . CENTRÍFUGA REFRIGERADA          | DAMON/ICE                      |
| . AGITADOR MAGNÉTICO              | MAGNESTIR                      |
| . ESPECTROFOTÓMETRO               | BAUSCH AND LOMB<br>ESPECTRONIC |

. POTENCIÓMETRO	BECKMAN SS-3
. BALANZA ANALÍTICA	METTLER
. DESTILADOR	BARNSTEAD
. BAÑO MARÍA (0 A 100°C)	THELCO
. AUTOCLAVE	

### 3. MATERIAL BIOLÓGICO.

- . CEPA BACTERIANA PURA DE ESCHERICHIA COLI INVASIVA 9001 (SEROTIPO 01.H1:H7), AISLADA DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE UN NIÑO DE UN AÑO DE EDAD. DICHA CEPA ES LETAL PARA EMBRIÓN DE POLLO, INVADE CÉLULAS HELA, HEP.2 Y FIBROBLASTOS DE RATÓN. SE OBTUVO DEL CEPARIO DE LA E.N.C.B. DEL I.P.N.
- . CEPA BACTERIANA PURA DE ESCHERICHIA COLI NO INVASIVA. INÓCULO ORIGINAL DONADO POR EL CEPARIO DE LA E.N.C.B. DEL I.P.N. CARACTERIZADO COMO NO INVASIVA (002-0119B).
- . MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA OBTENIDAS DE UN GRUPO DE 23 PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO PROPORCIONADAS POR EL DEPARTAMENTO DE COBALTOTERAPIA DEL HOSPITAL DE LA MUJER DE LA S.S.A.
- . MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE 32 DONADORAS SANAS QUE SE EMPLEARON COMO CONTROL. ESTAS PERSONAS FUERON MUJERES APARENTEMENTE LIBRES DE CUALQUIER CONDICIÓN PATOLÓGICA QUE PUDIESE INVOLUCRAR UNA ALTERACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.
- . LAS MUESTRAS DE SANGRE FUERON PROCESADAS COMO SE DESCRIBE EN LA SECCIÓN DE MÉTODOS.

4. REACTIVOS.

- . PEROXIDASA DE RÁBANO (PEROXIDASA No. P 8375 TIPO IV HORSERADISH 5,000 U; R.Z. 3.2; 280 PURPUROGALLING U/MG SÓLIDO) 230 NG/ML
- . AGAR DE SOYA TRIPTICASEINA
- . CALDO DE SOYA TRIPTICASEINA
- . REGULADOR DE ACETATOS 0.05M PH 5.0
- . REGULADOR DE ACETATOS 0.1 M PH 5.0
- . CLORURO DE SODIO (NaCl) 100 mM
- . GLUCOSA 75 mM
- . HIDRÓXIDO DE SODIO (NaOH) 0.1 N
- . CARBONATO DE SODIO ( $Na_2CO_3$ ) AL 2% EN NaOH 0.1N
- . TARTRATO DE SODIO Y POTASIO ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) AL 2%
- . SULFATO DE COBRE II ( $CuSO_4$ ) AL 1%
- . OVOALBÚMINA 200UG/ML EN SOLUCIÓN SALINA
- . SOLUCIÓN SALINA (NaCl AL 0.85%)
- . O-DIANISIDINA 0.02M EN REGULADOR DE ACETATOS 0.1M PH 5.0
- . PERÓXIDO DE HIDRÓGENO ( $H_2O_2$ ) 0.3 M
- . PERÓXIDO DE HIDRÓGENO 1.0 mM
- . ACIDO TRICLOROACÉTICO 40%
- . SOLUCIÓN DE ALSÉVER
- . CARBONATO DE SODIO AL 0.7%

- . AZUL TRIPANO AL 0.1% EN CARBONATO DE SODIO 0.7%
- . ALCOHOL ETÍLICO ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) AL 70%
- . DIOXANO
- . COLORANTE GIEMSA: MEZCLAR 0.5 G. DE COLORANTE EN 33 ML DE GLICERINA Y DISOLVER EN 33 ML DE METANOL, FILTRAR Y ALMACENAR
- . COLORANTE DE WRIGHT-GIEMSA: MEZCLAR 1.0 G. DE GIEMSA Y 9.0 G DE WRIGHT EN 9.0 ML DE GLICERINA Y DISOLVER EN 2910 ML DE METANOL
- . LÍQUIDO DE TURK: AGREGAR DE 1 A 2 GOTAS DE AZUL DE METILENO AL 0.1% A 100 ML DE UNA SOLUCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO AL 3%
- . MEDIO T.C.: DE UNA SOLUCIÓN CONCENTRADA 10X DILUIR 1:10 CON  $\text{H}_2\text{O}$  DESTILADA Y AJUSTAR EL PH A 7.2 CON CARBONATO DE SODIO 0.7%

## MÉTODOS.

### I. PREPARACION DEL INOCULO BACTERIANO.

- . DE UN TUBO DE AGAR QUE CONTENGA LA CEPA BACTERIANA PURA DE ESCHERICHIA COLI INVASIVA, TOMAR UNA ASADA Y SEMBRAR EN UN TUBO QUE CONTENGA DE 3 A 5 ML DE MEDIO DE CULTIVO CALDO SOYA TRIPTICASEINA E INCUBAR A 37°C DURANTE 16 A 18 HORAS.
  
- . PASADO EL TIEMPO DE INCUBACIÓN SE TRANSFIERE EL CONTENIDO DEL TUBO ANTERIOR A UN MATRAZ EARLENMEYER QUE CONTENGA 50 ML DE MEDIO CALDO SOYA TRIPTICASEINA CON 5 ML DE GLICEROL Y DEJAR EN INCUBACIÓN NUEVAMENTE A 37° DURANTE 16 A 18 HORAS.
  
- . REPARTIR EN ALÍCUOTAS DE 1.0 ML EN TUBOS EPPENDORF Y CONGELAR A -70°C.

### II. OBTENCION DE LEUCOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFERICA.

- . EN UNA JERINGA DE 20 ML QUE CONTENGA 5 ML DEXTRANA AL 6% EN ALSÉVER, OBTENER 15 ML DE SANGRE VENOSA.
  
- . PONER A SEDIMENTAR COLOCANDO LA JERINGA EN ÁNGULO DE 45° DURANTE APROXIMADAMENTE 45' A 37°C
  
- . SEPARAR EL PLASMA DEL PAQUETE ERITROCITARIO EN UN TUBO 15 X 100 MM CON TAPÓN DE ROSCA.
  
- . CENTRIFUGAR A 500 X G DURANTE 10' Y DESCANTAR EL SOBRENADANTE.

- . RESUSPENDER EL PAQUETE CELULAR EN SOLUCIÓN DE ALSÉVER PARA LAVAR Y CENTRIFUGAR A 500 XG DURANTE 10'.
- . LAVAR NUEVAMENTE CON ALSÉVER Y DESECHAR EL SOBRENADANTE.
- . DAR CHOQUE HIPOTÓNICO ERITROCITARIO RESUSPENDIENDO EL PAQUETE CELULAR EN 2.0 ML DE AGUA DESTILADA, MANTENIÉNDOLO DURANTE 30".
- . RESTAURAR INMEDIATAMENTE LA OSMOLARIDAD LLENANDO EL TUBO CON MEDIO TC.
- . CENTRIFUGAR A 500 XG DURANTE 10' Y DESCARTAR EL SOBRENADANTE.
- . RESUSPENDER EL BOTÓN CELULAR EN 2.0 ML DE MEDIO TC Y REALIZAR CUENTA VIABLE CELULAR.

### III. OBTENCION DEL SUERO.

- . EN UNA JERINGA DE 5 ML OBTENER SANGRE VENOSA Y TRANSFERIRLA EN UN TUBO 13 X 100 MM CON TAPÓN DE ROSCA.
- . INCUBAR A 37°C DURANTE 20'.
- . DESPEGAR EL COÁGULO CON UN APLICADOR E INCUBAR DURANTE OTROS 20' A 4°C.
- . CENTRIFUGAR A 1 400 XG DURANTE 20'.
- . EXTRAER EL SUERO CON UNA PIPETA PASTEUR DEL PAQUETE CELULAR Y TRANSFERIRLO A UN TUBO DE 13 X 100 MM.
- . DESCOMPLEMENTAR UNA PARTE DEL SUERO CALENTANDO EN BAÑO MARÍA A 56°C DURANTE 30'.

IV. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL METODO DE LOWRY.

- COLOCAR EN TUBOS DE ENSAYE 13 X 100 MM LOS VOLUMENES CORRESPONDIENTES 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 Y 1.0 ML DE UNA SOLUCIÓN DE OVOALBÚMINA A UNA CONCENTRACIÓN DE 200 UG/ML PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UNA CURVA STANDARD.
- COLOCAR EN OTROS TUBOS 13 X 100 MM LOS VOLUMENES CORRESPONDIENTES A  $1.0 \times 10^6$  CÉLULAS DE CADA MUESTRA PROBLEMA.
- LLEVAR A UN VOLUMEN FINAL DE 1.0 ML A CADA UNO DE LOS TUBOS CON SOLUCIÓN SALINA 0.85%.
- CORRER SIMULTÁNEAMENTE UN BLANCO QUE CONSTA DE SOLUCIÓN SALINA ÚNICAMENTE.
- AGREGAR A CADA UNO DE LOS TUBOS 3.0 ML DE UNA SOLUCIÓN QUE CONSTA DE: 1.0 ML DE  $\text{KNAC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  AL 1% Y 100 ML DE  $\text{NACO}_3$  AL 2% EN  $\text{NAOH}$  0.1N.
- AGITAR Y DEJAR REPOSAR DURANTE 10'.
- AGREGAR 0.3 ML DE REACTIVO DE FENOL.
- AGITAR Y DEJAR REPOSAR DURANTE 30'.
- LEER CONTRA EL BLANCO A UNA LONGITUD DE ONDA DE 600 NM.

V. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MPO POR EL METODO DE LA O-DIANISIDINA.

- EN TUBOS 13 X 100 MM COLOCAR 0.3 ML DE REGULADOR DE ACETATOS 0.1M PH 5.0, 0.05 ML DE UNA SOLUCIÓN DE O-DIANISIDINA 0.2M Y 0.1 ML DE  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.3 M.



- . COMPLETAR LOS DOS PRIMEROS TUBOS A UN VOLUMEN DE 2.5 ML CON H<sub>2</sub>O DESTILADA.
- . COLOCAR A LOS TUBOS SIGUIENTES 0.1 ML DE UNA SOLUCIÓN DE PEROXIDASA DE RÁBANO EN UNA CONCENTRACIÓN DE 230 NG/ML.
- . COLOCAR EN LOS TUBOS SIGUIENTES EL VOLUMEN CORRESPONDIENTE A  $0.5 \times 10^6$  LEUCOCITOS DE CADA MUESTRA PROBLEMA.
- . COMPLETAR CADA TUBO A UN VOLUMEN FINAL DE 2.5 ML CON H<sub>2</sub>O DESTILADA.
- . INCUBAR LOS TUBOS EN BAÑO MARÍA A 37°C DURANTE 20'.
- . AGREGAR A CADA TUBO 0.5 ML DE TCA AL 40%.
- . CENTRIFUGAR A 1 400 XG DURANTE 15' Y DESCARTAR EL SOBRENADANTE.
- . A CADA TUBO AÑADIR 3.0 ML DE DIOXAMO Y AGITAR VIGOROSAMENTE.
- . CENTRIFUGAR A 1 400 XG DURANTE 15'.
- . LEER EL SOBRENADANTE A UNA LONGITUD DE ONDA DE 460 NM.
- . OBTENER LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA DE CADA MUESTRA EN RELACIÓN A LA OBTENIDA EN EL STANDARD.

VI. METODO PARA DETERMINAR EL EFECTO BACTERICIDA "IN VITRO"  
DEL SISTEMA PEROXIDASA - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - HALURO.\*

- . EN TUBOS 13 X 100 MM PONER EN CADA TUBO 0,7 ML DEL REGULADOR DE ACETATOS 0,05M PH 5,0: 0,1 ML DE SOLUCIÓN DE GLUCOSA 75 mM Y 0,1 ML DE NaCl 10 mM.
- . AJUSTAR UN CULTIVO DE BACTERIA DE 16 A 18 HRS., A UNA DENSIDAD ÓPTICA DE 0,1 A UNA LONGITUD DE ONDA DE 620 NM, DILUIRLA 1:4 EN CALDO SOYA TRIPTICASEINA Y ADICIONAR A CADA UNO DE LOS TUBOS MEZCLA DE REACCIÓN (TMR) 0,05 ML.
- . AGREGAR A CADA TUBO 0,1 ML DE PEROXIDASA DE RÁBANO 23 UG/100 ML.
- . AÑADIR 0,1 ML DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0 mM.
- . LOS TUBOS BLANCOS NO LLEVAN H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NI PEROXIDASA.
- . COMPLETAR EL VOLUMEN DE CADA MEZCLA DE REACCIÓN (MR) A 2,0 ML DE H<sub>2</sub>O DESIONIZADA.
- . INCUBAR LOS TMR A 37°C DURANTE 30'.
- . PASADO EL TIEMPO DE INCUBACIÓN REALIZAR 3 DILUCIONES 1:11 A CADA UNO DE LOS TUBOS EN SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA O ALSÉVER.
- . SEMBRAR EN PLACA POR TRIPLICADO 200 Y 400 UL.
- . INCUBAR A 37°C DURANTE 16 A 18 HRS.
- . REALIZAR LA CUENTA VIABLE BACTERIANA POR PLACA Y CALCULAR EL NÚMERO DE BACTERIAS FINAL EN CADA TMR.

- . N (F) = COLONIAS BACTERIANAS/ML.
- N = NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS POR PLACA.
- F = FACTOR DE DILUCIÓN.

VII. ENSAYO BACTERICIDA CON LEUCOCITOS HUMANOS.\*

- . NUMERAR TUBOS 13 x 100 MM DEL 1 AL 5.
- . AJUSTAR UN CULTIVO DE BACTERIAS (E. COLI) DE 16 A 18 HRS. A UNA DENSIDAD ÓPTICA DE 0.1 A UNA LONGITUD DE ONDA DE 620 NM, DILUIR EN CALDO SOYA TRIPITICASEINA 1:5 Y AGREGAR 0.05 ML A CADA UNO DE LOS TUBOS.
- . TOMAR EL TUBO 1 COMO CONTROL.
- . AGREGAR A LOS TUBOS 2 Y 4 0.2 ML DE SUERO AUTÓLOGO A CADA MUESTRA (DE PACIENTE CON CACU O DONADOR SANO).
- . A LOS TUBOS 3 Y 5 AGREGAR 0.2 ML DEL SUERO AUTÓLOGO DESCOMPLEMENTADO (DE PACIENTE CON CACU O DONADOR SANO).
- . A LOS TUBOS 4 Y 5 AGREGAR, DE UNA SUSPENSIÓN DE LEUCOCITOS, EL VOLUMEN CORRESPONDIENTE A  $2.0 \times 10^6$  CÉLULAS.
- . AJUSTAR A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML CON MEDIO TC.
- . INCUBAR LA MR A 37°C DURANTE 45'.
- . DAR CHOQUE HIPOTÓNICO LEUCOCITARIO A 0.2 ML DE MR DE CADA TUBO EN 2.0 ML DE AGUA DESTILADA Y MANTENER EN SUSPENSIÓN DURANTE 10' (DIL 1:11).

- . REALIZAR 2 DILUCIONES MÁS A CADA TUBO MR 1:11 EN AGUA DESTILADA O ALSÉVER.
- . SEMBRAR LA TERCERA DILUCIÓN, 200 Y 400 UL POR EL MÉTODO DE VACIADO EN PLACA POR DUPLICADO E INCUBAR A 37°C DURANTE 16 A 18 HORAS.
- . REALIZAR LA CUENTA VIABLE BACTERIANA POR PLACA Y OBTENER EL NÚMERO DE BACTERIAS FINAL DE CADA TMR Y CALULAR EL PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN RELACIÓN A LOS TUBOS CONTROL.

#### VIII. OBTENCION DE LEUCOCITOS TOTALES.

- . TOMAR EN UN TUBO DE NESAYE 0,5 ML DE SANGRE VENOSA OBTENIDA COMO SE INDICA EN II.
- . LLENAR CON SANGRE UNA PIPETA DE THOMA PARA GLÓBULOS BLANCOS HASTA LA MARCA DE 0,5.
- . LIMPIAR LA SANGRE ADHERIDA EN EL EXTERIOR DE LA PIPETA CON UNA GASA.
- . COMPLETAR HASTA LA MARCA DE 1.1 CON LÍQUIDO DE TURK.
- . HOMOGENIZAR DURANTE 2' EN EL AGITADOR DE PIPETAS.
- . COLOCAR EL CUBREHEMATÍMETRO SOBRE LA CÁMARA DE NEUBAUER.
- . DESCARTAR LAS PRIMERAS 4 A 5 GOTAS DE LA PIPETA Y LLENAR LA CÁMARA POR CADA UNO DE SUS BORDES.
- . DEJAR REPOSAR DURANTE 3' A 4'.

- OBSERVAR AL MICROSCOPIO CON EL OBJETIVO DE 10X Y CONTAR LOS LEUCOCITOS EN LOS CUADRANTES DE LOS EXTREMOS.
- OBTENER EL NÚMERO DE LEUCOCITOS MEDIANTE LA SIGUIENTE FÓRMULA:

$$\text{NÚMERO DE LEUCOCITOS/MM}^3 = \frac{N (20)}{(0.1 \text{ MM}) (1 \text{ MM})^2 4} = N (50)$$

DONDE:

- N = NÚMERO DE CÉLULAS CONTADAS
- 20 = DILUCIÓN DE LA MUESTRA
- 0.1 MM<sup>2</sup> = ALTURA DE LA CÁMARA
- 1 MM<sup>2</sup> = ÁREA DEL CUADRANTE GRANDE
- 4 = NÚMERO DE CUADRANTES CONTADOS

COMO LA SANGRE SE DILUYÓ CON 5 ML, DE SOLUCIÓN DEXTRANA AL 6% EN ALSÉVER, MULTIPLICAR EL RESULTADO POR EL FACTOR 1.33 PARA CORREGIR EL NÚMERO DE LEUCOCITOS OBTENIDOS.

#### IX. CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS.

- REALIZAR UN FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA EN UN PORTAOBJETOS LIMPIO Y DESENGRASADO.
- SECAR EL FROTIS AL AIRE Y FIJAR DURANTE 5' EN METANOL.
- SUMERGIR EL FROTIS EN UNA SOLUCIÓN DE COLORANTES GIEMSA (DILUIDA UNA GOTTA DE COLORANTE POR CADA ML DE H<sub>2</sub>O. DESTILADA) DURANTE 20'.

- . LAVAR CON AGUA DE LA LLAVE.
- . SECAR AL AIRE EN POSICIÓN VERTICAL.
- . OBSERVAR Y CONTAR LAS CÉLULAS AL MICROSCOPIO EMPLEANDO EL OBJETIVO DE INMERSIÓN (100X).

\* TODO EL PROCESO SE LLEVA A CABO EN CONDICIONES DE ESTERILIDAD.

LOS RESULTADOS SERÁN ANALIZADOS EMPLEANDO LA PRUEBA DE "T" DE STUDENT PARA DATOS PARAMÉTRICOS (4), ASÍ COMO LA PRUEBA DE "U" DE MANN-WHITNEY PARA DATOS NO PARAMÉTRICOS (6).

## RESULTADOS.

SE ESTUDIÓ UN SISTEMA CON LAS CONDICIONES NECESARIAS PARA EJERCER UN EFECTO BACTERICIDA IN VITRO, CON EL FIN DE ANALIZAR LAS CONDICIONES EN LAS CUALES INTERVIENE LA MIELOPEROXIDASA (MPO) DENTRO DE LOS FAGOCITOS HUMANOS (PRINCIPALMENTE LOS PMNS), PARA LA ELIMINACIÓN DE UNA BACTERIA. ADEMÁS, SE DETERMINÓ LA ACTIVIDAD QUE TIENEN LOS LEUCOCITOS HUMANOS DE PACIENTES CON CACU EN PRESENCIA O AUSENCIA DE SUERO AUTÓLOGO PARA CONTROLAR EL CRECIMIENTO IN VITRO DE E. COLI INVASIVA Y NO INVASIVA.

EN PRIMER LUGAR SE LLEVÓ A CABO LA INTEGRACIÓN DEL SISTEMA DE PEROXIDACIÓN CONSTITUIDO POR PEROXIDASA (PO),  $H_2O_2$  E IONES  $Cl^-$  ENSAYÁNDOSE EN CONTRA DE E. COLI INVASIVA Y NO INVASIVA. LA PEROXIDASA EMPLEADA EN CADA ENSAYO FUE PEROXIDASA DE RÁBANO COMERCIAL EN CONCENTRACIONES DE 230 NG/ML, COMBINADA CON UNA SOLUCIÓN DE  $H_2O_2$  1.0 MM Y NaCl 10 MM, CONTENIDOS EN UN REGULADOR DE ACETATOS 0.5M PH 5.0. LAS TABLAS 1 Y 2 MUESTRAN LOS EFECTOS QUE TIENEN EL  $H_2O_2$  Y LA PEROXIDASA DE RÁBANO ACTIVA E INACTIVA (INACTIVADA EN BAÑO MARÍA A EBULLICIÓN DURANTE 30') SOLOS O COMBINADOS Y EN PRESENCIA DE IONES  $Cl^-$  EN CONTRA DE E. COLI INVASIVA Y NO INVASIVA. AHÍ SE OBSERVA QUE LA PEROXIDASA ACTIVA PRODUCE UN EFECTO SIGNIFICATIVO EXCLUSIVAMENTE EN RELACIÓN AL PRODUCIDO POR EL  $H_2O_2$  SOBRE LA E. COLI INVASIVA. ADEMÁS, A PESAR DE QUE APARENTEMENTE EL SISTEMA PRODUCE UNA MAYOR INHIBICIÓN EN COMPARACIÓN CON LA PRODUCIDA POR CADA UNO DE LAS VARIABLES EN FORMA INDIVIDUAL, DICHA DIFERENCIA NO ES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. EL EFECTO PRODUCIDO POR CADA UNA DE LAS VARIABLES EN FORMA INDIVIDUAL MUESTRA UNA DIFERENCIA APARENTE CON EL SISTEMA SOBRE E. COLI NO INVASIVA. LA INHIBICIÓN PRODUCIDA POR CADA UNA DE LAS VARIABLES SOBRE E. COLI INVASIVA ES MENOR A LA PRODUCIDA POR EL SISTEMA SOBRE E. COLI NO INVASIVA Y ESTA DIFERENCIA ES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA ( $p < 0.05$ ).

PARA DETERMINAR EL NÚMERO DE CÉLULAS A EMPLEAR SE REALIZARON VARIOS ENSAYOS CON DIFERENTES NÚMERO DE CÉLULAS, COMO SE MUESTRA EN LAS TABLAS 3 Y 4. EN ELLAS SE OBSERVA QUE AL VARIAR LA CANTIDAD DE CÉLULAS HAY VARIACIÓN EN LA ELIMINACIÓN DE LA BACTERIA Y QUE SI SE UTILIZAN  $0,5 \times 10^6$ ,  $1,0 \times 10^6$  ó  $1,5 \times 10^6$  CÉLULAS, LA INHIBICIÓN BACTERIANA NO ERA TAN APARENTE, COMO CUANDO SE USABAN  $2,0 \times 10^6$  Y  $4,0 \times 10^6$  CÉLULAS. PUESTO QUE LAS DOS CONCENTRACIONES MAYORES MOSTRARON TENER UN EFECTO SIMILAR SE ESCOGIÓ LA DE  $2,0 \times 10^6$  CÉLULAS COMO LA ADECUADA PARA LA REALIZACIÓN DE LAS SIGUIENTES PRUEBAS.

EN LOS ENSAYOS BACTERICIDAS DE LEUCOCITOS TANTO DE PACIENTES COMO DE CONTROLES FRENTE A E. COLI INVASIVA, SE ENCONTRÓ QUE AL PONER LAS CÉLULAS SOLAS O EL SUERO AUTÓLOGO SÓLO HABÍA UNA LIGERA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO. DE LA MISMA MANERA SE OBSERVÓ QUE SI SE COMBINABAN CÉLULAS Y SUERO AUTÓLOGO DE LAS PACIENTES EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO NO SE MODIFICABA, COMO SE PUEDE VER EN LAS TABLAS 5 Y 6. SIN EMBARGO, AL COMBINAR LAS CÉLULAS Y EL SUERO AUTÓLOGO DE LOS CONTROLES, HABÍA UN LIGERO AUMENTO EN LA INHIBICIÓN, AUNQUE LAS DIFERENCIAS ENCONTRADAS NO SON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

ADEMÁS, LAS CÉLULAS Y EL SUERO AUTÓLOGO DESCOMPLEMENTADO Y LA COMBINACIÓN DEL SUERO AUTÓLOGO ACTIVO CON LAS CÉLULAS DE LOS CONTROLES NO EJERCERON UN EFECTO SIGNIFICATIVO A LOS 70' DE INCUBACIÓN, DE IGUAL MANERA QUE LAS CÉLULAS Y EL SUERO INACTIVO DE LAS PACIENTES COMO SE MUESTRA EN LAS TABLAS 7 Y 8. EL SUERO AUTÓLOGO, ACTIVO, DE LOS CONTROLES NORMALES TIENE UN AUMENTO EN LA INHIBICIÓN CON RESPECTO A LAS CÉLULAS, SUERO INACTIVO Y SUERO MÁS CÉLULAS. EL SUERO ACTIVO Y LA COMBINACIÓN DE CÉLULAS CON SUERO DE LAS PACIENTES, TIENEN MAYOR EFECTO QUE LAS CÉLULAS, Y QUE TIENEN TAMBIÉN UN MAYOR EFECTO QUE LAS CÉLULAS Y EL SUERO POR SÍ SOLOS LO CUAL ES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVO.



SE ESTUDIÓ EL COMPORTAMIENTO DE E. COLI INVASIVA FRENTE A CADA UNO DE LOS PARÁMETROS A DIFERENTE TIEMPO DE INCUBACIÓN. SE ENCONTRÓ QUE AL AUMENTAR EL TIEMPO DE INCUBACIÓN HAY UN CAMBIO EN LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN CADA UNA DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS. SIN EMBARGO, DESPUÉS DE LOS 70' DE INCUBACIÓN, LA BACTERIA APARENTAMENTE EVADE EL EFECTO QUE TIENE CADA UNA DE LAS VARIABLES SOBRE ELLA PARA SEGUIR SU REPLICACIÓN NORMAL. SE PUEDE OBSERVAR ENTONCES UNA DISMINUCIÓN EN LA INHIBICIÓN BACTERIANA A PARTIR DE LOS 90' DE INCUBACIÓN, TAL Y COMO SE MUESTRA EN LAS TABLAS 9 Y 10.

EN CUANTO A LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PEROXIDASA LOS LEUCOCITOS DE LOS CONTROLES NORMALES MUESTRAN DIFERENCIAS EN CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA CON RESPECTO A LAS DE LAS CÉLULAS DE LAS PACIENTES, TAMBIÉN EXISTE APARENTEMENTE UNA MAYOR ACTIVIDAD DE PEROXIDASA EN LOS LEUCOCITOS DE LAS PACIENTES CON RESPECTO A LOS CONTROLES NORMALES, AUNQUE LAS DIFERENCIAS ENCONTRADAS NO SON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

EN CUANTO A LAS CUENTAS DIFERENCIALES TOTALES Y PORCENTUALES DE LOS LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA, SE ENCONTRÓ LEUCOPENIA Y EOSINOFILIA EN ALGUNAS PACIENTES COMO SE PUEDE VER EN LAS TABLAS 13 Y 14, PERO LAS DIFERENCIAS ENCONTRADAS NO SON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

TABLA I. EFECTO BACTERICIDA DEL SISTEMA PO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> FRENTE A ESCHERICHIA COLI INVASIVA.

EXPERI- MENTO	CONTROL (A)	% DE INHIBICION DEBIDO A:			
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (B)	PO I (C)	PO A (D)	SISTEMA (E)
01	18.4	0.0	0.0	0.0	28.0
02	27.2	0.0	--	--	17.1
03	14.5	25.8	20.7	0.0	16.5
04	10.5	16.5	0.0	0.0	12.0
05	1.5	9.7	0.0	6.5	0.0
06	2.0	23.2	17.7	13.7	16.0
07	1.8	0.0	0.0	0.0	19.0
08	2.2	13.7	--	--	47.8
09	1.9	5.3	--	0.0	23.7

- (A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS x 10<sup>6</sup>, CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 18 HRS. DE INCUBACIÓN A 37°C .
- (B): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM.
- (C): 230 NG DE PEROXIDASA DE RÁBANO/ML INACTIVADA EN BAÑO MARÍA A EBULLICIÓN DURANTE 30'.
- (D): 230 NG DE PEROXIDASA DE RÁBANO/ML.
- (E): SISTEMA DE PEROXIDACIÓN: PEROXIDASA DE RÁBANO 230 NG/ML, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM Y NaCl 10 mM. CADA MEZCLA DE REACCIÓN CONTIENE REGULADOR DE ACETATOS 0.05M PH 5.0, GLUCOSA 75 mM Y SE LLEVA A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML CON H<sub>2</sub>O. LA MEZCLA DE REACCIÓN FUE INCUBADA A 37°C DURANTE 30'.

**TABLA 2.** EFECTO BACTERICIDA DEL SISTEMA  $PO-H_2O_2-Cl^-$  FRENTE A ESCHERICHIA COLI NO INVASIVA.

EXPERI- MENTO	CONTROL (A)	% DE INHIBICION DEBIDO A:			
		$H_2O_2$ (B)	PO I (C)	PO A (D)	SISTEMA (E)
01	8.2	65.7	0.0	0.0	83.9
02	19.8	0.0	0.0	0.0	23.0
03	12.7	8.3	40.1	37.3	28.7
04	7.4	35.2	0.0	0.0	0.0
05	1.5	42.0	61.3	84.0	55.0
06	1.8	22.3	22.3	25.0	36.2
07	3.0	0.0	33.3	0.0	23.3
08	1.8	0.0	8.4	27.0	41.7
09	1.4	21.5	21.5	11.5	82.5

- (A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS  $\times 10^6$ , CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 8 HRS. DE INCUBACIÓN A  $37^\circ C$ .
- (B):  $H_2O_2$  1.0 mM.
- (C): 230 NG DE PEROXIDASA DE RÁBANO/ML INACTIVADA EN BAÑO MARÍA A EBULLICIÓN DURANTE 30'.
- (D): 230 NG DE PEROXIDASA DE RÁBANO/ML.
- (E): SISTEMA DE PEROXIDACIÓN; PEROXIDASA DE RÁBANO 230 NG/ML,  $H_2O_2$  1.0 mM Y Na Cl 10 mM. CADA MEZCLA DE REACCIÓN CONTIENEN REGULADOR DE ACETATOS 0.05 M; PH 5.0, GLUCOSA 75mM Y SE LLEVA A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML CON  $H_2O$ . LA MEZCLA DE REACCIÓN SE INCUBÓ A  $37^\circ C$  DURANTE 30', SOMETIÉNDOSE A UNA SERIE DE DILUCIONES ANTES DE CULTIVARSE COMO SE INDICA EN (A).

**TABLA 3. EFECTO BACTERICIDA DE LEUCOCITOS NORMALES FRENTE A ESCHERICHIA COLI A 45' DE INCUBACIÓN.**

EXPERIMENTO	CONTROLES (A) X 10 <sup>6</sup>	% DE INHIBICION DEBIDO A:		
		NUMERO DE CELULAS (B)		
		1.5 x 10 <sup>6</sup>	2.0 x 10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>
1. E. COLI INV.	3.5	31.4*	--*	--*
E. COLI NO INV.	2.7	1.8	--	--
2. E. COLI INV.	5.5	--	65.1	--
E. COLI NO INV.	5.1	--	0.0	--
3. E. COLI INV.	3.0	--	58.0	59.9
E. COLI NO INV.	2.7	--	9.3	--
4. E. COLI INV.	1.4	--	0.0	0.0
E. COLI NO INV.	1.6	--	0.0	0.0
5. E. COLI INV.	2.0	--	12.5	0.0
E. COLI NO INV.	2.0	--	7.5	50.0

(A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS X 10<sup>6</sup>, CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 18 HRS. DE INCUBACIÓN A 37°C.

(B): LEUCOCITOS DE LAS CONTROLES NORMALES EN LA CANTIDAD INDICADA.

CADA MEZCLA DE REACCIÓN SE LLEVÓ A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML. CON MEDIO DE CULTIVO TC Y SE INCUBÓ A 37°C DURANTE 45', SE SOMETIÓ A UN CHOQUE LEUCOCITARIO Y SE PROCEDIÓ A CULTIVARSE COMO SE INDICA EN (A).

**TABLA 4.** EFECTO BACTERICIDA DE LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CACU FRENTE A ESCHERICHIA COLI A 45' DE INCUBACIÓN.

	CONTRO- LES(A) $\times 10^6$	% DE INHIBICION DEBIDO A:				
		NUMERO DE CELULAS (B)				
		$0.5 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
1. E. COLI INV.	1.8	0.0	20.9	--	--	--
E. COLI NO INV.	1.3	0.0	0.0	--	--	--
2. E. COLI INV.	3.1	0.0	4.7	--	--	--
E. COLI NO INV.	2.6	8.3	0.0	--	--	--
3. E. COLI INV.	2.4	11.2	25.4	--	--	--
E. COLI NO INV.	2.0	--	--	--	17.5	17.5
4. E. COLI INV.	2.4	8.3	16.7	--	--	--
5. E. COLI INV.	3.5	--	--	9.0	52.4	--
6. E. COLI INV.	3.0	--	--	--	30.0	36.8
7. E. COLI INV.	2.0	--	--	--	7.0	2.5

(A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS  $\times 10^6$ , CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 18 HRS. DE INCUBACIÓN A 37°C.

(B): LEUCOCITOS DE LAS PACIENTES EN LA CANTIDAD INDICADA. CADA MEZCLA DE REACCIÓN SE LLEVÓ A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML. CON MEDIO DE CULTIVO TC Y SE INCUBÓ A 37°C DURANTE 45', SE SOMETIÓ A UN CHOQUE LEUCOCITARIO Y SE PROCEDIÓ A CULTIVAR COMO SE INDICA EN (A).

**TABLA 5.** EFECTO BACTERICIDA DE LEUCOCITOS NORMALES FRENTE A ESCHERICHIA COLI INVASIVA.

MUESTRA	CONTROL (A)	% DE INHIBICION DEBIDO A:		
		CELULAS (B)	SUERO D (C)	CELULAS SUERO D
01	5.1	65.1	--	--
02	3.0	58.8	--	--
03	1.4	0.0	--	--
04	2.0	12.5	--	--
05	1.0	67.5	63.7	62.6
06	3.7	71.7	0.0	76.3
07	2.2	11.6	0.0	0.0
08	1.4	8.0	0.0	35.0
09	2.6	0.0	0.0	0.0
10	2.1	18.6	0.0	14.1
11	0.8	11.6	20.2	8.6
12	0.4	0.0	0.0	0.0
13	0.7	0.7	0.0	0.0
14	1.3	0.0	1.3	24.6
15	0.8	52.7	2.3	25.3
16	3.5	0.0	0.0	0.0
17	3.0	7.6	6.6	0.0
18	3.4	36.0	40.3	51.0
19	3.2	18.0	25.0	27.0

- (A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS  $\times 10^6$ , CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 18 HRS. DE INCUBACIÓN A 37°C.
- (B):  $2 \times 10^6$  LEUCOCITOS DE LOS CONTROLES NORMALES CONTENIDOS EN LA MEZCLA DE REACCIÓN.
- (C): SUERO AUTÓLOGO DESCOMPLEMENTADO EN BAÑO MARÍA A 56°C DURANTE 30'. LA MEZCLA DE REACCIÓN SE LLEVÓ A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML. CON MEDIO DE CULTIVO TC Y SE INCUBÓ A 37°C DURANTE 45', SE SOMETIÓ A UN CHOQUE LEUCOCITARIO Y SE PROCEDIÓ A CULTIVAR COMO SE INDICA EN (A).

**TABLA 6.** EFECTO BACTERICIDA DE LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CACU FRENTE A ESCHERICHIA COLI INVASIVA.

MUESTRA	CONTROL (A)	% DE INHIBICION DEBIDO A:		
		CELULAS (B)	SUERO D (C)	CELULAS SUERO D
01	5.1	52.4	--	--
02	3.0	30.0	--	--
03	1.4	0.0	--	--
04	2.0	7.0	--	--
05	0.9	83.7	0.0	22.1
06	3.7	85.8	10.2	10.2
07	2-1	0.0	0.0	0.0
08	2.7	0.0	0.0	0.0
09	0.8	12.3	13.7	13.7
10	1.3	0.0	0.0	0.0
11	3.5	0.0	0.0	0.0
12	3.0	0.0	0.0	0.0

- (A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS  $\times 10^6$ , CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 18 HRS. DE INCUBACIÓN A 37°C.
- (B):  $2 \times 10^6$  LEUCOCITOS DE LOS PACIENTES CONTENIDOS EN LA MEZCLA DE REACCIÓN.
- (C): SUERO AUTÓLOGO DESCOMPLEMENTADO EN BAÑO MARÍA A 56°C DURANTE 30'. LA MEZCLA DE REACCIÓN SE LLEVÓ A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML. CON MEDIO DE CULTIVO TC Y SE INCUBÓ A 37°C DURANTE 45', SE SOMETIÓ A UN CHOQUE LEUCOCITARIO Y SE PROCEDIÓ A CULTIVAR COMO SE INDICA EN (A).

**TABLA 7. EFECTO BACTERICIDA DE LEUCOCITOS NORMALES FRENTE A ESCHERICHIA COLI INVASIVA A 70' DE INCUBACIÓN.**

MUESTRA	CONTROL (A)	% DE INHIBICION DEBIDO A:				
		CELULAS (B)	SUERO (C)	CELULAS D (D)	CELULAS SUERO	CELULAS SUERO D
20	7.9	0.0	80.3	19.0	86.1	22.4
21	60.5	78.5	97.6	56.0	98.5	74.3
22	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
23	3.0	90.0	63.0	0.0	0.0	0.0
24	27.6	0.0	18.9	24.7	97.7	95.9
25	25.6	0.0	22.9	0.0	0.0	67.1
26	8.5	0.0	34.8	0.0	82.9	0.0
27	14.3	0.0	94.8	22.1	97.4	20.8
28	14.3	7.7	96.7	24.0	97.3	11.1

- (A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS  $\times 10^6$ , CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 18 HRS. DE INCUBACIÓN A 37°C.
- (B):  $2 \times 10^6$  LEUCOCITOS EN CADA MEZCLA DE REACCIÓN.
- (C): SUERO AUTÓLOGO A CADA MUESTRA.
- (D): SUERO AUTÓLOGO A CADA MUESTRA DESCOMPLEMENTADO EN BAÑO MARÍA A 56°C DURANTE 30'. CADA MEZCLA DE REACCIÓN SE LLEVÓ A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML. CON MEDIO CULTIVO TC Y SE INCUBÓ A 37°C DURANTE 70', SE SOMETIÓ A UN CHOQUE LEUCOCITARIO Y SE PROCEDIÓ A CULTIVAR COMO SE INDICA EN (A).



**TABLA 8.** EFECTO BACTERICIDA DE LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CACU FRENTE A ESCHERICHIA COLI INVASIVA A 70' DE INCUBACIÓN.

MUESTRA	CONTROL (A)	% DE INHIBICIÓN DEBIDO A:				
		CELULAS (B)	SUERO (C)	SUERO D (D)	CELULAS SUERO	CELULAS SUERO D
13	7.9	0.0	77.8	0.0	8.0	98.0
14	60.5	69.0	20.5	73.5	96.8	62.5
15	8.8	0.0	88.2	0.0	97.6	0.0
16	8.8	0.0	82.0	0.0	88.6	0.0
17	27.6	0.0	95.9	11.1	96.8	38.1

(A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS  $\times 10^6$ , CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 18 HRS. DE INCUBACIÓN A 37°C.

(B):  $2 \times 10^6$  LEUCOCITOS EN CADA MEZCLA DE REACCIÓN.

(C): SUERO AUTÓLOGO A CADA MUESTRA.

(D): SUERO AUTÓLOGO DESCOMPLEMENTADO EN BAÑO MARÍA A 56°C DURANTE 30'. CADA MEZCLA DE REACCIÓN SE LLEVÓ A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML. CON MEDIO DE CULTIVO TC Y SE INCUBÓ A 37°C DURANTE 70', SE SOMETIÓ A UN CHOQUE LEUCOCITARIO Y SE PROCEDIÓ A CULTIVAR COMO SE INDICA EN (A).

**TABLA 9.** CINÉTICAS DEL EFECTO BACTERICIDA DE LEUCOCITOS NORMALES FRENTE A ESCHERICHIA COLI INVASIVA.

TIEMPO	MUESTRA	CONTROL (A)	% DE INHIBICION DEBIDO A:				
			CELULAS (B)	SUERO A (C)	SUERO D (D)	CELULAS SUERO G	CELULAS SUERO D
20'	01	3.3	63.0	57.0	--	71.0	--
	02	1.2	13.8	10.4	--	0.0	--
	03	0.6	12.5	16.7	--	0.0	--
	04	1.8	40.6	4.5	20.6	32.2	0.0
	05	1.4	54.7	38.8	14.9	36.8	44.7
	06	1.3	25.2	19.3	11.8	31.9	24.5
	07	1.2	20.6	33.1	24.0	10.8	44.7
45'	02	2.1	18.6	0.0	--	14.1	--
	03	0.8	11.6	20.2	--	8.6	--
	06	3.4	35.9	40.3	30.3	56.8	50.9
	07	3.2	18.8	25.1	3.8	26.9	50.0
70'	01	4.9	37.7	57.0	--	62.3	--
	03	1.4	10.8	16.0	--	23.3	--
	04	8.3	23.5	25.1	77.7	52.1	91.4
	05	6.3	0.0	0.0	89.2	17.3	94.6
	06	14.8	71.9	65.4	72.4	66.2	62.2
	07	8.8	54.6	44.4	72.8	31.9	78.0
	90'	04	5.2	21.7	40.7	97.2	50.0
05		8.4	0.0	--	78.0	--	0.0
120'	03	12.3	0.0	52.9	--	63.5	--

LOS MISMOS CRITERIOS PARA (A), (B), (C) Y (D) DE LAS TABLAS 7 Y 8. CADA MEZCLA DE REACCIÓN SE INCUBÓ A 37°C DURANTE LOS TIEMPOS INDICADOS, SE SOMETIÓ A UN CHOQUE LEUCOCITARIO Y SE PROCEDIÓ A CULTIVAR COMO SE INDICA EN (A).

**TABLA 10.** CINÉTICA DEL EFECTO BACTERICIDA DE LEUCOCITOS NORMALES FRENTE A ESCHERICHIA COLI INVASIVA.

TIEMPO	CONTROL (A)	% DE INHIBICION DEBIDO A:				
		CELULAS (B)	SUERO (C)	SUERO D (D)	CELULAS SUERO	CELULAS SUERO D
20'	1.3	24.2	11.8	19.3	24.5	31.9
45'	3.4	35.9	30.3	40.3	56.8	50.9
70'	14.8	71.9	72.4	65.8	62.6	66.2
90'	9.8	0.0	0.0	0.0	27.8	0.0

- (A): NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS  $\times 10^6$ , CONTADAS EN PLACA DESPUÉS DE 18 HRS. DE INCUBACIÓN A 37°C.
- (B):  $2 \times 10^6$  LEUCOCITOS EN CADA MEZCLA DE REACCIÓN.
- (C): SUERO AUTOLÓGO A CADA MUESTRA.
- (D): SUERO AUTOLÓGO A CADA MUESTRA DESCOMPLEMENTADO EN BAÑO MÁRÍA A 56°C DURANTE 30'. CADA MEZCLA DE REACCIÓN SE LLEVÓ A UN VOLUMEN FINAL DE 2.0 ML. CON MEDIO DE CULTIVO TC Y SE INCUBÓ A 37°C DURANTE LOS TIEMPOS INDICADOS, SE SOMETIÓ A UN CHOQUE LEUCOCITARIO Y SE PROCEDIÓ A CULTIVAR COMO SE INDICA EN (A).

**TABLA 11.** DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CACU.

MUESTRA	PROTEINA (A)	U E (B)
01	64.2	3.1
02	15.7	12.0
03	47.4	5.4
06	18.3	7.0
07	56.3	5.3
08	139.3	7.9
09	71.1	2.5
10	96.0	9.8
11	95.0	16.3
12	52.5	8.8
14	86.9	4.1
15	73.0	2.4
16	62.6	9.1
17	102.6	4.8
18	19.4	6.9
19.	35.1	18.2
20	55.7	18.8
21	46.1	6.2
22	13.3	13.5
23	135.6	5.0
$\bar{x}$	64.3	8.3
$\sigma$	36.6	5.0

(A): CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DETERMINADA POR EL MÉTODO DE LOWRY EXPRESADA EN UG DE PROTEÍNA/ $0.5 \times 10^6$  LEUCOCITOS.

(B): ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DETERMINADA POR EL MÉTODO DE LA O-DIAMISIDINA EXPRESADA EN UNIDADES ENZIMÁTICAS (UE).

UE : CANTIDAD DE ENZIMA NECESARIA PARA PRODUCIR UN CAMBIO DE 0.1 EN LA DENSIDAD OPTICA RESULTANTE BAJO LAS CONDICIONES DEL ENSAYO.

**TABLA 12.** DETERMINACIÓN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LEUCOCITOS NORMALES.

MUESTRA	PROTEÍNA <sup>(A)</sup>	U E <sup>(B)</sup>
06	97.7	5.8
07	100.7	3.0
09	65.1	3.2
10	85.9	6.8
11	71.1	5.4
12	77.0	6.3
13	68.0	3.8
14	107.5	7.1
15	116.0	13.8
16	51.2	8.7
17	131.2	2.4
18	25.0	14.6
19	52.5	8.2
20	117.3	2.3
22	40.6	4.9
23	57.3	5.6
24	66.7	4.5
25	85.9	2.7
26	59.1	7.1
27	83.4	4.7
28	31.3	10.9
29	27.8	5.7
30	25.4	5.1
31	81.2	9.7
32	66.2	3.1
$\bar{X}$	71.6	6.2
$\sigma$	29.7	3.4

(A): CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DETERMINADA POR EL MÉTODO DE LOWRY EXPRESADA EN  $\mu\text{g}$  DE PROTEÍNA/ $0.5 \times 10^6$  LEUCOCITOS.

(B): ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DETERMINADA POR EL MÉTODO DE LA O-DIANISIDINA EXPRESADA EN UNIDADES ENZIMÁTICAS.

TABLA 13. CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CACU.

CUENTA TOTAL				CUENTA PORCENTUAL					
MUESTRA	L.C./MM <sup>3</sup>	L	N	L	N	M	E	Bs	Bn
01	10 600	2 332	7 950	22	75	0	1	1	2
02	11 866	2 136	7 238	18	61	8	13	0	0
03	3 685	847	2 064	23	56	12	8	0	1
04	2 600	156	2 366	6	91	2	1	0	0
05	2 859	486	1 458	17	51	6	23	1	2
06	12 435	4 725	6 964	38	56	3	2	0	1
07	3 657	810	2 661	21	69	8	2	0	0
08	4 721	1 275	3 399	27	72	1	0	0	0
09	3 059	1 071	1 958	35	64	1	0	0	0
10	5 383	1 292	3 983	24	74	0	0	0	2
11	5 383	2 007	2 207	54	41	1	1	1	3
12	5 586	3 016	2 123	54	38	6	1	0	1
14	2 726	627	2 072	23	76	0	0	1	0
16	7 647	3 823	3 059	50	40	5	2	0	3
19	5 373	1 612	3 385	30	63	3	2	1	1
$\bar{X}$	5 852	1 806	3 526	29	62	4	4	0,3	1
$\sigma$	3 307	1 324	2111,5	14	15	3,5	6	0,4	1

L.T. = LEUCOCITOS TOTALES

L = LINFOCITOS

N = NEUTRÓFILOS

M = MONOCITOS

E = EOSINÓFILOS

Bs = BASÓFILOS

Bn = BANDAS

$\bar{X}$  = MEDIA

$\sigma$  = DESVIACIÓN ESTÁNDAR

TABLA 14. CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS DE DONADORAS NORMALES.

MUESTRA	CUENTA TOTAL			CUENTA PORCENTUAL					
	L.T./MM <sup>3</sup>	L	N	L	N	M	E	Bs	Bn
06	8 046	4 103	3 782	51	47	1	0	0	1
07	7 186	1 509	4 671	21	65	8	3	0	3
08	5 650	1 872	3 393	32	58	4	5	1	0
09	3 391	1 187	2 001	35	59	2	1	0	3
11	6 783	4 205	2 374	62	35	1	1	0	1
12	5 918	3 402	1 953	59	33	2	6	0	0
13	9 310	4 283	4 934	46	53	0	0	1	0
14	4 089	3 598	409	88	10	1	1	0	0
15	6 916	1 383	5 187	20	75	3	0	0	2
17	2 726	1 499	1 118	55	41	3	0	0	1
18	8 113	5 354	2 677	66	33	1	0	0	0
19	4 987	997	3 790	20	76	2	2	0	0
20	7 182	4 955	2 226	69	31	0	0	0	0
21	8 771	2 178	6 446	25	74	1	0	0	0
24	1 795	484	1 221	27	68	3	2	0	0
26	5 786	2 893	2 719	50	47	3	0	0	0
27	6 850	1 849	4 589	27	67	3	2	0	1
28	6 916	3 250	3 181	47	46	3	2	1	1
29	5 985	1 676	4 130	28	69	0	2	0	1
30	4 400	2 728	1 452	62	33	1	0	4	0
31	10 760	6 456	4 089	60	38	2	0	0	0
32	4 100	1 517	2 173	37	53	4	4	2	0
33	6 583	3 291	3 093	50	47	2	0	0	0
34	4 788	3 160	1 340	66	28	2	2	0	2
-									
X	6 132	2 830	3 039	46	49	2	1.3	0.4	0.7
σ	2 116	1 526	1 505	20	17	1.5	1.5	0.8	0.8

L.T. = LEUCOCITOS TOTALES  
 L = LINFOCITOS  
 N = NEUTRÓFILOS  
 M = MONOCITOS  
 E = EOSINÓFILOS

Bs = BASÓFILOS  
 Bn = BANDAS  
 - =  
 X = MEDIA  
 σ = DESVIACIÓN ESTÁNDAR

## DISCUSION.

BASADOS EN ESTUDIOS ANTERIORES, EN DONDE SE HAN OBSERVADO DIVERSAS ALTERACIONES EN LOS LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO, SE ABORDÓ EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA, BUSCANDO DEFECTOS ENZIMÁTICOS O CELULARES QUE NOS PERMITIERAN AUMENTAR NUESTRO CONOCIMIENTO SOBRE LA RELACIÓN QUE EXISTE ENTRE LA RESPUESTA INMUNE Y EL DESARROLLO DE UN TUMOR.

LOS LEUCOCITOS PMNS SON LAS CÉLULAS QUE SE ENCUENTRAN EN MAYOR NÚMERO EN LA CIRCULACIÓN SANGUÍNEA Y FORMAN PARTE DE LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA, LO CUAL CONSTITUYE UNA DE LAS PRIMERAS BARRERAS DE DEFENSA PARA LA ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS Y CÉLULAS EXTRAÑAS AL INDIVIDUO. POR ELLO, Y CON EL FIN DE CONOCER MÁS ACERCA DE LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS PMNS, SE MONTÓ UN MODELO IN VITRO PARA ESTUDIAR EL EFECTO QUE TIENEN ÉSTOS, SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO Y EL QUE TIENEN EN PRESENCIA O AUSENCIA DE SUERO AUTÓLOGO. ADEMÁS, CON EL MISMO FIN, SE DETERMINÓ LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LOS LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA EN RELACIÓN A LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA ENCONTRADA.

AL ESTUDIAR EL SISTEMA DE PROXIDACIÓN, IN VITRO, LIBRE DE CÉLULAS CONSITUIDO POR PEROXIDASA DE RÁBANO,  $H_2O_2$  Y  $Cl^-$ , SE VERIFICARON LAS CONCENTRACIONES DE CADA COMPONENTES DEL SISTEMA QUE HAN SIDO REPORTADAS POR DIVERSOS INVESTIGADORES (CLARK, KLENOFF, ETC.). ESTAS CONCENTRACIONES FUERON ADECUADAS PARA OBSERVAR EL EFECTO QUE SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO TIENE EL SISTEMA DE PROXIDACIÓN EMPLEADO, BAJO LAS CONDICIONES EMPLEADAS EN CADA EN SAYO.



EL EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO QUE TIENE EL SISTEMA DE PEROXIDACIÓN FUE MÁS MARCADO SOBRE LA CEPA DE E. COLI NO INVASIVA. LO CUAL PODRÍA SER UN REFLEJO DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA IN VIVO FRENTE A LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS.

ADEMÁS, KLEBANOFF Y COLABORADORES HAN DESCRITO QUE EL  $H_2O_2$  A BAJAS CONCENTRACIONES TIENE UN EFECTO BACTERICIDA POR SÍ SOLO, QUE ES TANTO MÁS INTENSO COMO MAYOR ES LA CONCENTRACIÓN. ASÍ EN EL PRESENTE TRABAJO EL  $H_2O_2$  MOSTRÓ UN EFECTO BACTERICIDA POR SÍ SOLO A LAS CONCENTRACIONES EMPLEADAS EN CADA ENSAYO, SIENDO MAYOR EL EFECTO SOBRE LA CEPA DE E. COLI NO INVASIVA, LO QUE APOYA LO ANTERIORMENTE DICHO.

AL TRATAR DE ENCONTRAR LAS CONDICIONES ÓPTIMAS, EN CUANTO AL NÚMERO DE CÉLULAS Y TIEMPO DE INCUBACIÓN, SE ESCOGIÓ UNA CONCENTRACIÓN DE  $2.0 \times 10^6$  CÉLULAS COMO LA ADECUADA, YA QUE AL PROBAR ESTE NÚMERO DE CÉLULAS SE OBSERVÓ UNA INHIBICIÓN MÁS APARENTE CON ASPECTO A LA PRODUCIDA A OTRAS CONCENTRACIONES CELULARES. ADEMÁS, DESPUÉS DE HABER SOMETIDO A LAS CÉLULAS A VARIOS PERIODOS DE INCUBACIÓN SE TOMÓ 45' Y 70' COMO LOS MÁS ADECUADOS.

SIN EMBARGO, DESPUÉS DE HABER REALIZADO UNA SERIE DE EXPERIMENTOS CON LAS CONDICIONES ELEGIDAS CON LAS CÉLULAS DE LAS PACIENTES Y DE LOS CONTROLES NORMALES, NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS BIEN DEFINIDAS, DEBIDO A QUE HUBO UNA GRAN VARIACIÓN EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS DE LOS CONTROLES NORMALES. NO OBSTANTE, A PASAR DE ELLO, SE OBSERVÓ QUE EL SISTEMA DE PEROXIDACIÓN LIBRE DE CÉLULAS TIENE UN MENOR EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO EN RELACIÓN AL QUE TIENE PARTICIPACIÓN CELULAR, LO QUE SE ESPERABA DEBIDO A QUE EXISTEN GRAN CANTIDAD DE FACTORES QUE PUEDEN ESTAR INVOLUCRADOS EN EL SISTEMA CON PARTICIPACIÓN CELULAR. TALES FACTORES INCLUYEN LAS SUSTANCIAS CON PROPIEDADES BACTERICIDAS YA PRESENTES EN EL LEUCOCITO, COMO SON LA LACTOFERRINA Y LISOZIMA O AQUELLAS QUE SON ELABORADAS DURANTE LA FAGOCITOSIS COMO SON EL  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  Y  $O_2^-$ .

ADEMÁS, AL AGREGAR EL SUERO AUTÓLOGO AL SISTEMA CON PARTICIPACIÓN CÉLULAR, SE INVOLUCRA UN MAYOR NÚMERO DE FACTORES EN LA DESTRUCCIÓN BACTERIANA, COMO SON LAS INMUNOGLOBULINAS Y EL COMPLEMENTO, FACILITANDO DE ESTA MANERA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EL SISTEMA. POR OTRO LADO, ERA DE ESPERARSE QUE AL DESCOMPLEMENTAR EL SUERO AUTÓLOGO SE PERDIERA EL EFECTO CON RESPECTO AL DEL SUERO AUTÓLOGO ACTIVO.

AL ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO DE E. COLI INVASIVA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN, SE ENCONTRÓ QUE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO LLEVADO A CABO POR CADA UNO DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS TANTO EN PACIENTES COMO EN NORMALES FUE BIEN MANIFESTADO AL IR AUMENTANDO EL PERIODO DE INCUBACIÓN. SIN EMBARGO, DESPUÉS DE LOS 70' DE INCUBACIÓN LA BACTERIA EVADE EL EFECTO QUE TIENE CADA UNA DE LAS VARIABLES SOBRE ELLA PARA SEGUIR SU REPLICACIÓN NORMAL. ELLO, NOS SUGIERE QUE DEBE DE HABER UNA RELACIÓN BACTERIA/CÉLULA TAL QUE PERMITA OPTIMIZAR EL NÚMERO DE CÉLULAS PARA QUE SEA CAPAZ DE INHIBIR EL DESARROLLO BACTERIANO A CIERTO PERIODO DE TIEMPO. DE TAL MANERA QUE AL ESTAR EN DESEQUILIBRIO LA RELACIÓN BACTERIA/CÉLULA, LA BACTERIA EN CIERTO PERIODO DE TIEMPO EVADE EL EFECTO QUE SOBRE ELLA TIENEN LAS CÉLULAS Y PROSIGUE SU PROLIFERACIÓN.

EN CUANTO A LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PEROXIDASA, NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL GRUPO DE PACIENTES CON CÁNCER Y EL DE LOS CONTROLES NORMALES. SIN EMBARGO, ALGUNAS PACIENTES MOSTRARON CONCENTRACIONES FUERA DE LOS LÍMITES NORMALES. LO MISMO SUCEDIÓ EN RELACIÓN A LAS CUENTAS DIFERENCIALES, YA QUE NO SE ENCONTRÓ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE EL GRUPO DE PACIENTES Y EL DE LOS CONTROLES NORMALES. ALGUNAS PACIENTES MOSTRARON TAMBIÉN DATOS FUERA DE LOS VALORES NORMALES, OBSERVÁNDOSE LEUCOPENIA, LINFOPENIA Y EOSINOFILIA COMO HA SIDO REPORTADO EN ESTUDIOS ANTERIORES DE PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO.

ASÍ, EN ESTE TRABAJO SE INICIÓ LA BÚSQUEDA DE LAS CONDICIONES ADECUADAS DE UN SISTEMA QUE NOS PERMITA EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD FAGOCÍTICA Y CAPACIDAD ENZIMÁTICA DE LOS LEUCOCITOS PMNs DE PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO, Y TAL VEZ, EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE DICHAS CÉLULAS EN PACIENTES CON ALGUNA OTRA ENFERMEDAD DONDE QUEDA SUPONER ALTERACIONES EN LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA EN GENERAL O DE LA FUNCIÓN DE LOS PMNs EN PARTICULAR.

POR LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE CONSIDERA QUE PARA PODER VERIFICAR LA PARTICIPACIÓN DE LOS LEUCOCITOS PMNs EN EL MODELO ESTUDIADO SE REQUIERE PURIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA PODER ESTABLECER ADECUADAMENTE LAS DIFERENCIAS, SI ES QUE LAS HAY, ENTRE LOS DATOS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER Y AQUELLOS DE LOS CONTROLES NORMALES.

## CONCLUSIONES

1. EL SISTEMA DE PEROXIDACIÓN UTILIZADO, FUE EFICAZ PARA EL CONTROL DEL CRECIMIENTOS BACTERIANO A LAS CONDICIONES EMPLEADAS EN CADA ENSAYO.
2. LA CEPA BACTERIANA DE E. COLI NO INVASIVA ES MÁS SENSIBLE QUE LA OTRA CEPA (E. COLI INVASIVA) AL EFECTO PRODUCIDO POR EL SISTEMA DE PEROXIDACIÓN CONSTITUIDO POR PEROXIDASA DE RÁBANO  $H_2O_2-Cl^-$  BAJO LAS CONDICIONES DE ENSAYO.
3. AL ESTUDIAR, IN VITRO, LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS PMNS EN RELACIÓN A SU CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y/O CITOTÓXICA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE SUERO AUTÓLOGO, NO SE ENCONTRÓ DIFERENCIA ENTRE EL CONTROL QUE SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO TENÍAN LAS CÉLULAS DE PACIENTES CON CÁNCER Y LAS DE LOS CONTROLES NORMALES.
4. EL SISTEMA DE PEROXIDACIÓN LIBRE DE CÉLULAS TIENE MENOR EFECTO SOBRE EL CONTROL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN RELACIÓN AL QUE TIENE AQUEL DONDE SÍ HAY PARTICIPACIÓN CELULAR.
5. LAS CÉLULAS Y SUERO DE LOS CONTROLES NORMALES EJERCEN POR SÍ SÓLOS EN MAYOR EFECTO A LOS 70' DE INCUBACIÓN. ESTE EFECTO NO SE POTENCIALIZA AL MEZCLAR AMBOS EN UN SÓLO TUBO MEZCLA DE REACCIÓN.
6. LA CONCENTRACIÓN DE MPO EN LOS LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CÁNCER ES SEMEJANTE A LA DE LOS LEUCOCITOS DE LOS CONTROLES BAJO LAS CONDICIONES DEL ENSAYO.
7. NO HUBO DIFERENCIAS COMO GRUPO EN LAS CUENTAS DIFERENCIALES DE LOS LEUCOCITOS DE PACIENTES CON CÁNCER Y LAS DE LOS CONTROLES NORMALES.

**BIBLIOGRAFIA.**

1. AGUILAR - SANTELISES, M. INMUNOLOGÍA DE TUMORES. ACTA MEXICANA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, 11 (7): 29-35. (1984).
2. ALLISON, A.C. IMMUNOLOGICAL SURVEILLANCE OF TUMOURS. CANCER IMMUNOL. 2: 151-155. (1977).
3. BABIOR, B.M. THE RESPIRATORY BURST OF PHAGOCYTES. J.CLIN INVEST. 73: 599-601. (1984).
4. BANCROFT, H. INTRODUCCIÓN A LA BIOESTADÍSTICA. (8A. ED.) EUDEBA P.205-216. (1974).
5. BOGGS, D.R. Y WINLEISTEIN, A. EL LEUCOCITO. EL MANUAL MODERNO, MÉXICO. (1A. ED.). 45-55. (1985).
6. CABBELL, R.C. STATISTICS FOR BIOLOGISTS. (CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS ) 2<sup>ND</sup> EDITION. P. 50-62 (1975).
7. CLARK, R.A. OXIDATIVE INACTIVATION OF PNEUMOLYSIS BY THE MYELOPEROXIDASE SYSTEM AND STIMULATED HUMAN NEUTROPHILS. J. IMMUNOL. 136: 4617-4622 (1986).
8. CLARK, R.A. Y KLEBANOFF, S.J. CHEMOTACTIC FACTOR INACTIVATION BY THE MYELOPEROXIDASE-HIDROGEN PEROXIDE-HALIDE SYSTEM. J. CLIN. INVEST. 64: 913-920 (1979).
9. CLARK, R.A. Y KLEBANOFF, S.J. NEUTROPHIL-MEDIATED TUMOR CELL CYTOTOXICITY: ROLE OF THE PEROXIDASE SYSTEM. J.EXP. MED. 141: 1442-1447 (1975).

10. CLARK, R.A. Y KLEBANOFF, S.J. ROLE OF THE MYELOPEROXIDASE- $H_2O_2^-$  HALIDE SYSTEM IN CONCAVALIN A-INDUCED TUMOR CELL KILLING BY HUMAN NEUTROPHILS. J. IMMUNOL. 122: 2605-2610 (1979).
11. CRAMER, B.R., SORANZO, M.R. Y PATRIARCA, P. EVIDENCE THAT EOSINOPHILS CATALYZE THE BROMIDE-DEPENDENT DECARBOXYLATION OF AMINO ACIDS. BLOOD. 58(6): 1112-1118 (1981).
12. HAFEMAN, D.G. Y ZOLTAN, J.L. POLIMORPHONUCLEAR LEUCOCYTE-MEDIATED ANTIBODY-DEPENDENT CELULAR CYTOTOXICITY AGAINST TUMOUR CELLS: DEPENDENCE ON OXIGEN AND THE RESPIRATOY BURST. J. IMMUNOL. 123(1): 55-62 (1979).
13. JACQUES, M. MACROPHAGES AS HOST CELL AND REACTIVE DEFENCE CELLS. FORTCHRIT DER ZOOLOGIE. 12: 43-56 (1982).
14. JONG, E.C., HENDERSON, E.R. Y KLEBANOFF, S.J. BACTERICIDAL ACTIVITY OF EOSINOPHIL PEROXIDASE. J. IMMUNOL. 124(3): 1378-1383 (1980).
15. KJORSTAD, K.E. CARCINOMA OF CERVIX IN THE YOUNG PATIENT. OBSTETRICS AND GYNECOLOGY. 50 (1): 28-30 (1976).
16. KLEBANOFF, S.J. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CATALASE AT ACID PH. PROC.SOC.EXP.BIOL.MED. 132: 571-574 (1969)
17. KLEBANOFF, S.J. Y SHEPARD, CH. C. TOXIC EFFECT OF THE PEROXIDASE HYDROGEN PEROXIDE-HALIDE ANTIMICROBIAL SYSTEM ON MYCOBACTERIUM LEPRAE. INFECT. IMMUNITY. 44(2): 534-535 (1984).

18. KLEBANOFF, S.J. IODINATION OF BACTERIA: A BACTERICIDAL MECHANISM. J.EXP. MED. 126: 1063-1078 (1967).
19. KOREC, S., HERBERMAN, R.B., DEAN, J.H. Y CANNON, G.B. CYTOSTASIS OF TUMOR CELL LINES BY HUMAN GRANULOCYTES. CELL. IMMUNOL. 53: 104-115 (1980).
20. KOSS, L.G. EPIDEMIOLOGY OF CARCINOMA OF THE UTERINE CERVIX. PROCEEDINGS XI INTERNATIONAL CANCER CONGRESS. (FLORENCE).
21. LEVY, J.P. INMUNIDAD ANTITUMORAL. EN: BACK, F.J. (ED) INMUNOLOGÍA. 1A. EDICIÓN (ED. LIMUSA MÉXICO) P. 387-392 (1984).
22. NATHAN, C.F. MECHANISMS OF MACROPHAGES ANTIMICROBIAL ACTIVITY. TRANSACTIONS OF ROYAL SOCIETY OF TROP. MED. HYG. 77: 620-630 (1983).
23. OROSCO-CRUZ, R., AGUILAR-SANTELISES, M., RODRÍGUEZ-COQUIEZ, G Y ESTRADA-PARRA, S. DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES Y PARÁMETROS ASOCIADOS EN PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO UTERINO. REV. LAT. AMER. MICROBIOL. 29: 145-151 (1987).
24. ROSEN, H. Y KLEBANOFF, S.J. FORMATION OF SINGLET OXIGEN BY THE MYELOPEROXIDASE-MEDIATED ANTIMICROBIAL SYSTEM. J.BIOCHEM. CHEM. 252 (14): 4803-4810 (1977).
25. ROZEMBERG, A.M., SALTERS, M.E.C., STRIPJ, J.A.G., GEUZE, J.S. Y VERHOEF, J. ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF PHAGOCYTOSIS OF ESCHERICHIA COLI BY HUMAN POLIMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES. INFECT. IMMUN. 50(3): 852-859 (1985).

26. SALVARAJ, R.J. PAUL, B.B., STRAUSS, R.R., JACOBS, A.A. Y SBARRA, A.J. OXIDATIVE PEPTIDE CLEAVAGE AND DECARBOXYLATION BY THE  $\text{HPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$  ANTIMICROBIAL SYSTEM. INFECT. IMMUN. 9(2): 255-280 (1974).
27. SLIVKA, A., LOBUGLIO, A.F. Y WEISS, S.J. A POTENTIAL ROLE OF HYPOCHLOROUS ACID IN GRANULOCYTE-MEDIATED TUMOR CELL CYTOTOXICITY. BLOOD. 55(2): 347-350 (1980).
28. STITES, D.P., STOBO, J.D., FUNDERBERG, H.H. Y WELLS, J.V. INMUNOLOGÍA CLÍNICA. EL MANUAL MODERNO. MÉXICO, 112-127, 217-230 (1983).