
FACULTAD DE QUIMICA

Inmunización Activa en Leucemia Murina

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
GLORIA BECERRIL MEZA



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.

CLAS _____

AÑO _____

FECHA _____

PROG. _____

4

114 34



QUINTA

¡ Todo cuanto respíra alabe a Yahvéh! ¡Aleluya!

Sal. 150.6

A mis padres: Sr. Isaías Becerril Barajas
Sra. Socorro M. Becerril

A mis hermanos: Isaías, Rebeca, Ma. del Socorro,
Esperanza.

Al Sr. R. Humberto Manzano Cañas

A todos los miembros de la OCSFX por su ayuda y comprensión moral.

A mis primas: Sra. Q.B.P. Silvia Velázquez de Zamorano
Sra. Profa. Yolanda Velázquez de Domínguez por su valiosa ayuda en diferentes etapas de mi vida.

Mi profundo agradecimiento al Dr. Héctor Gómez Estrada por su enseñanza, comprensión y estímulo.

Agradezco al Laboratorio de Histocompatibilidad y al Bioterio del Departamento de Investigación del Centro Médico Nacional del IMSS, así como a todo el personal que colaboró directa o indirectamente para la realización de esta tesis.

Jurado Asignado originalmente según el tema:

Presidente:	Profesora	Magdalena Acosta Segura
Vocal:	"	Carmen Reyna Bordes
Secretario	"	Ernestina Ballesteros Rueda
1er. Suplente	"	Socorro Cao Romero Martínez
2do. Suplente	"	Dea Coronado Perdomo

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Histocompatibilidad del Departamento de
Investigación del Centro Médico Nacional del IMSS.

Sustentante: Gloria Becerril Meza

Asesor del tema: Q.F.B. Magdalena Acosta Segura

Supervisor Técnico: Dr. Héctor Gómez Estrada

I N D I C E

I. INTRODUCCION

ANTECEDENTES INMUNOLOGICOS EN NEOPLASIAS

ANTECEDENTES INMUNOLOGICOS DEL LINFOMA L5178Y

II. MATERIAL Y METODOS

III. RESULTADOS

IV. DISCUSION

V. RESUMEN

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFIA

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

El desarrollo de procedimientos para la detección oportuna y - tratamiento adecuado del cáncer, es uno de los principales objetivos de la investigación biomédica contemporánea.

En nuestro país, las enfermedades neoplásicas ocupan el 5o lugar como causa de mortalidad ¹. Dentro de ellas, la leucemia y los linfomas constituyen la segunda causa de letalidad ².

El desconocimiento de la etiología del cáncer es uno de los --- principales problemas para su prevención, diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado.

Un cierto optimismo se produjo al saber, que las células neoplásicas presentan, además de los antígenos de histocompatibilidad normales, otros adicionales denominados antígeno neoplasia específicos (ANE) ³⁻¹³. Contra ellas, se genera una respuesta inmune que tiende a eliminarlas por mecanismos semejantes a una --- reacción de rechazo ¹⁰. Sin embargo, la respuesta inmune suele resultar ineficaz en este sentido. Para incrementarla, se ha encontrado útil la modificación antigénica con neuraminidasa.

En este trabajo, se estudiaron el tipo y características de la respuesta inmune hacia células neoplásicas tratadas con neuraminidasa.

ANTECEDENTES INMUNOLÓGICOS EN NEOPLASIAS

Tratando de explicar el origen de las neoplasias, Conheim ¹⁴ propuso hace ya casi un siglo, que éstas se originan de la proliferación de células embrionarias que habían quedado en reposo en los tejidos normales.

Foley ³ y Prehn ⁵ demostraron en animales singénicos que las células de las neoplasias transplantables son portadoras de ANE y que la inmunización contra ellas podría ser utilizada para reducir el crecimiento del tumor experimental.

Siendo Shōne un investigador asociado a Ehrlich, informó ¹⁴ en 1906 que los ratones a los cuales se les había inmunizado con antígenos fetales de la misma especie, adquirían la capacidad de rechazar trasplantes neoplásicos, los cuales eran aceptados y resultaban letales cuando se aplicaban a ratones no inmunizados. Posteriormente se confirmó la presencia de antígenos embrionarios en algunas neoplasias experimentales y humanas ¹⁵⁻¹⁸. Estos fueron llamados antígenos carcinoembrionarios (ACE) ¹⁹ u oncofetales (ADF) ¹⁴, los cuales pueden considerarse equivalentes a los ANE ya mencionados ²⁰.

Los cambios antigénicos en las células neoplásicas parecen ser consecuencia de una expresión anormal de los genes, que ocurre concomitantemente a la transformación maligna y que se acompaña de una regresión hacia el estado embrionario o fetal ²¹⁻²³. Por esta razón las células neoplásicas son consideradas como embrionarias o fetales y persisten en el organismo de igual modo por el cual no son rechazados los embarazos ^{15,24-28}.

Los ANE han sido descritos unidos a las membranas de las células neoplásicas ^{3,5,7-13}, mientras que los AGE o AGF, independientemente de que tengan esta característica, puedan pasar a los líquidos extracelulares ^{17,19,20}.

Si se emplea una sustancia carcinogénica para inducir la aparición de neoplasias en una serie de animales de la misma cepa, por lo general, el tumor que se obtiene presenta ANE diferentes en cada animal y los anticuerpos contra dicho antígeno casi no dan reacción cruzada entre ellos ⁸. Esto indica que la naturaleza química de los ANE puede ser diversa de individuo a individuo y está condicionada por el portador de la neoplasia y no por el carcinogénico químico empleado ^{7,10}.

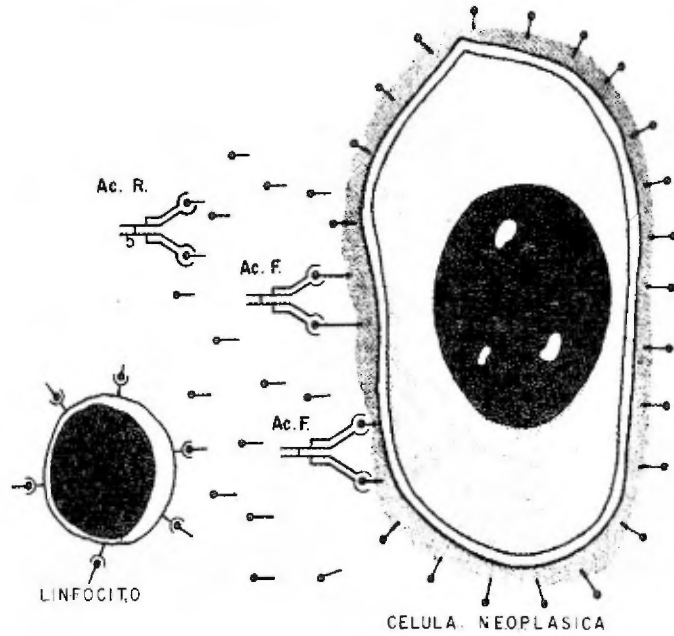
Por el contrario, cuando la transformación neoplásica es inducida por virus oncogénicos, las células malignas presentan ANE comunes y existe amplia reactividad cruzada de los anticuerpos anti-ANE ^{9,10,13}.

En estas neoplasias espontáneas, en las cuales no se ha podido implicar una etiología química o viral, también existe reactividad cruzada ^{9,11,12}.

Los casos clínicos de neoplasias con rubean que la respuesta inmune resulta ineficaz en este sentido: Se ha demostrado que el crecimiento tumoral puede ser favorecido por un mecanismo paradójico denominado de "facilitación inmunológica" mediado por anticuerpos (fig. 1) ^{25,30}.

Con el fin de hacer posible la inmunoterapia del cáncer, se desea que el organismo abandone el estado de facilitación inmunológica y desarrolle una respuesta inmune de rechazo hacia la

FIGURA 1
MECANISMOS DE INHIBICION DE LA INMUNIDAD HUMORAL Y
CELULAR HACIA CELULAS NEOPLASICAS



neoplasia (Fig. 2). Para lograrlo, es necesario conocer las relaciones inmunológicas existentes entre el tumor y el portador de la neoplasia.

Los ANE, ACE o ADF son glucoproteínas de la membrana celular²⁰, 31-34, las cuales tienen la propiedad de inducir la formación de anticuerpos de facilitación hacia ellos²⁸, pudiendo adicionalmente enmascarar los antígenos de histocompatibilidad normales^{31,32,35}.

Esto favorece la supervivencia y transplantabilidad de los tumores.

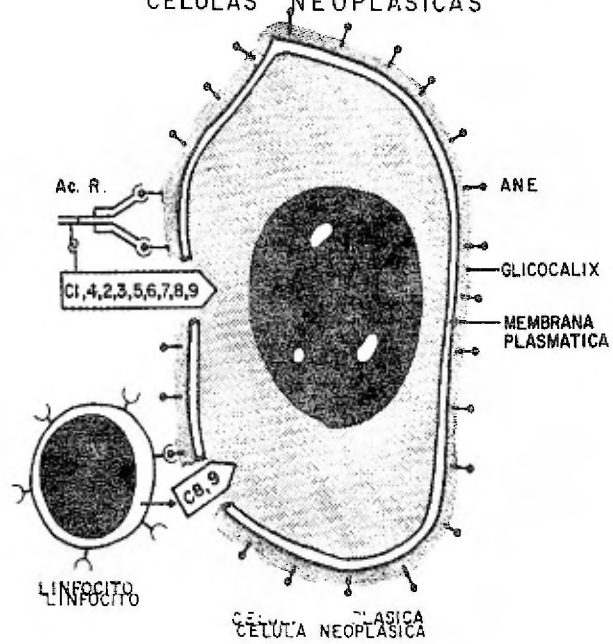
Por otra parte, la modificación de las glucoproteínas de las células malignas con neuraminidasa, permite obtener antígenos modificados los cuales se vuelven capaces de inducir una respuesta inmune de rechazo hacia las células de las neoplasias experimentales³⁶⁻⁴¹.

ANTECEDENTES DEL LINFOMA L5178Y

El presente trabajo se realizó con el linfoma murino trasplantable L5178Y. Este se originó espontáneamente como una leucemia de origen tímico de un ratón de la cepa DBA/2 en el laboratorio del Dr. Lloyd Law y posteriormente Fisher lo estableció como cultivo in vitro⁴². Las células neoplásicas fueron inoculadas con éxito en la cavidad peritoneal de los animales singélicos. Desde entonces ha sido mantenido por pasos sucesivos co

FIGURA 2

INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR CONTRA
CELULAS NEOPLASICAS



mo un tumor intraperitoneal que crece en forma de suspensión celular en el líquido de ascitis que provoca.

Dicho tumor fué importado a México de la Universidad de Utah E.U.A. Había sido mantenido en la Sección de Biología Celular del Departamento de Investigación Científica del Centro Médico del IMSS, de dónde fué cedido al Laboratorio de Histocompatibilidad del mismo Departamento por cortesía del Dr. Gallegos y del Sr. Longi. En aquella Sección había sido mantenido en receptores singénicos DBA/2 y se había observado que el tumor era perfectamente transplantable a ratones de la cepa BALB/c. en la cual su comportamiento es similar al de la cepa de origen.

La transferencia de 80 millones de células a receptores singénicos adultos por vía intraperitoneal, causa invariablemente el desarrollo del tumor. El receptor muere a los diez días post trasplante, con 4 a 6 ml de líquido de ascitis conteniendo de 960 a 1440 millones de células malignas.

MATERIAL Y METODOS

APARATOS

Contador para biometría hemática de 8 teclas.

Agitador para tubos.

Agitador con disco giratorio para tubos.

Cámara para electroforesis. Chemetron, modelo 2000.

Fuente de poder LKB, modelo 3371 D.

Microcentrífuga.

Centrífuga Sorvall.

Microscopio invertido con iluminación de contraste de fases.

Fotomicroscopio.

Estufa a 37°C.

Congelador a -70°C.

Refrigerador.

MATERIAL

Cámara cuentaglóbulos para eosinófilos.
Tubos de ensayo de vidrio de 8 ml con tapón de rosca, Pyrex.
Tubos Fisher para microcentrífuga.
Pipetas Pasteur esterilizadas.
Pipetas serológicas de 1 ml esterilizadas, graduadas en centésimas.
Pipetas serológicas de 5 ml esterilizadas, graduadas en décimas.
Matraces aforados de 1 litro.
Portaobjetos de 25x75 mm.
Portaobjetos de 50x75 mm.
Cubreobjetos de 24x50 mm.
Botellas T de vidrio para cultivo de tejidos de 5x7x1 cm de cara planas.
Placas de plástico excavadas para micropruebas de Falcon, modelo 3034.
Catéter de plástico cortado en fragmentos biselados, de 5 cm de largo, Farbiossa, modelo 772.
Jeringas esterilizadas, desechables de plástico de 2.5 y 5 ml,
Agujas hipodérmicas esterilizadas No. 20 y 22.
Tijeras de Mayo rectas de 15 cm.
Pinzas de disección con dientes.
Hojas de bisturí No. 14.
Placa de corcho de 30x20x1 cm.
Homogenizador de vidrio con pistilo de teflón.
Mechero Bunsen.

REACTIVOS

Neuraminidasa de Vibrio cholerae, General Biochemicals.
Adyuvante completo de Freund.
Medio de cultivo Mc Coys 5a estéril, Grand Island Biological Laboratories.
Medio de cultivo 199.
Suero fetal de ternera.
Heparina.
Colcemid, Sandoz.
Cloruro de potasio 0.075.
Solución de Carnoy, (Metanol, Ac. acético 3:1).
Colorante Giemsa.
Tripsina 1:250.
Tris (Hidroxi-metil-amino-metano).
EDTA (Acido etilen, diamino, tetra-acético).
Amortiguador de fosfatos, pH 6.8.
Agarosa.
Colorante de Ponceau.
Acido acético.
Acido sulfuroso.
Ficoll, Pharmacia.
Hypaque, Winthrop.
Eosina amarilla.
Colorante de Wright.
Barbiturato de sodio
Acido barbitúrico.
Azida de sodio
Formol
Resina sintética para histología, Harleco.

Etanol de 96^o.
Xilol.
Hielo seco.

MATERIAL BIOLÓGICO

Células neoplásicas, L5178Y.
Líquido de ascitis.
Suero de ratones inmunizados.
Linfocitos de ratones inmunizados y de mantenimiento.
Sobrenadante del líquido de ascitis.

RATONES: Se utilizaron 277 ratones de la cepa BALB/c y 6 de la cepa DBA/2 del sexo masculino y de edades entre 4 y 6 meses. Se mantuvieron alojados en habitaciones a temperatura constante - de 25^oC, distribuidos en grupos de cinco, en jaulas de plástico de 30x20x15 cm con viruta de madera en el fondo. Se les proporcionó alimento en trozos para roedores y agua ad libitum en el Bioterio del Departamento de Investigación Científica del Centro Médico Nacional del IMSS. Los ratones se dividieron en dos grupos, uno denominado de "mantenimiento" del tumor y el otro "experimental".

a) GRUPO DE RATONES DE MANTENIMIENTO. Es el que se destina - permanentemente a conservar las células L5178Y, mediante el transplante sucesivo del tumor. Para asegurarse que el tumor no se pierda y siempre se desarrolle, se ha elegido inocular 80 millones de células neoplásicas por vía intraperitoneal a cada -

receptor. Estos mueren invariablemente diez días después. Así, es necesario efectuar el trasplante de portadores a receptores un poco antes de su muerte.

Este grupo, formado por 162 ratones, constituye a su vez uno de los grupos testigo del trabajo.

Alternativamente, las células del líquido de ascitis pueden emplearse con los fines experimentales que más adelante se describen.

b) GRUPO DE RATONES EXPERIMENTALES. Se formaron 7 grupos de ratones, mantenidos en iguales condiciones que las señaladas anteriormente. Estos fueron sometidos por grupos a los tratamientos que se detallan en la metodología.

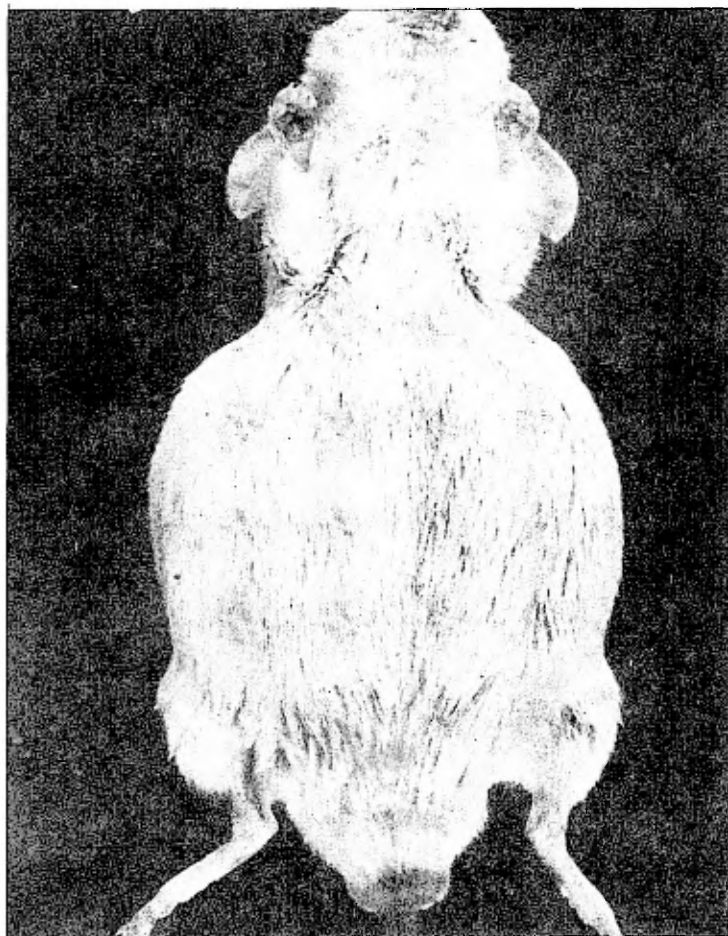
M E T O D O S

1. OBTENCION DE LEUCBLASTOS

Para la obtención de los leucoblastos malignos se espera a que los ratones transplantados con la neoplasia desarrollen líquido de ascitis, como se muestra en la fig. 3, esto ocurre habitualmente entre los 8 a 10 días después del inóculo tumoral -- previo.

Los ratones con tumor fueron sacrificados por descerebración y fijados en decúbito supino en una placa de corcho con alfileres. En esta posición, se desinfectó todo el abdomen del animal con alcohol de 96° y se practicó una incisión media longitudinal del hipogastrio al epigastrio comprendiendo solamente el grosor de la piel. Esta fué despegada de uno de los lados - de la incisión de los planos musculares subyacentes hasta el flanco del abdomen. El colgajo de piel fué sostenido en alto - con una erina, para formar una cavidad en ángulo diedro en el flanco del animal. En esta región se perforó la pared musculoperitoneal del abdomen y el líquido de ascitis que salía por el orificio fué colectado por aspiración con jeringa. En este - procedimiento todas las maniobras e instrumental empleado fueron asépticos. Las suspensiones celulares obtenidas de cada ratón fueron examinadas macroscópicamente, desechándose aquéllas que ocasionalmente se mostraban hemorrágicas. Los líquidos fueron

FIGURA 3



RATÓN CON TUMOR L5178Y INTRAPERITONEAL

depositados en recipientes esterilizados, midiéndose el volúmen obtenido. Una alícuota de esta suspensión celular fué diluída 1:50 y contada en una cámara cuentaglóbulos tipo Speirs-Levy para eosinófilos en microscopio invertido de contraste de fases UPI de Zeiss a 125 X. En función de esta cuenta, se calculó el volúmen de la suspensión celular original en la cual - estuviesen contenidas 5×10^7 células neoplásicas.

Alternativamente, las células del líquido de ascitis se emplearon con los fines experimentales que más adelante se describen

2. TRANSPLANTE TUMORAL

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de edades comprendidas entre 4 a 6 meses de edad. El abdomen de estos ratones fué desinfectado con alcohol de 96°C y con jeringa de insulina se les inyectó por vía intraperitoneal el volúmen de líquido de ascitis en el cual estuviesen suspendidas 5×10^7 células neoplásicas. El número de ratones empleados para cada paso varió de 5 a 7. A este grupo se le denominó en el presente como de mantenimiento de la neoplasia. Este grupo de ratones constituyeron la fuente de obtención de las células malignas para todo el estudio.

3. TRATAMIENTO DE LAS CELULAS MALIGNAS CON NEURAMINIDASA

Una suspensión de células neoplásicas fué lavada tres veces en 60 volúmenes de medio de cultivo Mc Coys 5a y finalmente estandarizadas a contener 4×10^6 células por ml. Esta suspensión se ajustó a pH de 6.5 con burbujeo de CO_2 y se le agregó 20 Unidades por ml de neuraminidasa de Vibrio cholerae durante 30 min a $37^\circ C$ con agitación continua en un disco giratorio a 10 r.p.m. Enseguida las células fueron lavadas 3 veces en 60 volúmenes de medio de cultivo fresco a temperatura ambiente y a continuación fueron sometidas a 20 ciclos de congelación y descongelación con el objeto de producir la muerte celular y evitar la regeneración del ácido N-acetil-neuramínico (NANA) de su membrana. Las células así tratadas fueron congeladas a $-70^\circ C$ hasta el momento de su uso.

4. PROCEDIMIENTOS DE INMUNIZACION

Los antígenos empleados para el procedimiento de inmunización por las vías subcutánea e intraperitoneal fueron las células tratadas con neuraminidasa, como se describió anteriormente y el líquido de ascitis sobrenadante de la centrifugación de la suspensión celular obtenida de la cavidad peritoneal de los ratones con tumor. Como testigos de las células tratadas con neuraminidasa, se emplearon las células tumorales congeladas y descongeladas igual número de veces, pero no tratadas con neu-

raminidasa. Otro grupo de testigos fueron inyectados con el mismo volumen de adyuvante completo de Freund en emulsión con medio de cultivo Mc Coys 5a sin células, por las mismas vías que el grupo experimental. Las dosis de antígeno inmunizante fueron 4×10^6 células neoplásicas suspendidas en 0.1 ml de medio de cultivo Mc Coys 5a y emulsionadas en igual volumen de adyuvante completo de Freund. El líquido sobrenadante se empleó en volúmenes de 0.1 ml emulsionado con igual cantidad del adyuvante. Estos antígenos se aplicaron en 4 dosis sucesivas con intervalos de una semana cada uno. Ocho días después de terminado el proceso de inmunización, los animales fueron sometidos a prueba de su estado inmune contra la neoplasia, mediante la aplicación de células malignas intactas por vía intraperitoneal la cual se describe más adelante como "reto".

5. RETO

Los ratones inmunizados, así como los testigos mencionados, fueron inyectados con 8×10^7 células por vía intraperitoneal. En el caso de no desarrollar neoplasia, los sobrevivientes fueron retados nuevamente dos meses después del primero con las mismas dosis de células por la misma vía.

6. OBTENCIÓN DE LINFOCITOS ESPLÉNICOS

Se obtuvieron de ratones: a) Normales, b) Inmunizados ya sea según el procedimiento citado en el No. 3 o sobrevivientes al -- primero y segundo reto, c) Portadores de la neoplasia intraperitoneal y pertenecientes al grupo denominado de mantenimiento, d) Portadores de la neoplasia subcutáneamente. Los ratones fueron sacrificados por descerebración y fijados en decúbito dorsal a una placa de corcho. Se desinfectó el abdomen con etanol de 96^o y con maniobras asépticas se hizo una incisión media longitudinal, a través de la cual se expuso y disecó el bazo. Este fué resecaado y colocado en una caja de Petri esterilizada conteniendo 2 ml de medio de cultivo Mc Coys 5a en dónde fué cortado en pequeños fragmentos. Estos fueron transferidos a un homogenizador de vidrio esmerilado, en el cual se disociaron las células esplénicas bajo presión manual suave. Del material así obtenido, se separaron los linfocitos por el método de Böyum⁴³. Este consiste en preparar una mezcla de Ficoll-Hypaque esterilizada, de densidad 1.076 constituida por 24 partes de una solución de Ficoll (Pharmacia) de peso molecular 400 000 al 9 %, más 10 partes de una solución de Hypaque (Winthrop) al 33.9 %. En un tubo de ensaye esterilizado y con tapa hermética, se depositan 3 ml de la mezcla anterior y sobre ella se coloca gota a gota, con pipeta Pasteur, la suspensión celular obtenida del bazo, teniendo cuidado de conservar la interfase entre ambos líquidos. Estos tubos se centrifugan a 1000 G por 20 min al cabo de los cuales todas las células esplénicas se depositan en el fondo del tubo, excepto los linfocitos que permanecen sobrenadando al nivel de la interfase entre la mezcla de --- Ficoll-Hypaque y el medio de cultivo sobrenadante. De ahí, son recuperados con aspiración con pipeta Pasteur y lavados tres veces en medio de cultivo. La suspensión celular obtenida contiene entre 95-98 % de linfocitos y el resto eritrocitos. El rendimiento obtenido es alrededor de 25×10^6 linfocitos por ca-

de bazo de ratón. Esta cantidad fué utilizada ya sea para la -
transferencia pasiva de la inmunidad celular a otros ratones,
o bien para la observación del efecto citotóxico directo con--
tra las células malignas in vitro.

7. TRANSFERENCIA PASIVA DE INMUNIDAD CELULAR

Los linfocitos obtenidos de cada bazo, fueron finalmente sus--
pendidos en 0.5 ml de medio de cultivo Mc Coys 5a e inyectados
por vía intraperitoneal a receptores normales. Diéz días des--
pués, estos ratones fueron probados mediante el reto de aplica--
ción de 8×10^7 células malignas por vía intraperitoneal.

8. PRUEBA DE MICROBITOXICIDAD

Se empleó la técnica de Terasaki ⁴⁴. Se prepararon charoles pa--
ra micropruebas de Falcon No. de catálogo 3034, las cuales con--
tienen 60 excavaciones en 10 hileras con 6 pozos cada una. Las
excavaciones fueron cubiertas con 5 mcl de aceite mineral USP
(Nujol), para evitar la evaporación de los reactivos aplicados
subsecuentemente. En cada una de estas excavaciones se colocó
1 mcl de sueros de ratones inmunizados o testigos, obtenidos -
por punción del plexo retroorbitario. Se preparó una suspensión
de células neoplásicas lavadas tres veces en 60 volúmenes de -

medio de cultivo y estandarizadas a contener 2×10^6 células por ml. De esta suspensión celular se agregó 1 ml en cada pozo de prueba y se incubó la mezcla de células neoplásicas y sueros de los ratones inmunes o testigos normales a 37°C durante 30 min al cabo de los cuales se adicionaron para cada prueba 5 ml ya sea de suero de ratón normal o inmunizado o bien suero de cobayo o de conejo como fuente de complemento y se incubaron por 60 min más a la misma temperatura. Cada prueba se realizó por sextuplicado. Enseguida las células se tñieron durante 2 min con 2 ml de solución de eosina al 5 % en agua y se fijaron con una solución de formol al 30 % a pH de 7. Todas las excavaciones de la charola se cubrieron con un portaobjetos de vidrio de 70x50 mm y se observaron en un microscopio invertido de contraste de fases UPI de Zeiss.

9. OBSERVACION DEL EFECTO CITOTOXICO DIRECTO DE LOS LINFOCITOS CONTRA LAS CELULAS MALIGNAS

Se prepararon en tubos de ensaye esterilizados, mezclas celulares conteniendo linfocitos esplénicos inmunizados más células malignas en proporción de 20:1 en medio de cultivo. Dos mililitros de esta suspensión se colocaron en botellas T para cultivo de tejidos de 5x7x1 cm de caras planas. En estas condiciones se procuró que las células quedaran cercanas entre sí; pero sin haber confluencia o formación de grumos. Se incubaron a 37°C durante 48 hrs, extrayéndose de la estufa a intervalos de 6, 18, 24, 36 y 48 hrs para su observación en el microscopio invertido de contraste de fases. De estos cultivos se tomaron --

con técnica estéril, alícuotas de 0.05 ml, las cuales fueron teñidas con solución de eosina acuosa al 5 % en agua y fijadas con formol para estimación de viabilidad.

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

10. CARIOTIPO DE CELULAS NORMALES

Se sacrificaron por descerebración 5 ratones normales de las cepas DBA/2 y BALB/c. De estos se obtuvieron varios fémures, los cuales fueron partidos longitudinalmente con hojas de bisturí para exponer el tejido hematopoyético contenido en el canal medular. Se desprendió la médula ósea con la punta de una aguja hipodérmica del número 22 y se suspendió en 0.5 ml de medio de cultivo 199 con suero fetal de ternera conteniendo 200 mcg por ml de Colcemid (Sandoz). Esta suspensión celular fué incubada a 37°C durante 2 hrs con agitación ocasional. A continuación las células fueron sometidas a tratamiento hipotónico resuspendiéndolas en 5 ml de KCl 0.075 M durante 20 min a 37°C. Las células se centrifugan a 250 G durante 5 min y el botón celular se resuspendió para la fijación de las células en 0.5 ml de solución de Carnoy durante 5 min, lo cual se repitió 3 veces. Para obtener los frotis, se prepararon portaobjetos enfriados a -70°C por inmersión en etanol de 96° conteniendo trozos de hielo seco. El exceso de alcohol se escurrió de los portaobjetos

e inmediatamente se hizo gotear sobre ellos desde 50 cm de altura, la suspensión de células fijadas con Carnoy. Se dejaron secar las preparaciones y se tiñieron con una solución 1:50 de colorante de Giemsa en amortiguador de fosfatos 0.06 M y pH de 6.8 (Sol. A: KH_2PO_4 , anhidro 8.1 g/l; Sol. B: Na_2HPO_4 , anhidro - 8.5 g/l. Se adiciona 30.4 ml de la solución A a 29.5 ml de la solución B), durante 15 min. Las preparaciones se enjuagaron con xilol y se montaron cubriéndolas con resina y cubreobjetos.

Estas preparaciones fueron observadas en microscopio Zeiss a 1250 X. Se hicieron lecturas de 50 figuras mitóticas, seleccionadas entre aquéllas que mostraron los cromosomas mejor separados entre sí y se contó el número de cromosomas de cada uno de ellos con el objeto de obtener el número modal de las células. Algunas figuras mitóticas más representativas fueron fotografiadas en fotomicroscopio Reichert para nuevo conteo del número de cromosomas y ordenamiento de estos en el cariograma.

11. CARIOTIPO DE LAS CELULAS MALIGNAS

Se obtuvieron 20 millones de células malignas L5178Y de portadores BALB/c, las cuales se trataron de la misma forma que las células normales.

12. BANDEO DE LOS CROMOSOMAS DEL RATON DBA/2 Y DE LAS CELULAS L5178Y

Los cromosomas se identificaron individualmente por el uso de la técnica de bandeado con tripsina-Giemsa ⁴⁵.

Las laminillas con los cariotipos se trataron con "tripsina - 1:250" en una solución de 5 mg en 100 ml de solución salina - isotónica ajustando el pH a 7.8 con solución 0.2 M de tris - (hidroxi-metil-amino-metano), a 37°C durante 30 a 50 seg. Inmediatamente se sumergieron en EDTA 0.02 M durante 3 min, se lavaron en amortiguador de fosfatos 0.06 M, pH 6.8, durante 1 min. La tinción se realizó con Giemsa al 2 % en amortiguador de fosfatos pH 6.8 durante 8 a 10 min y se lavaron nuevamente con agua corriente, se secaron al aire, se sumergieron en xilol 2 min y finalmente se cubrieron con resina sintética y cubreobjetos.

La observación y recuento de los cromosomas bandeados se realizó de la misma forma que los cariotipos ⁴⁶.

13. ELECTROFORESIS

Se prepararon placas de agarosa para electroforesis sobre portaobjetos de 70x25 mm sobre los cuales se depositó una solución de agarosa al 0.85 % más 0.01 de azida de sodio disuelto en amortiguador de barbiturato de sodio 0.05 M a pH de 8.6 (Barbiturato de sodio 10.3 g; ácido barbitúrico 1.34 g; H₂O c.b.p. 1000 ml), las cuales se dejaron solidificar a la temperatura ambiente. En ellas se practicó una hendidura transversal de 1 cm, en la cual se depositaron 10 µl de suero ya sea de ratón normal, inmuniza

do, portador de la neoplasia, o sobrenadante del líquido de ascitis tumoral. Se aplicó un voltaje de 200 V (3 mA por cada placa) durante 45 min. Enseguida las placas fueron secadas a temperatura ambiente cubriéndolas con papel filtro. Se fijaron y tiñieron en la solución de colorante de Fonceau y luego fueron decoloradas en ácido acético al 5 % en agua.

Las glucoproteínas fueron teñidas con reactivo de Shiff y decoloradas en ácido sulfuroso ⁴⁷.

14. HISTOLOGIA

Se tomaron muestras de los tejidos que mostraron infiltración tumoral y se fijaron en formol al 10 % durante 48 hrs los cuales fueron incluidos en parafina, cortados y teñidos por las técnicas de hematoxilina y eosina.

RESULTADOS

1. SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE CON CELULAS L5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA Y RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR LA MISMA VIA. (Tabla 1)

Se partió de un número original de catorce ratones, de los cuales uno murió con el tumor intraperitoneal una semana después del reto y trece de ellos no desarrollaron el tumor.

Los testigos de este experimento fueron siete ratones inoculados intraperitonealmente con células L5178Y que no fueron tratadas con neuraminidasa y solamente fueron congeladas y descongeladas el mismo número de veces que el grupo experimental anterior. Todos ellos desarrollaron el tumor después de la inoculación intraperitoneal de reto de las células neoplásicas.

Otro testigo de este experimento fué un grupo de 5 ratones a los cuales solo se les inyectó intraperitonealmente el mismo volumen del vehículo en que se inyectaban las células neoplásicas inmunizantes (adyuvante completo de Freud 0.1 ml más medio de cultivo 0.1 ml en emulsión aceite/agua). Todos ellos fueron susceptibles al tumor al ser tratados con las células malignas

Como puede verse, por medio de la inmunización intraperitoneal con células neoplásicas tratadas con neuraminidasa, pudo obtenerse un 92.8 % de protección (fig. 4). Los ratones sobrevivi --

T A B L A 1

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

Grupos	No. de Inmunizados	Resistentes al Tumor (◆)	Susceptibles al Tumor (◆◆)	% de resistentes al Tumor
Ratones Experimentales	14	13	1	92.8
Ratones Testigo (◆◆◆)	7	0	7	0

◆) Sobrevida de más de tres meses libres de tumor después del reto.

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

◆◆◆) Este grupo fue inmunizado con células L5178Y congeladas y descongeladas 20 veces, no tratadas con neuraminidasa.

vientes inmunes de este grupo permanecieron sanos y libres de tumor hasta los 90 días después del reto. En el estudio post mortem de ellos, no se encontraron lesiones tumorales.

2. SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS SUBCUTANEAMENTE CON CELULAS L5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA Y RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL
(Tabla 2).

Se partió de un número original de 17 ratones de los cuales - seis (34,7 %) resistieron al reto con las células neoplásicas aplicadas por vía intraperitoneal y 11 se comportaron como - susceptibles a la neoplasia.

Los testigos de este grupo incluyeron siete ratones que fueron inmunizados con células congeladas y descongeladas 20 veces y que se aplicaron por vía subcutánea. De ellos, un ratón (14 %) resultó resistente al reto con células neoplásicas aplicadas - después por vía intraperitoneal.

Otro grupo testigo fué el formado por cinco ratones inyectados subcutáneamente con 0.2 ml de emulsión de adyuvante completo de Freud y medio de cultivo 1:1. Todos fueron susceptibles al tumor al ser retados con las células malignas.

La inmunización subcutánea con células L5178Y tratadas con neuraminidasa, sólo protegió al 34.7 % de los ratones (fig. 4).

T A B L A 2

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

Grupos	No. de Inmunizados	Resistentes al Tumor (*)	Susceptibles al Tumor (**)	% de resistentes al Tumor
Ratones Experimentales	17	6	11	34.7
Ratones Testigo (***)	7	1	6	14

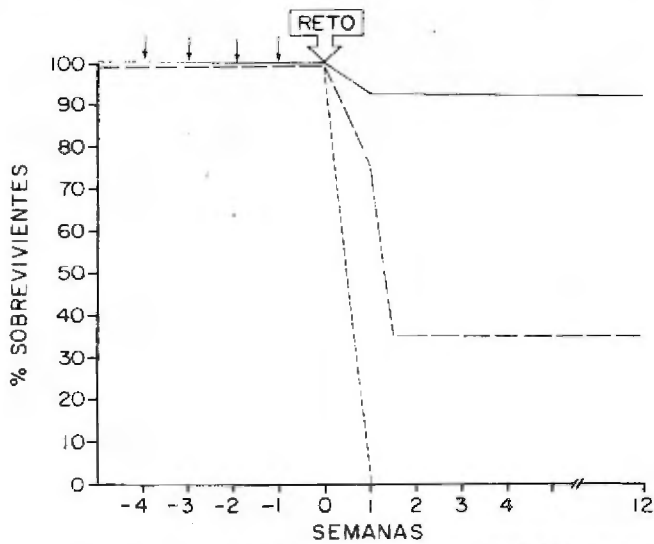
*) Sobrevida de más de tres meses libres de tumor después del reto.

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

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

FIGURA 4

SOBREVIVENCIA DE RATONES INMUNIZADOS POR VIA SUBCUTANEA E INTRAPERITONEAL CON CELULAS MALIGNAS L5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA



↓ INMUNIZACION CON CELULAS L5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA

VIA | ——— INTRAPERITONEAL
 - - - SUBCUTANEA
 TESTIGOS NO INMUNIZADOS

RETO: INOCULACION DE 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS, VIA INTRAPERITONEAL

3. SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE CON LIQUIDO SOBRENADANTE DEL TUMOR DE ASCITIS L5178Y Y RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR LA MISMA VIA (Tabla 3).

Se partió de un número original de trece ratones de los cuales seis resultaron resistentes al reto (46.1 %) neoplásico intraperitoneal.

Como testigos de este grupo, se emplearon cinco ratones, a los cuales se les inyectó intraperitonealmente 0.2 ml de una emulsión constituida de adyuvante completo de Freund y medio de -- cultivo 1:1. Todos ellos fueron susceptibles a el trasplante neoplásico intraperitoneal.

Así pues, la inmunización intraperitoneal con líquido sobrenadante del tumor ascítico L5178Y protegió al 46.1 % de los ratones inmunizados (fig.5). Estos no mostraron tumor en el estudio post-mortem a los 90 días.

4. SOBREVIDA DE LOS RATONES INMUNIZADOS SUBCUTANEAMENTE CON LIQUIDO SOBRENADANTE DEL TUMOR DE ASCITIS L5178Y Y RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL (Tabla 4).

Se partió de un número original de veinte ratones, de los cuales diez (50 %) resultaron resistentes al reto con células neoplásicas por vía intraperitoneal (fig. 5).

T A B L A 3

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE CON LIQUIDO SOBRENADANTE DEL TUMOR DE ASCITIS L5178Y Y RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR LA MISMA VIA.

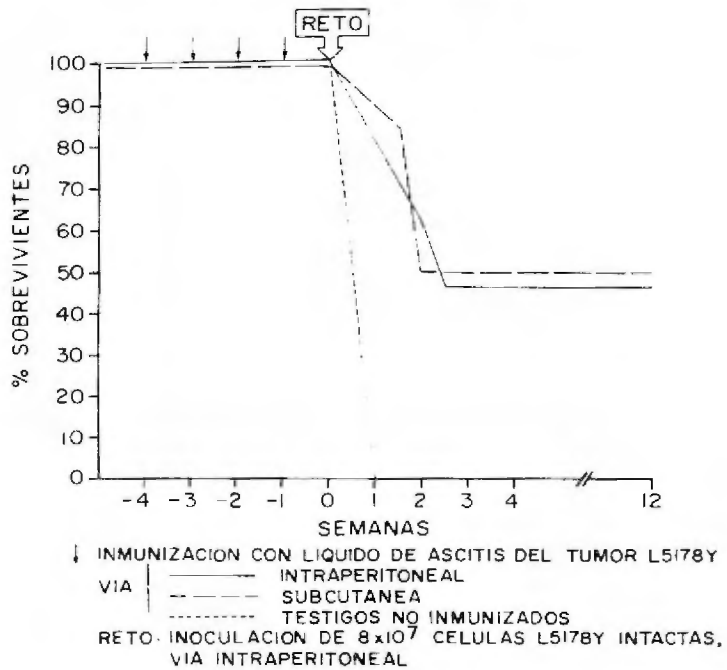
R A T O N E S			
No. de Inmunizados	Resistentes al Tumor (Φ)	Susceptibles al Tumor (ΦΦ)	% de resistentes
13	6	8	46.1

Φ) Sobrevida de más de tres meses libres de tumor después del reto.

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

FIGURA 5

SOBREVIVENCIA DE RATONES INMUNIZADOS POR VIA SUBCUTANEA E INTRAPERITONEAL CON LIQUIDO DE ASCITIS DEL TUMOR L5178Y



T A B L A 4

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS SUBCUTANEAMENTE CON LIQUIDO SOBRENADANTE DEL TUMOR DE ASCITIS L5178Y Y RETADOS DESPUES CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL.

R A T O N E S			
No. de Inmunizados	Resistentes al Tumor (☞)	Susceptibles al Tumor (☞☞)	% de resistentes
20	10	10	50

☞) Sobrevida de más de tres meses libres de tumor después del reto.

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

Los testigos de este grupo son similares a los del grupo anterior usando la vía subcutánea.

Así, la inmunización subcutánea con líquido sobrenadante sin células neoplásicas, protegió al 50 % de los ratones de este grupo, ninguno de los cuales presentó tumor en la autopsia a los tres meses.

5. SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS ADOPTIVAMENTE POR VIA INTRAPERITONEAL CON 25×10^6 LINFOCITOS ESPLÉNICOS DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE CON CELULAS L5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA Y RETADOS CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL (Tabla 5.)

Se partió de un número original de seis ratones, a los cuales se aplicaron intraperitonealmente los linfocitos esplénicos inmunes contra el tumor. Después de 10 días de la inyección intraperitoneal de los linfocitos, los seis ratones se mostraron resistentes (100 %) al tumor y sobrevivieron por más de tres meses libres de éste después del reto.

6. SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS ADOPTIVAMENTE POR VIA INTRAPERITONEAL CON 25×10^6 LINFOCITOS ESPLÉNICOS DE RATONES PORTADORES DEL TUMOR L5178Y SUBCUTANEO Y RETADOS CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL (Tabla 6).

Se partió de un número original de seis ratones todos los cuales sobrevivieron a la aplicación por vía intraperitoneal de -

T A B L A 5

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS **ADOPTIVAMENTE** POR VIA INTRAPERITONEAL CON 25×10^6 LINFÓCITOS ESPLÉNICOS DE RATONES INMUNIZADOS INTRAPERITONEALMENTE CON CELULAS L5178Y TRATADAS CON NEURAMINIDASA Y RETADOS CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL.

R A T O N E S			
No. de Inmunizados	Resistentes al Tumor (*)	Susceptibles al Tumor	% de resistentes
6	6	0	100

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

T A B L A 6

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS ADOPTIVAMENTE POR VIA INTRAPERITONEAL CON 25×10^6 LINFOCITOS ESPLÉNICOS DE RATONES PORTADORES DEL TUMOR L5178Y SUBCUTANEO Y RETADOS CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL.

R A T O N E S			
No. de Inmunizados	Resistentes al Tumor (*)	Susceptibles al Tumor	% de resistentes
6	6	0	100

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

los linfocitos singélicos inmunes contra el tumor. Después de 10 días de la aplicación de los linfocitos, los seis ratones se mostraron resistentes al reto con células neoplásicas (100%) al tumor y sobrevivieron libres de tumor según estudio post-mortem por más de tres meses.

7. SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS ADOPTIVAMENTE POR VIA INTRAPERITONEAL CON 25×10^6 LINFOCITOS ESPLENICOS DE RATONES DE MANTENIMIENTO DEL TUMOR L5178Y INTRAPERITONEAL Y RETADOS CON 8×10^7 CELULAS L5178Y INTACTAS POR VIA INTRAPERITONEAL (Tabla 7)

Se partió de un número original de catorce ratones todos los cuales subsistieron 10 días después de la inyección intraperitoneal de linfocitos. De ellos, dos (14.0%) resultaron resistentes al tumor, habiendo sobrevivido más de tres meses después del reto libres de tumor.

8. PRUEBA DE MICROKITOTOXICIDAD

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

T A B L A 7

SOBREVIDA DE RATONES INMUNIZADOS **ADOPTIVAMENTE** POR VIA INTRAPERITONEAL CON 25×10^6 LINFOCITOS ESPLENICOS DE RATONES DE MANTENIMIENTO DEL TUMOR L5178Y Y RETADOS CON 8×10^7 CELULAS L5178Y POR VIA INTRAPERITONEAL.

R A T O N E S			
No. de Inmunizados	Resistentes al Tumor (*)	Susceptibles al Tumor (**)	% de resistentes
14	2	12	14

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

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

9. CITOTOXICIDAD LINFOCITARIA

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

Los testigos en los cuales se agregaron linfocitos de ratones no inmunizados, no mostraron estos cambios en ese mismo tiempo de observación.

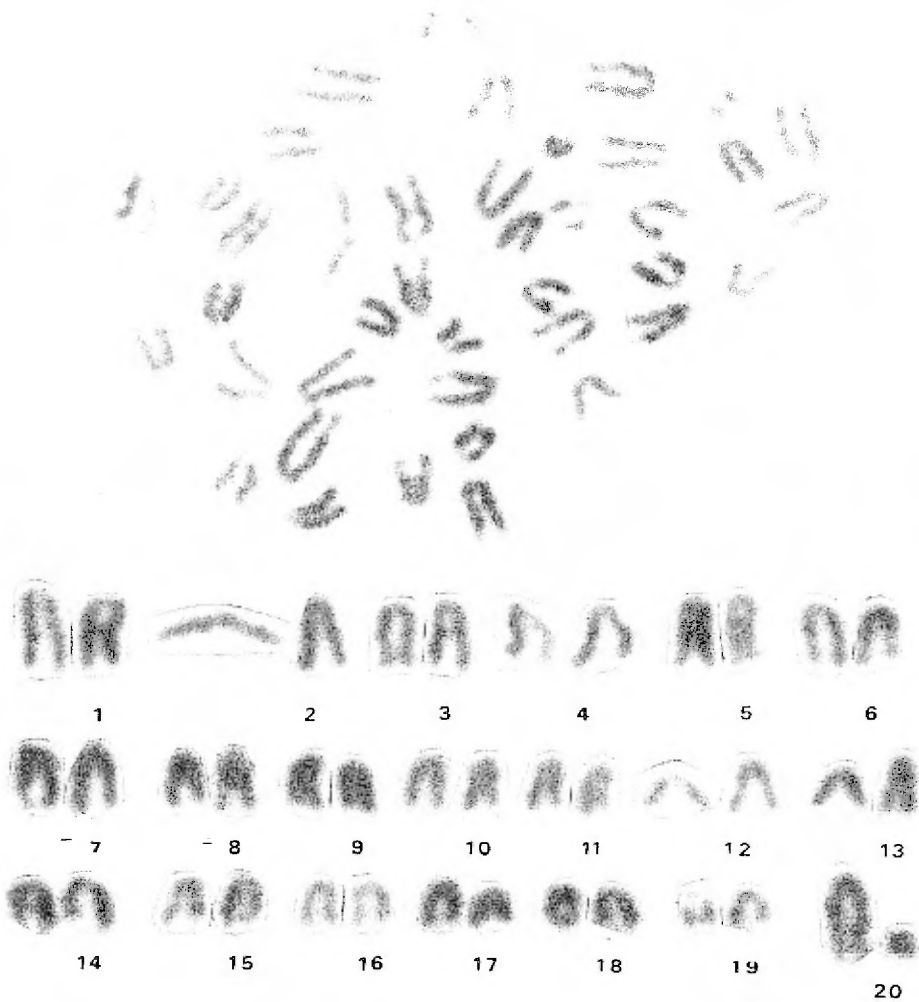
10. CARIOTIPO DEL RATÓN DBA/2

Se observaron 50 figuras mitóticas, habiéndose encontrado que el número cromosómico de esta cepa de nuestro laboratorio fué de 40 cromosomas, todos ellos acrocéntricos (fig. 6).

11. CARIOTIPO DEL RATÓN BALB/c

Se observaron 50 figuras mitóticas, las cuales mostraron un número modal de 40 cromosomas, todos ellos acrocéntricos (fig.7)

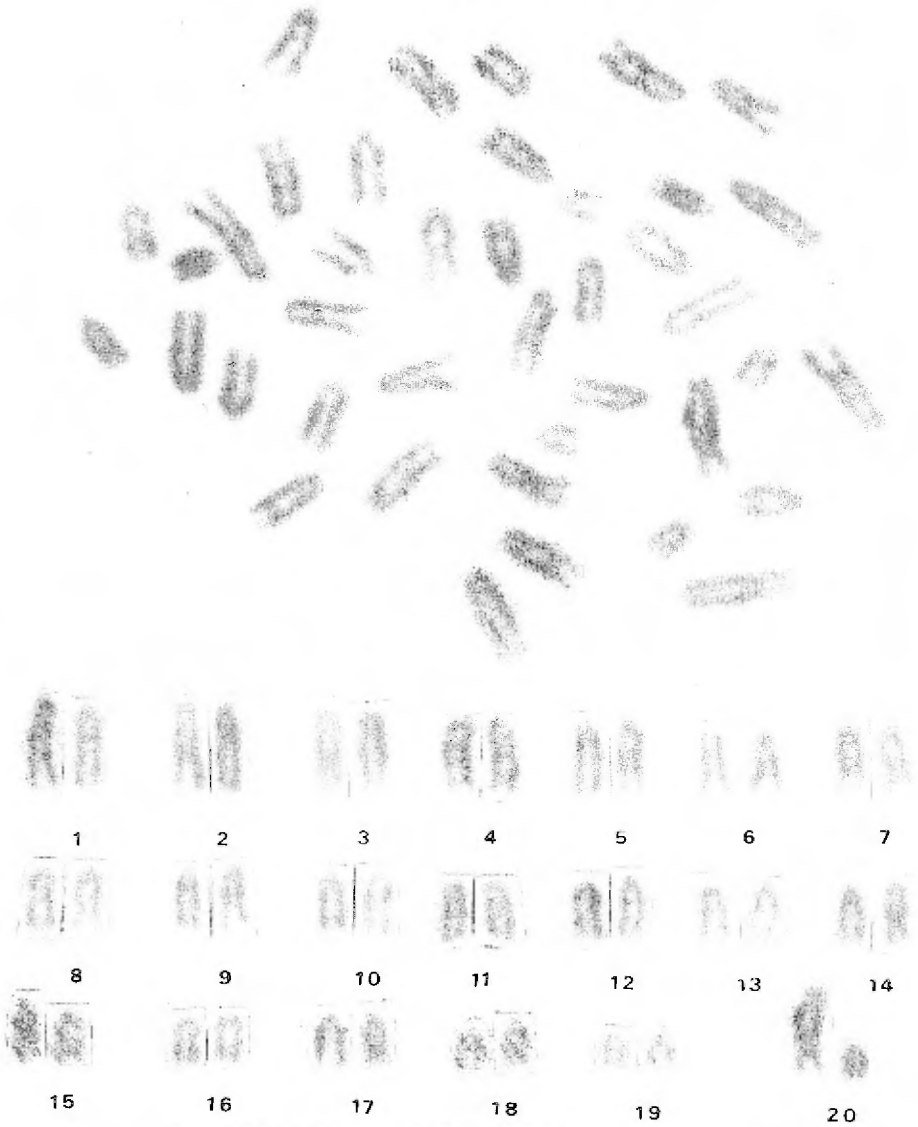
FIGURA 6



CARIOGRAMA DE LINFOCITOS DE RATÓN OBA/2

CUARENTA CROMOSOMAS ACROCENTRICOS

FIGURA 7



CARIOGRAMA DE LINFOCITOS DE RATÓN BALB/C
CUARENTA CROMOSOMAS ACROCENTRICOS

12. CARIOTIPO DEL TUMOR L5178Y

Se observaron 50 figuras mitóticas, habiéndose encontrado que el número cromosómico de estas células variaba de 37 a 39 cromosomas con un número modal de 38. Dentro de estos cromosomas se destacó la presencia de un cromosoma submetacéntrico en todas las figuras mitóticas observadas, salvo en dos de ellas -- que tenían dos cromosomas submetacéntricos (fig. 8)

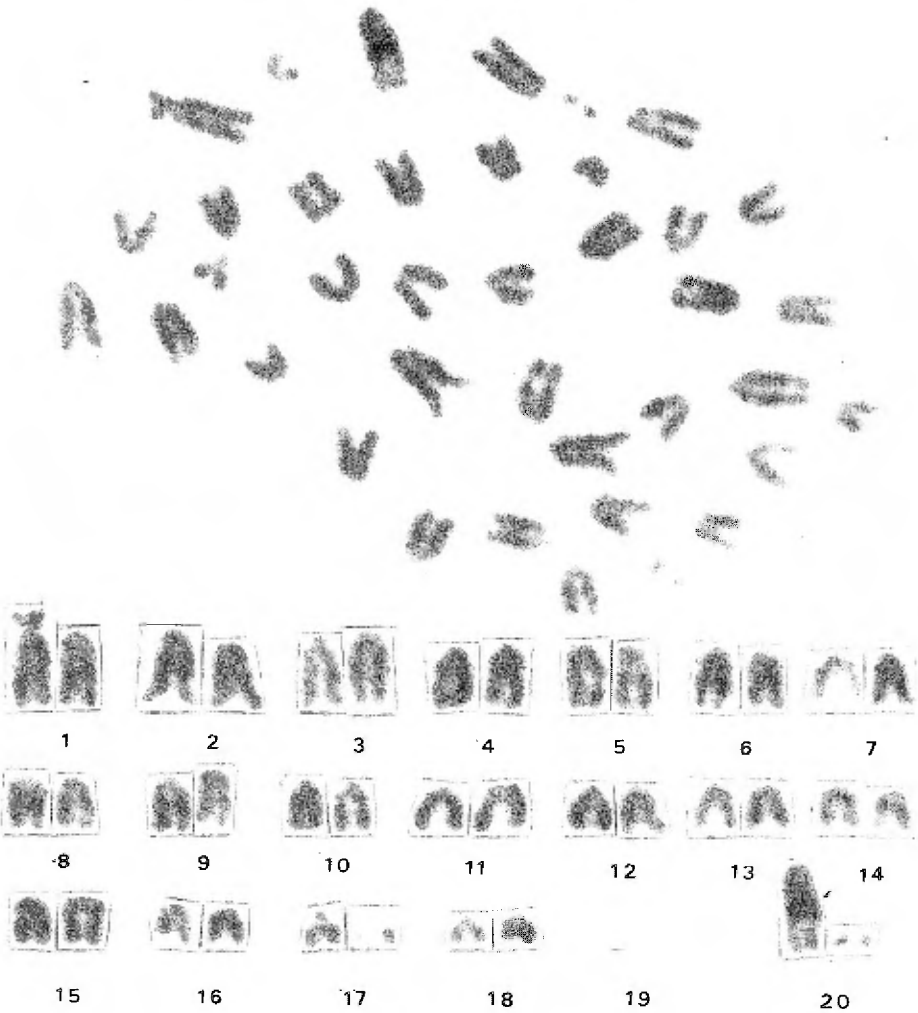
13. BANDEO DE LOS CROMOSOMAS TUMORALES Y NORMALES

Por la técnica del bandeo cromosómico anteriormente descrita, se puede llegar a la conclusión que el cromosoma submetacéntrico característico de las células L5178Y, se derivó de la fusión por el centrómero de dos cromosomas acrocéntricos correspondientes a los pares 1 y 19 del cariotipo del ratón DBA/2 (figs. 9, 10, 11 y 12)

14. ELECTROFORESIS

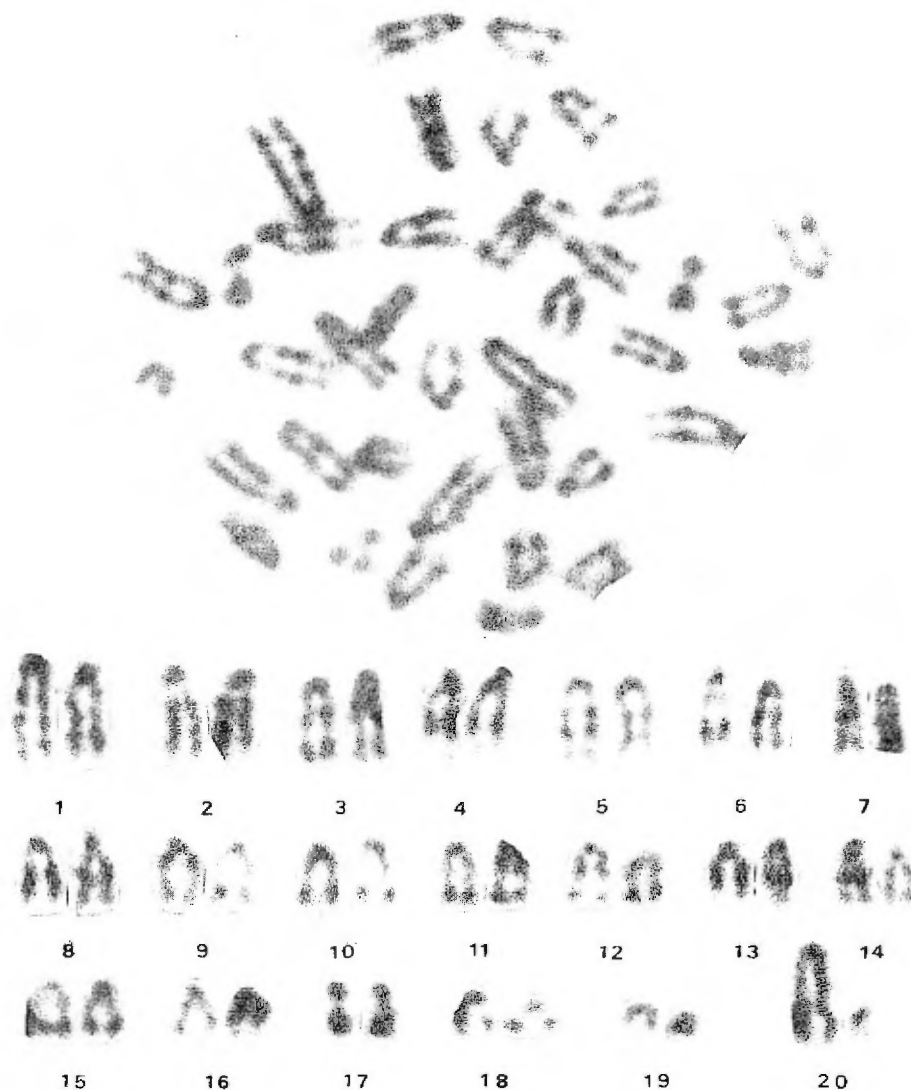
Por la técnica de electroforesis, no fué posible detectar la presencia de ninguna proteína anormal en el suero de ratones de mantenimiento ni en el líquido de ascitis sobrenadante de las células neoplásicas.

FIGURA 8



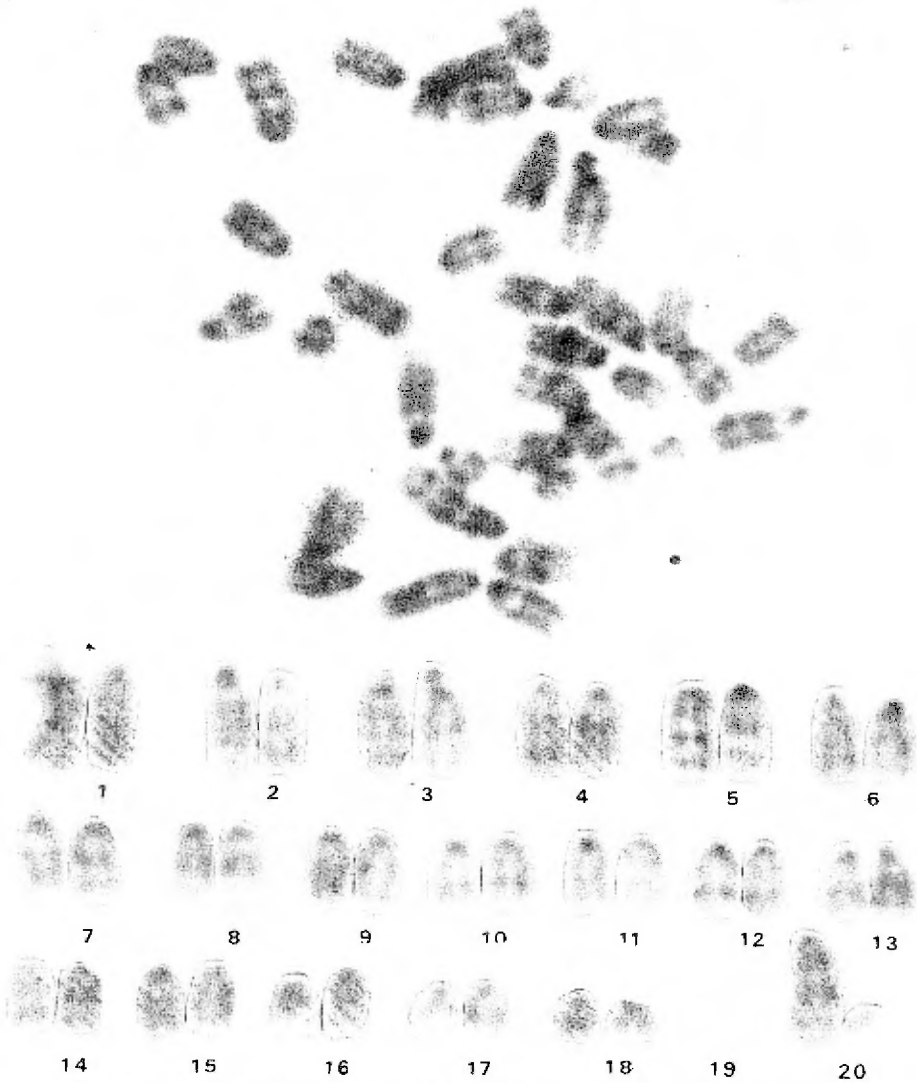
CARIOGRAMA DE CELULAS L5178 Y
 TREINTA Y OCHO CROMOSOMAS ACROCENTRICOS
 UNO DE ELLOS SUBMETACENTRICO*

FIGURA 9



BANDEO COMOSOMICO DE LINFOCITOS DE RATON DBA'2
CUARENTA CROMOSOMAS ACROCENTRICOS

FIGURA 10



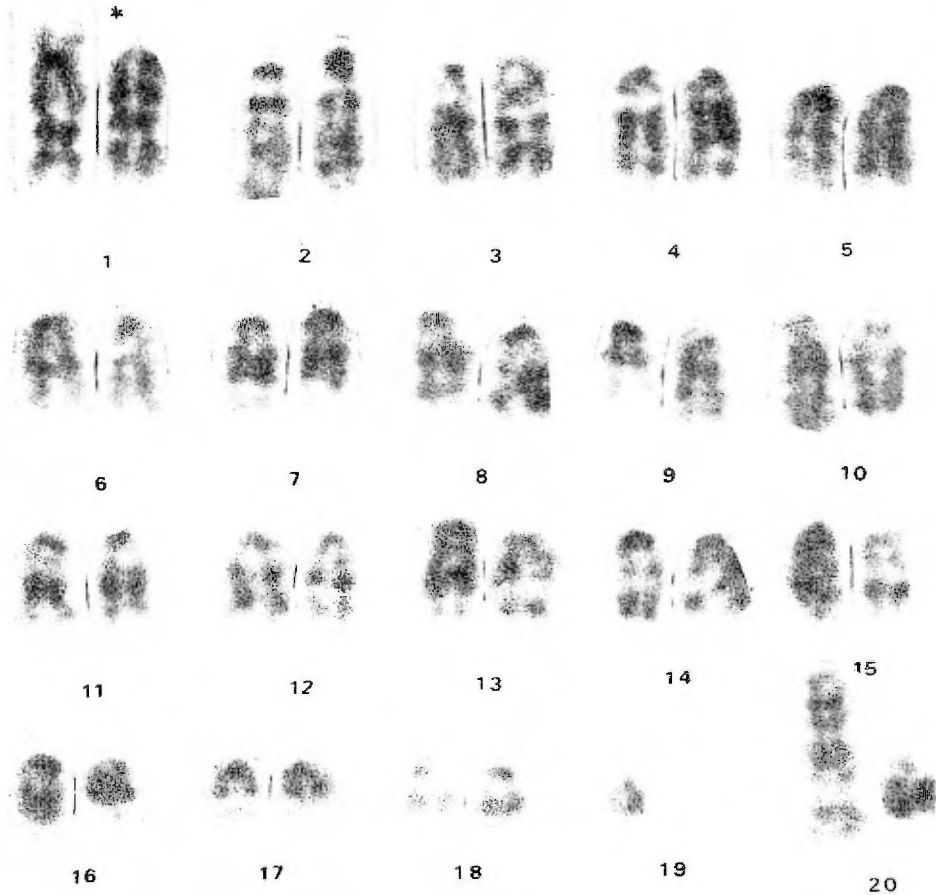
BANDEO CROMOSOMICO DE LAS CELULAS L5178 Y
TREINTA Y OCHO CROMOSOMAS ACROCENTRICOS UNO DE ELLOS SUBMETACENTRICO

FIGURA 11.



BANDEO CROMOSOMICO DE LAS CELULAS L5178Y. TREINTA Y OCHO CROMOSOMAS ACROCENTRICOS CON DOS SUBMETACENTRICOS. **
RESULTADO DE LA FUSION CENTRICA DE LOS CROMOSOMAS DE LOS PARES 1 Y 19.

FIGURA 12



BANDEO CROMOSOMICO DE LAS CELULAS L5178Y. TREINTA Y NUEVE CROMOSOMAS ACROCENTRICOS CON UNO SUBMETACENTRICO.* RESULTADO DE LA FUSION CENTRICA DE DOS CROMOSOMAS DE LOS PARES 1 Y 19.

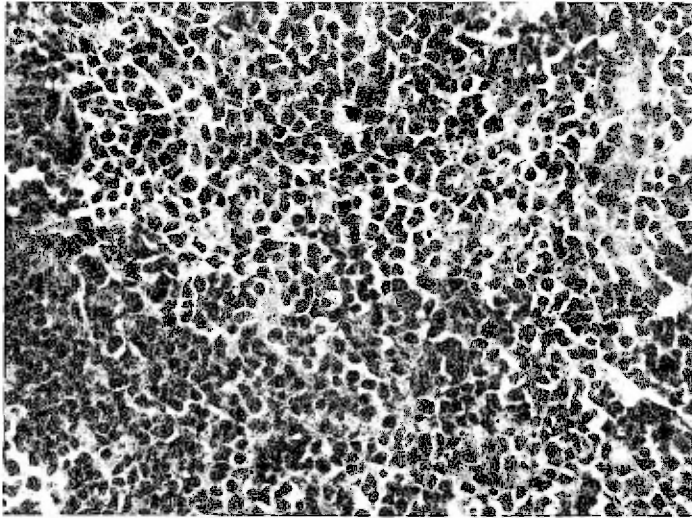
15. HISTOLOGIA

El estudio histológico de los cortes de hígado, bazo, epiplón y tejido celular subcutáneo, los cuales en algunos casos llegaba a invadir el tumor L5178Y, mostró ser un linfoma constituido por células linfocíticas blásticas homogéneas, las que se muestran en la microfotografía No. 13 y 14

La infiltración del tumor a el hígado pudo observarse macroscópicamente e histológicamente en un 10 % de los ratones de mantenimiento. Este tipo de tumor puede considerarse que queda circunscrito a la cavidad abdominal en los ratones de mantenimiento.

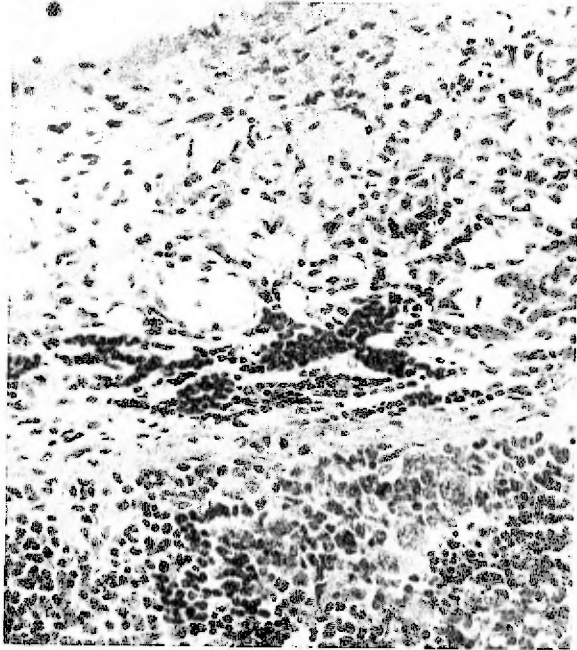
Los ratones inmunizados activamente y pasivamente no presentaron invasión de los órganos abdominales en los estudios post-mortem e histológicos.

FIGURA 13



INVASION HEPATICA POR EL TUMOR L5178Y. HEMATOXILINA
Y EOSINA. 150 X

FIGURA 14



TUMOR L5178Y INOCULADO SUBCUTANEAMENTE.
HEMATOXILINA Y EOSINA 125 X

DISCUSION

Cuando una clona de células malignas se establece en el organismo o cuando un tumor canceroso se ha desarrollado por algún tiempo in vivo, los mecanismos de vigilancia inmunológica e inmunidad concomitante del portador de la neoplasia, son incapaces de llevar a cabo una reacción de rechazo hacia el tumor ⁷, 10, 12, 13, 48-50.

Los linfocitos son capaces de reconocer a las células neoplásicas y considerarlas extrañas en virtud de ser portadoras de -- ANE. Pueden interactuar con ellas y unirse a través de sus sitios de reconocimiento antigénico. Los linfocitos desarrollan entonces un fenómeno denominado peripolexis que consiste en la migración del linfocito sobre la superficie de la célula maligna alternando con períodos de inmovilidad y contacto de las membranas de ambas células. Después de esto, las células malignas presentan lesiones en sus membranas que producen un efecto citocídico o citotóxico, con muerte de la célula neoplásica -- subsecuente al contacto directo con el linfocito ⁵¹⁻⁶¹. Al --- parecer, los mediadores químicos productores de la lesión de membrana son la liberación in situ de los componentes activos C'8 y C'9 del sistema del complemento por el linfocito ⁶⁰.

Sin embargo, la respuesta inmune puede ser inhibida de las siguientes maneras: El organismo produce anticuerpos de facilitación contra la neoplasia, los cuales pueden actuar protegiendo a la célula maligna de tres maneras diferentes ⁶²: a) Se combi

nan con los ANE a los cuales cubren y de esta manera evitan el reconocimiento y contacto directo de los linfocitos con las células neoplásicas, b) Dichos anticuerpos, por carecer de capacidad para activar el sistema del complemento autólogo, no dan lugar a un efecto citotóxico contra la célula neoplásica, y -- c) Pueden competir con los anticuerpos fijadores de complemento y de esta manera contribuyen a impedir la reacción de rechazo hacia la neoplasia ^{29,30,63}.

Adicionalmente, las células tumorales liberan a los líquidos extracelulares ANE ^{20,64-66} que bloquean a distancia el efecto citocídico de los linfocitos contra las células cancerosas ⁶⁵. Dichos ANE al pasar a los espacios extracelulares llegan a ocupar los sitios de reconocimiento antigénico de los linfocitos y los sitios de combinación de los anticuerpos circulante ⁶⁵. De esta manera resultan inactivadas a distancia tanto la respuesta inmune celular como la humoral que despierta el tumor.

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

Los ANE son glucoproteínas cuyos determinantes antigénicos pueden inducir en el organismo una respuesta inmune del tipo de -- facilitación inmunológica mediada por anticuerpos ³¹. Cuando -- la respuesta inmune del organismo hacia los ANE es de rechazo, ésta está mediada principalmente por fenómenos de inmunidad celular o más raramente por producción de anticuerpos fijadores de complemento ⁴⁸⁻⁵⁰.

Las glucoproteínas, como las que constituyen los ANE, son habi

tualmente proteínas de alta solubilidad, muy electronegativas y resistentes a la degradación enzimática ^{70,67,68}. Estas características contribuyen a su mayor solubilidad y desprendimiento de la superficie de las células neoplásicas y a explicar su comportamiento inhibitorio a distancia sobre los mecanismos inmunológicos de rechazo ^{62,65}.

Como puede verse aparentemente existe una serie de factores combinados, cuyo resultado da lugar a la permanencia de los tumores dentro del organismo. Tratando de explicar esta situación paradójica y adversa a la supervivencia del portador de la neoplasia, cabe mencionar que en la naturaleza opera un mecanismo semejante que hace posible la permanencia de los tejidos embrionarios y fetales durante el embarazo ²⁶. Tomando en cuenta que asociada a la transformación maligna de las células, ocurre una regresión hacia el estado embrionario o fetal ²², puede decirse que la persistencia de las células cancerosas en el organismo se debe a que éstas son toleradas de manera semejante a los productos del embarazo ^{62,69}.

Frente a esta situación, es aparentemente difícil encontrar procedimientos inmunoterápicos y preventivos contra el cáncer.

Entre los objetivos de la inmunoterapia oncológica podrían mencionarse los siguientes ⁷⁰: a) Disminuir la síntesis de los anticuerpos de facilitación, o) Reducir el efecto bloqueador de los ANE circulantes sobre las células efectoras de la inmunidad celular contra las células malignas, c) Disminuir el bloqueo que los ANE circulantes pueden ejercer sobre los anticuerpos de rechazo o d) Aumentar la capacidad de fijación de complemento de los anticuerpos de facilitación.

El primer punto sería posible lograrlo únicamente mediante procedimientos adecuados de inmunización activa del portador de la neoplasia contra las células malignas ⁷⁰. Esto conduciría posiblemente a que se obtuviera un incremento de la respuesta inmune celular contra la neoplasia.

La inmunización activa con células malignas previamente modificadas en sus ANE por tratamiento con neuraminidasa ha conducido al rechazo del tumor en algunos casos ³⁶⁻⁴¹; pero el papel de los mecanismos inmunológicos, celulares y humorales, han sido poco estudiados ^{36,41,43}.

En el presente trabajo se informa acerca de la inducción de inmunidad celular contra las células del linfoma L5178Y de los ratones, cuando a los mismos se les inmuniza con células del tumor tratadas con neuraminidasa.

A continuación se analizan los resultados en este sentido, obtenidos en los diferentes grupos experimentales de este trabajo.

1. RATONES INMUNIZADOS CON CELULAS TRATADAS CON NEURAMINIDASA

Se sabe que las células L5178Y pierden el 65 % de su contenido total de NANA (3.3×10^8 moléculas) y el 90 % del de la superficie celular (2.16×10^8 moléculas) al tratarse con neuraminidasa de Vibrio cholerae ^{71,72}.

La inmunización con éstas células tratadas con neuraminidasa produjo un 92.8 % de protección contra el reto intraperitoneal con células malignas intactas. De no haber sido inmunizados, el 100 % de los ratones desarrollan el tumor, muriendo en un período

do no mayor de 10 días. Así, una sobrevivida del 92.8 % en los ratones inmunizados pueda considerarse altamente favorable.

Entre las razones por las cuales no se logró una protección del 100 % de los ratones que se pretendió inmunizar, podemos mencionar el hecho de que las células L5178Y son altamente resistentes al traumatismo físico que supone la cristalización del agua intracelular durante los repetidos ciclos de congelación y descongelación. Así, de 20 ciclos aún era posible observar de 1 a 5 % de células viables, según observación de la integridad, refringencia y movilidad al observárseles al microscopio de contraste de fases. Otra evidencia en favor de que las células congeladas y descongeladas permanecen viables y capaces de reproducir el tumor, lo constituye el hecho de que un cierto número de ratones que recibieron las células así tratadas, desarrollen el tumor poco tiempo después, antes de haber recibido el reto. Esta circunstancia contribuyó a disminuir el porcentaje obtenido mediante la inmunización. Sin embargo, pudo observarse que el 92.8 % de los ratones que terminaron el período de inmunización sin mostrar indicios de crecimiento neoplásico, sobrevivieron indefinidamente después del reto y libres del tumor. Por lo tanto puede concluirse que realmente fueron inmunizados. Esto puede comprobarse mediante los experimentos de transferencia de inmunidad pasiva con linfocitos esplénicos.

Posiblemente otra circunstancia que pudo haber contribuido al desarrollo del tumor durante el período de la inmunización haya sido el que las células tumorales viables remanentes después de la congelación y descongelación, tienen la capacidad de regenerar el NANA separado de ellas por la neuraminidasa ^{73,74}. De haber ocurrido esto, las células viables pueden recuperar su estructura antigénica original de células neoplásicas intactas y

ya no ser inmunogénicas en el sentido de inducir una reacción de rechazo hacia ellas.

Por los resultados anteriores, puede verse que la inmunización activa con células tratadas con neuraminidasa produjo el nivel más alto de protección por vía intraperitoneal (92.8 %) comparada con la vía subcutánea (34.7 %)

Tradicionalmente se ha considerado la vía subcutánea como la - más inmunogénica, pero además se ha encontrado que la vía intraperitoneal es adecuada para la inmunización con células linfoides ⁷⁵⁻⁷⁷. En el presente trabajo, la vía intraperitoneal resultó más útil para estimular la respuesta inmune de rechazo contra las células L5178Y.

Los resultados de inmunización intraperitoneal con células tratadas con neuraminidasa pueden considerarse mejores que los obtenidos ya sea con células radiadas ⁴³ o sonicadas ⁴².

La inmunidad producida en los ratones inyectados con las células tratadas con neuraminidasa puede considerarse que fué una respuesta de rechazo que protegió a los animales así tratados - contra el reto por la vía intraperitoneal de las células L5178Y intactas.

En los animales inmunizados de este grupo, no se encontraron anticuerpos por la técnica de microcitotoxicidad. Dado que ésta es una técnica sensible ⁴⁴, puede pensarse que la respuesta inmune producida no fué con la obtención de gran cantidad de anticuerpos contra las células malignas y por lo tanto puede considerarse que la respuesta inmune hubiera sido preponderantemente de tipo celular. Esta suposición se comprobó en este mismo tra-

bajo al encontrarse que la inmunidad producida por las células tratadas con neuraminidasa es transferible por medio de linfocitos esplénicos. Por los resultados obtenidos en este grupo experimental, puede deducirse que la modificación de los antígenos de las células neoplásicas por medio de la neuraminidasa - permite despertar una respuesta inmune celular de rechazo y no una de facilitación inmunológica hacia las células malignas, - por lo cual este tipo de modificación enzimática de las células neoplásicas puede considerarse el método más racional para la inmunoprofilaxis o inmunoterapia del cáncer, como ya lo han demostrado trabajos previos ³⁸⁻⁴¹.

2. RATONES INMUNIZADOS CON LIQUIDO SOBRENADANTE

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

El que en este grupo se haya obtenido un porcentaje de protección inferior al de los ratones inmunizados con células tratadas con neuraminidasa, puede atribuirse a que el antígeno que contenía el líquido sobrenadante no fué modificado en su estructura química por la neuraminidasa, cuyo uso no se intentó con este material. No se usó la enzima en este caso porque hubiera sido difícil separarla del material antigénico y su inclusión -

hubiera oscurecido la interpretación de los resultados obtenidos, a más de tener efectos tóxicos ⁷⁶.

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

La concentración del antígeno contenido en el sobrenadante fué a la vez tan pequeño que no fué detectable por el método de electroforesis del líquido en agarosa. Las bandas comparativas de la electroforesis del líquido y del suero de los animales sanos o portadores de la neoplasia, no reveló proteínas anormales ni en el sobrenadante del líquido de ascitis ni en el suero de los portadores de la neoplasia antes de fallecer con el tumor completamente desarrollado.

En este grupo en particular, las diferencias de protección observadas cuando se empleó la vía subcutánea o intraperitoneal durante la inmunización, fueron menores que en el grupo precedente.

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

cas.

Por los resultados anteriores, puede considerarse que las células L5178Y liberan a los líquidos extracelulares ANE, lo cual es congruente con la suposición de otros autores ⁶⁵.

La importancia de demostrar la presencia de antígenos neoplásicos en los líquidos extracelulares, se deriva del hecho de que estos pueden inactivar a distancia los linfocitos inmunes antes de que éstos entren en contacto con las células malignas y ejerzan su efecto citocídico sobre ellas. Este mecanismo de bloqueo se ha considerado que constituye un medio más de supervivencia de las células neoplásicas in vivo. Por otra parte, los ANE pueden combinarse en otro tipo de neoplasias con los anticuerpos ya sea de rechazo o facilitación y formar complejos antígeno--anticuerpo con ellos. El resultado de esto se ha considerado favorable al crecimiento neoplásico ⁷⁹.

Adicionalmente la inyección de líquido sobrenadante no produjo tumor en los sitios de aplicación, por lo cual puede pensarse -- que en éste no se encontraban partículas oncogénicas virales -- que pudieran haber producido el tumor a expensas de las células del receptor.

3. RATONES INMUNIZADOS POR TRANSFERENCIA DE CELULAS LINFÓCIDES

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

Este es un ejemplo de inmunidad adoptiva^{80,81} que puede ser transferida por medio de linfocitos inmunes. La eficiencia de este fenómeno queda de manifiesto por el hecho de que 25×10^6 linfocitos inmunes fueron capaces de proteger contra el inóculo por la misma vía de 8×10^7 células neoplásicas en los seis ratones así tratados.

El fenómeno de inmunidad adoptiva se ha descrito como el que se produce mediante la transferencia de información por células linfoides y ya ha sido descrito en inmunidad de trasplante de tejidos normales y neoplásicos e inclusive se le ha ensayado como un procedimiento de inmunoterapia del cáncer⁸²⁻⁸⁸.

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

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

4. PRUEBA DE MICROCITOTOXICIDAD

Se ha demostrado en trabajos previos^{89,90} que los anticuerpos contra células de neoplasias linfoides no fijan complemento autólogo ni alogénico; pero si son capaces de fijar complemen-

to xenogénico de conejo. Por tal motivo se emplearon en las -- pruebas varias fuentes de complemento, pero aún así los resultados fueron negativos. En este trabajo se observó que el suero de conejo tiene una acción citotóxica heterofílica contra - los linfocitos normales y células L5178Y; pero a juzgar por - los testigos incluidos en la prueba, este efecto heterogénético es inespecífico tanto contra células linfoideas como las ma lignas

5. CITOTEXICIDAD LINFOCITARIA IN VITRO

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

Dado que los testigos pertinentes fueron congruentes con este resultado y que los linfocitos de ratones normales no mostraron este efecto, puede considerarse esta prueba como una evidencia adicional de que la inmunidad de rechazo hacia las células tumorales es de tipo celular mediada por linfocitos. La - realización de esta prueba se vió facilitada por el hecho de - que las células empleadas se mostraron adherentes al vidrio; a pesar de haberse informado en la literatura que no son adherentes 42,91.

6. CARIOTIPOS

El cariotipo del tumor L5178Y mostró 38 cromosomas, uno o dos de los cuales era submetacéntrico. Este resultó distintivo de estas células neoplásicas. Sin embargo se había informado brevemente hace ya algunos años por una comunicación personal ⁶⁴ que el número cromosómico de este tumor "variaba de 41 a 45 con un número modal de 43 y con alteración cromosómicas consistentes en la presencia de uno a cinco cromosomas diminutos, algunos teleocéntrico anormalmente largos y con ausencia de meta--céntrico".

Posiblemente esta neoplasia ha variado en su composición cromosómica a lo largo del tiempo en que se le ha mantenido transplantándola. Se desconoce el efecto que pudiera haber tenido - el transplantarla a receptores alogénicos de la cepa BALB/c.

La comparación del cariotipo tumoral con el de los ratones de las cepas DBA/2 o BALB/c, permite asegurar que las células neoplásicas L5178Y conservan en la actualidad un cariotipo constante que difiere de la cepa de origen (DBA/2) y del receptor (BALB/c). Esto permite asegurar de que se trata realmente de un trasplante neoplásico y que el tumor aparentemente no es inducido por algún agente oncogénico viral a expensas de las células del receptor.

Como se recordará, esta neoplasia por ser espontánea ⁴² resulta más semejante a las formas humanas de tumores.

El bandedo de los cromosomas tumorales y del ratón DBA/2, permite deducir que el cromosoma submetacéntrico marcador se ha for-

mado por la fusión centromérica de dos cromosomas.

7. ELECTROFORESIS

Por la técnica de electroforesis no fué posible detectar glucoproteínas anormales en el suero de los ratones de mantenimiento ni en el líquido de ascitis sobrenadante de las células neoplásicas. Posiblemente, mediante el empleo de técnicas más finas pudieron haber sido demostradas, debido a que se encuentran en baja concentración ^{72,73,92}.

Las células neoplásicas sintetizan una gran cantidad de glucoproteínas constituyentes del glicocáliz que las envuelve y desde el punto de vista inmunológico son portadores de los ANE ^{36, 93-98}. Parte de estas proteínas o ANE pueden pasar a los líquidos extracelulares y ser detectados en ellos ¹⁹.

La presencia de estas proteínas antigénicas (ANE) en el líquido sobrenadante, puede asegurarse por el poder inmunogénico -- que presentó éste en un grupo de ratones.

El interés de conocer la presencia de los ANE circulantes se deriva de la propiedad que tienen éstos de combinarse y bloquear los sitios de reconocimiento antigénico que tienen los linfocitos hacia los ANE de las células neoplásicas ⁷⁴⁻⁷⁶.

8. HISTOLOGÍA

El estudio histológico de las vísceras abdominales de los animales con tumor L5178Y mostró que dicho linfoma tiene la tendencia de mantenerse circunscrito a la cavidad abdominal y que sólo en un porcentaje bajo (10 %) de los ratones, infiltra los órganos abdominales. Esto constituye una ventaja de este tipo de neoplasia, la cual facilitó la evaluación de los resultados en el presente trabajo. Sin embargo, a pesar de esta localización, los animales inoculados con las células neoplásicas fallecían invariablemente en un período fijo de 10 días, por lo cual los resultados de la inmunización resultan claramente evaluables en función simplemente de la sobrevivida o muerte del ratón.

El estudio histológico de la neoplasia no puso en evidencia la causa de la muerte en los animales susceptibles al tumor.

Existen seis métodos potenciales para la inmunoterapia del cáncer⁷⁷, los cuales pueden ser específicos y no específicos y a la vez cada una de estas modalidades son pasivas, adoptivas o activas. Como se dijo anteriormente, el método de elección para lograr la inmunoprofilaxis y la inmunoterapia del cáncer es el procedimiento de inmunización activa y específica.

En años recientes se ha venido conociendo cada vez más acerca de la etiología del cáncer y de las relaciones inmunológicas existentes entre el tumor y el portador de la misma.

Es posible que a base de estos conocimientos, los procedimientos inmunológicos de diagnóstico, profilaxis y tratamiento del cáncer logren desarrollarse en el futuro.

El éxito de cualquier forma de inmunoterapia depende de la especificidad y efectividad del procedimiento. El fracaso de los tratamientos actuales contra las enfermedades malignas es su falta de selectividad antineoplásica. Es por esto que los métodos inmunológicos resultan promisorios, en vista de la especificidad antineoplásica que pueden ofrecer. Sin embargo por este sólo camino es probable que no se obtenga la solución integral del problema; pero es de esperarse que en el futuro la inmunoterapia tenga su principal aplicación como coadyuvante de los métodos convencionales tales como la cirugía, radioterapia y quimioterapia, para lograr la erradicación de las células malignas residuales o de las metástasis.

Por medio del tratamiento de las células malignas con neuraminidasa, se demuestra en este trabajo que las relaciones inmunológicas entre el tumor y el portador de la neoplasia pueden -- ser alteradas y lograrse el rechazo del tumor a pesar de que -- aquéllas normalmente tiendan a permitir el crecimiento maligno como si se tratara de un embarazo.

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fué investigar si es posible desarrollar un procedimiento de inmunización activa contra células neoplásicas.

Para ello se utilizó el modelo experimental del linfoma murino L5178Y, en el cual cuando es transplantable a receptores singénicos o allogénicos por vía intraperitoneal, los mata en diez días.

Las células de este tumor fueron tratadas con neuraminidasa a fin de modificar sus ANE mediante la remoción del NANA. A éste se ha atribuído la mayor electronegatividad, invasividad, capacidad de producir metástasis e inducción de la formación de anticuerpos de facilitación que favorecen la persistencia del tumor dentro del organismo.

Con las células tratadas con neuraminidasa se logró inducir una respuesta inmune de rechazo hacia las células neoplásicas no tratadas.

La respuesta inmune fué de tipo celular sin la aparición de anticuerpos demostrables en el suero de los animales resistentes.

La transferencia de linfocitos de animales inmunizados a ratones sanos volvió a éstos resistentes al trasplante neoplási-

co, el cual fué rechazado. Adicionalmente el estudio cromosómico de las células tumorales permiten asegurar que éstas son -- realmente transplantadas y que no ocurre transformación maligna de células de receptores por algún agente oncogénico viral.

Incidentalmente se encontró que el cariotipo de las células -- L5178Y actualmente no corresponde al informado previamente en la literatura.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento de las células del linfoma murino L5178Y con neuraminidasa, las vuelve inmunogénicas para el receptor, en el cual se induce una respuesta inmune de rechazo.
2. Esta respuesta inmune de rechazo es de tipo celular mediada por linfocitos, a juzgar por las siguientes evidencias:
 - a) Fué transferible adoptivamente por linfocitos esplénicos.
 - b) Fué posible observar efecto citocídico directo por contacto de los linfocitos inmunes contra las células neoplásicas.
 - c) Ausencia de anticuerpos en los animales inmunizados, según la prueba de microcitotoxicidad.
3. Mediante el estudio cromosómico se observó que las células tumorales L5178Y son transplantables, no interviniendo ningún agente oncogénico viral en la transformación maligna.
4. El cariotipo del tumor L5178Y mostró 38 cromosomas acrocéntricos, con excepción de un submetacéntrico marcador formado por la fusión centromérica de dos cromosomas.

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

1. Anuario Estadístico de la Secretaría de Industria y Comercio. 1969.
2. De la Loza Saldivar, A., Saldaña, J.H.: 1972. La mortalidad en el Distrito Federal en 1970. Bol. Med. IMSS. 14: 173.
3. Foley, E.J.: 1953. Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Res. 13: 835.
4. Rapport, M.M., Graf, L.M.D., Alonso, N.B.S.: 1955. Immunochemical studies of organ and tumor lipids II. Organ and species specificity of lipid antigens of the rat lymphosarcoma. Cancer. 8: 546.
5. Prehn, R.T.: 1957. Specific immunity to methyl cholanthrene induced sarcomas. J. Nat. Cancer Inst. 18: 769.
6. Graf, L., Rapport, M.M., Brandt, R.: 1961. Immunochemical studies of organ and tumor lipides. X The presence of a novel lipide hepten, cytolinin G, in tumor and tissues of the gastrointestinal tract. Cancer Res. 21: 1532.
7. Old, L.J., Boyce, E.A.: 1964. Immunology of experimental tumor. Am. Rev. Med. 15: 167.
8. Prehn, R.T.: 1965. Cancer antigens in tumors induced by chemicals. Fed. Proc. 24: 1918.
9. Klein, G.: 1966. Tumor antigens. Ann. Rev. Microbiol. 20: 233.
10. Haughton, G., Amos, D.B.: 1968. Immunology of carcinogenesis. Cancer Res. 28: 1839.

11. Smith, R.T.: 1968. Tumor specific immune mechanisms. New - Engl. J. Med. 278: 1207.
12. Hamilton, F.G.: 1969. Immunity to malignant diseases in - man. Brit. Med. J. 2: 467.
13. Klein, G.: 1969. Experimental studies in tumor immunology. Fed. Proc. 28: 1739.
14. Alexander, P.: 1972. Foetal "antigens" in cancer. Nature. 235: 137.
15. Kirby, D.R.S., Billington, W.D., James, D.A.: 1966. - Transplantation of eggs to the kidney and uterus of - immunised mice. Transplantation. 4: 713.
16. Buttle, G.A.H., Frayn, A.: 1967. Effect of previous - injection of homologous embryonic tissue on the growth of - certain transplantable mouse tumors. Nature. 215: 1495.
17. Abelev, G.I.: 1968. Production of embryonal serum alpha - globulin by hepatomas: Review of experimental and clinical data. Cancer Res. 28: 1344.
18. Coggin, J.H., Ambrose, K.R., Anderson, N.G.: 1970. Fetal - antigen capable of inducing transplantation immunity - against SV 40 hamster tumor cells. J. Immunol. 105: 525.
19. Gold, P., Freedman, S.O.: 1965. Specific carcinoembryonic - antigens of the human digestive system. J. Exp. Med. 122: 467.
20. Laurence, D.J.R., Munro, N.A.: 1972. Foetal antigens and - their role in the diagnosis and clinical managements of - human neoplasms: a review. Br. J. Cancer. 26: 335.
21. Peterson, G., Freeman, G.: 1968. Evidence suggesting a - relationship between Polyoma virus induced trasplantation antigen and normal embryonic antigen. Cancer Res. 28: 1665.
22. Stonehill, E.H., Bendich, A.: 1970. Retrogenetic expression - the reappearance of embryonal antigens in cancer cells. - Nature. 228: 370.

23. Ambrose, K.R., Anderson, W.G., Coggin, J.H.: 1971. Interruption of SV 40 oncogenesis with human foetal-antigen. *Nature*. 233: 194.
24. Bardawil, W.A., Toy, B.L.: 1959. The natural history of choriocarcinoma: Problems of immunity and spontaneous regression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 80: 197.
25. Douglas, G.W., Thomas, L., Carr, M., Cuilen, N.M., Morris, R.: 1959. Trophoblast in the circulating blood during-pregnancy. *Am. J. Obst. Gynecol.* 78: 960.
26. Hamilton, W.J., Boyd, J.D.: 1966. Specializations of the syncytium of the human chorion. *Br. Med. J.* I: 1501.
27. Currie, G.A.J.: 1967. Immunological studies of trophoblast in vitro. *J. Obstet. Gynec. Br. Cwlth.* 74: 841.
28. Ralph, M., Wynn, M.D.: 1967. Fetomaternal cellular relations in the human basal plate: An ultrastructural study of the placenta. *Am. J. Obst. Gynecol.* 97: 832.
29. Kaliss, N., Kandusch, A.A.: 1956. Acceptance of tumor-homografts by mice injection with antiserum. I Activity of serum fractions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91: 118.
30. Hutchin, P.: 1968. Mechanisms and functions of immunological enhancement. *Surg. Gynec. Obst.* 126: 1331.
31. Currie, G.A., Bagshawe, K.: 1967. The masking of antigens on trophoblast and cancer cells. *Lancet*. 1: 708.
32. Wallach, D.F.H.: 1968. Cellular membranes and tumor-behavior: A new hypothesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61: 868.
33. Burger, M.M.: 1969. A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 62: 994.
34. Inbar, M., Sachs, L.: 1969. Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. *Nature*. 223: 710.

35. Currie, G.A.: 1967. Masking of antigens on the Landschütz ascitis tumor. *Lancet*. ii: 1336.
36. Sandford, B.H.: 1967. An alteration in tumor -
histocompatibility induced by neuraminidase. -
Transplantation. 5: 1273.
37. Granger, G.A., Williams, T.W.: 1968. Immunogenicity of -
L1210 murine leukaemia cells after treatment with -
neuraminidase. *Nature*. 218: 1254.
38. Currie, G.A., Bagshawe, K.P.: 1969. Tumour specific- -
immunogenicity of methyl cholantrene induced sarcoma cells
after incubation in neuraminidase. *Br. J. Cancer*. 23: 141.
39. Bekesi, G.J., Arneault, St.G., Hoolland, F.J.: 1971. Increase
of leukemia L-1210 immunogenicity by Vibrio cholerae- -
neuraminidase treatment. *Cancer Res*. 31: 2130.
40. Simmons, R.L., Rios, A., Lundgren, G., Ray, P.K., Mc Khawn, C.
F., Haywood, G.R.: 1971. Immunospecific regression of -
methyl cholantrene fibrosarcoma with the use of -
neuraminidase. *Surgery*. 70. 38.
41. Simmons, R.L., Rios, A., Ray, P.K.: 1971. Immunogenicity and
antigenicity of lymphoid cells treated with neuraminidase.
Nature New Biol. 231: 179.
42. Manson, L.A., Foschi, E.V., Duplan, J.F.: 1960. Isolation of
transplantation antigens from a cultured lymphoblast -
L5178Y. *Nature*. 186: 598.
43. Böyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and -
granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*
21: Suppl. 97: 77.
44. Mittal, K.K., Mickey, M.R., Singal, D.P., Terasaki, P.I.:
1968. Serotyping for homotransplantation, XVIII. -
Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test.
Transplantation. 6: 913.

45. Gurst, D.H.: 1972. Mouse chromosomes identified by trypsin Giemsa (T-G) banding. *Cytogenetics*. 11: 379.
46. Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice: 1972. Standard karyotype of the mouse, Mus musculus. *J. Hered.* 63: 69.
47. Heer, E.E., Marni, R.A.: 1971. *Electro e immunoelectrofore-sis*. 1a Edición. Gumersindo F. Fernández. Argentina.
48. Burnet, F.M.: 1961. Immunological recognition of self. *Science*. 133: 307.
49. Aaronson, A.S., Todaro, G.J.: 1968. Basis for the-acquisition of malignant potential by mouse cells-cultivated in vitro. *Science*. 162: 1024.
50. Keast, D.: 1970. Immunosurveillance and cancer. *Lancet*. 2: 710.
51. Rosenau, W., Moon, H.D.: 1961. Lysis of homologous cells by sensitized lymphocytes in tissue culture. *J. Nat. Cancer Inst.* 27: 471.
52. Taylor, H.E., Culling, C.: 1963. Cytopathic effect in vitro of sensitized homologous and heterologous spleen cells on-fibroblasts. *Lab. Inv.* 12: 884.
53. Vainio, T., Koskimies, D., Perlmann, P., Permann, H., Klein, G.: 1964. In vitro cytotoxic effect of lymphoid cells from mice immunized with allogeneic tissue. *Nature*. 204: 453.
54. Ginsburg, H., Sachs, L.: 1965. Destruction of mouse and rat embryo cells in tissue culture by lymph node cells from-unsensitized rats. *J. Cell. Com. Physiol.* 66: 199.
55. Ginsburg, H., Tyler, R.W., Everett, N.B.: 1967. Immunological studies of lymphocytes employing an in vitro monolayer-system. *Anat. Rec.* 157: 247.
56. Ax, W., Malchow, H., Zeiss, I., Fischer, H.: 1968. The-behaviour of lymphocyte in the process of target cell-destruction in vitro. *Exp. Cell. Res.* 53: 108.

57. Ginsburg, H., Lagunoff, D.: 1968. Aggregation and transformation of rat lymphocytes on rat embryo-monolayers. *J. Cell. Biol.* 39: 392.
58. Grønger, G.A., Kolb, W.P.: 1968. Lymphocyte in vitro-cytotoxicity mechanisms of immune and non immune small lymphocyte mediated target L cell destruction. *J. Immunol.* 101: 111.
59. Lungren, G., Collste, L., Möller, G.: 1968. Cytotoxicity of human lymphocytes: Antagonism between inducing processes. *Nature.* 220: 289.
60. Denham, S., Grant, C.K., Hall, J.G., Alexander, P.: 1970. The occurrence of two types of cytotoxic lymphoid cells in mice immunised with allogeneic tumor cells. *Transplantation* 9: 366.
61. Grant, C.K., Denham, S., Hall, J.G., Alexander, P.: 1970. Antibody and complement like factors in the cytotoxic action immune lymphocytes. *Nature.* 227: 509.
62. Hellström, K.E., Hellström, I., Brawn, J.: 1969. Abrogation of cellular immunity to antigenically foreign mouse-embryonic cells by a serum factor. *Nature.* 224: 914.
63. Kaliss, N., Bryant, B.F.: 1958. Factors determining homograft destruction and immunological enhancement in mice receiving successive tumor inocula. *J. Nat. Cancer Inst.* 20: 691.
64. Thomson, D.M.P., Krupay, J., Freedman, S.O., Gold, P.: 1969. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 64: 161.
65. Currie, G.A., Basham, C.: 1972. Serum mediated inhibition of the immunological reactions of the patient to his own tumour a possible role for circulating antigen. *Br. J. Cancer.* 26: 427.

66. Mc Sween, J.M., Warner, N.L., Bankhurst, A.D., McKay, I.R.: 1972. Carcinoembryonic antigen in whole serum. Br. J. Cancer. 26: 356.
67. Marshall, W.E., Porath, J.: 1965. The structure of glycoproteins. I The nature and number of oligosaccharide side chains of alpha 1 acid glycoprotein, ceruloplasmin, and alpha 2 globulin, and alpha globulin of human serum. J. Biol. Chem. 240: 209.
68. Rosenberg, S.A., Einstein, A.B.: 1972. Sialic acids on the plasma membrane of cultured human lymphoid cells. Chemical aspects and biosynthesis. J. Cell. Biol. 53: 466.
69. Sinkovics, J.G., DiSaia, P.J., Rutledge, F.N.: 1970. Tumour Immunology and evolution of the placenta. Lancet. II: 1190
70. Currie, G.A.: 1972. Eighty years of immunotherapy: a review of immunological method used for the treatment of human cancer. Br. J. Cancer. 26: 141.
71. Kraemer, P.M.: 1966. Sialic acid of mammalian cell lines. J. Cell. Physiol. 67: 23.
72. Currie, G.A., Bashaw, K.D.: 1968. The role of sialic acid in antigenic expression: Further studies of the Landschütz ascitis tumor. Br. J. Cancer. 22: 843.
73. Gasic, G., Gasic, T.: 1962. Removal and regeneration of the cell coating in tumor cells. Nature. 196: 170.
74. Kraemer, P.M.: 1966. Regeneration of sialic acid on the surface of chinese hamster cells in culture I. General characteristics of the replacement process. J. Cell. Physiol. 68: 85.
75. Keif, A.L., Allen, J.M.V.: 1964. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. J. Exp. Med. 120: 413.

76. Raff, M.C.: 1969. Theta isoantigen as a marker of thymus -
derived lymphocytes in mice. *Nature*. 224: 378.
77. Sclesinger, M., Yron, I.: 1969. Antigenic changer in -
lympho node cells after administration of antiserum to -
thymus cells. *Science*. 164: 1412.
78. Gasic, G.J., Gasic, T.B.: 1970. Total suppression of -
pregnancy in mice by post coital administration of -
neuraminidase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 67: 793.
79. Hellström, E., Hellström, D.: 1971. Some aspects of the -
immune defence against cancer I. In vitro studies on -
animals tumors. *Cancer*. 28: 1266.
80. Old, L.J., Boyse, E.A., Bennett, B., Lilly, F.: 1963. -
Peritoneal cells an immune population in transplant -
studies. Eds. *Cell Bound antibodies* p. 89 Philadelphia.
81. Hellström, I., Hellström, K.E., Sjögre, H.O., Warner, G.A.: -
1971. Demonstration of cell mediated immunity to human -
neoplasms of various histological types. *Int. J. Cancer*.
7: 1.
82. Mitchinson, N.A.: 1954. Passive transfer of transplantation
immunity. *Proc. Roy. Soc. Med.* 142: 72.
83. Mitchinson, N.A.: 1955. Studies on the immunological -
response to foreign tumor transplants in the mouse I. The
role of lymph node cells in conferring immunity by -
adoptive transfer. *J. Exp. Med.* 102: 157.
84. Klein, E., Sjögren, H.O.: 1960. Humoral and cellular factors
in homograft and isograft immunity against sarcoma cells.
Cancer Res. 20: 452.
85. Woodruff, M.F.A., Symes, M.O.: 1962. The use of -
immunologically competent cells in the treatment of cancer.
Br. J. Cancer. 16: 707.
86. Bard, D.S., Hammond, J.G., Filch, Y.H.: 1969. The role of -
the regional lymph nodes in the immunity to a chemically

- induce sarcoma in C3H mice. *Cancer Res.* 29: 1379.
87. Law, W.: 1969. Studies of the significance of tumor antigens in induction and regression of neoplastic diseases: Presidential address. *Cancer Res.* 29: 1.
88. Prehn, R.T.: 1972. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science.* 176: 170.
89. Gómez, E.H., Arechavala, B.J., Isassi, Ch.A., Fernández, Q.P., Luján, P.A.: 1971. Anticuerpos a células leucémicas. *Patología.* 9: 195.
90. Gómez, E.H., Hernández, J.P., Arellano, B.J., Fernández, Q.P. (en prensa). Cytotoxic antibodies in veneral sarcoma of the dog.
91. Fisher, G.A.: 1958. Studies of the culture of leukemia cells in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 76: 673.
92. Lichtman, M.A., Weed, R.T.: 1970. Electrophoretic mobility and N-acetyl neuraminic acid of human normal and leukemic lymphocytes and granulocytes. *Blood J. Hematology.* 35: 12.
93. Defendi, V., Gasic, A.: 1963. Surface mucopolysaccharides of polyoma virus transformed cells. *J. Cell. Comp. Physiol.* 62: 23.
94. Kalckar, H.M.: 1965. Galactose metabolism and cell "sociology". *Science.* 150: 305.
95. Bosmann, H.G., Hagopian, A., Eylar, E.H.: 1968. Membrane glycoprotein biosynthesis: changes in levels of glycosyl transferases in fibroblasts transformed by oncogenic viruses. *J. Cell. Physiol.* 72: 81.
96. Frot-Coutaz, J., Lovisot, P., Got, R., Colobert, L.: 1968. Subcellular incorporation sites of L-fucose-1 ¹⁴C into glycoproteins of normal cancerous cells in vitro cultures. *Experimenta.* 24: 1206.
97. Molnar, J., Chao, H., Markovic, G.: 1969. Subcellular sites of structural glycoprotein synthesis in Ehrlich ascitis tumor. *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 533.

98. Moscona, A.A.: 1971. Embryonic and neoplastic cell - surfaces: Availability of receptors for concavalin A and wheat germ agglutinin. Science, 171: 905.