



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 :

MARIA CONCEPCION RIOS GUZMAN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

I N D I C E.

	PAG.
DEDICATORIAS -----	I - III
INTRODUCCION -----	1 - 11
FUNDAMENTACION DEL TEMA -----	12 - 13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	14 - 15
OBJETIVOS -----	16
HIPOTESIS -----	17
MATERIAL Y METODOS -----	18 - 28
RESULTADOS -----	29 - 48
DISCUSION -----	49 - 52
CONCLUSIONES -----	53
ANEXO -----	54 - 58
BIBLIOGRAFIA -----	59 - 62

INTRODUCCION.

a).- Respuesta Inmune Inespecifica.- El sistema inmunológico provee al organismo humano de una intrincada red de mecanismos que interaccionan entre sí para protegerlo tanto de las agresiones infecciosas y parasitarias como de proliferaciones malignas. Esta protección se genera durante la respuesta inmune que comprende actividades catalogadas como específicas e inespecíficas e incluye elementos humorales y celulares en ambas categorías (1).

Entre los mecanismos de resistencia inespecifica se encuentran aquellos que las células fagocíticas llevan a cabo para constituirse en una de las primeras barreras de defensa para eliminación de microorganismos y células extrañas al individuo. Estas células fagocíticas se definen por su capacidad de ingerir partículas vivas o inertes. Entre ellas se encuentran los macrófagos, los monocitos y los polimorfonucleares (PMN), siendo éstos últimos los más numerosos en circulación sanguínea. La habilidad de las células fagocíticas para matar bacterias ha sido atribuida a una extensa variedad de agentes que se producen constantemente o se forman durante la fagocitosis (26).

El proceso fagocítico incluye varias etapas que se manifiestan como diferentes funciones interrelacionadas entre sí tales como la quimiotaxis, la opsonización, la ingestión, la desgranulación y la exocitosis. La quimiotaxis es la migra-

ción dirigida por una substancia que atrae a las células hacia los antígenos (Ag). Los factores quimiotácticos se liberan como parte de la reacción inflamatoria y entre ellos hay algunos contenidos por los PMN, con acción quimotáctica directa (34) y otros generados por interacción de los mismos PMN con el complemento (C') (30, 31, 32, 33). Las células linfoides producen además factores que inmovilizan a los leucocitos PMN evitando su alejamiento del sitio de inflamación (11, 13), así como factores que inactivan los agentes quimiotácticos (30, 31, 32), conduciendo de tal manera a la regulación de la respuesta, gracias a una compleja red de interacciones.

La opsonización es otro fenómeno importante que participa en el contexto de la fagocitosis al convertir a las partículas extrañas en material más susceptible de ingestión. Posteriormente se lleva a cabo la endocitosis gracias a movimientos membranales mediados por microfilamentos de actina y miosina que culminan en la emisión de pseudópodos que engloban a las partículas extrañas y se fusionan para constituir el fagosoma. Es entonces cuando ocurre la fusión de lisosomas con el fagosoma para vertir el contenido enzimático en esta nueva estructura que se conoce como fagolisosoma y que es donde se lleva a cabo la destrucción del material ingerido que será finalmente exocitado^(5, 7).

En los fagocitos existen múltiples sistemas micro

bicidas que podríamos dividir con fines de estudio en dependientes e independientes de oxígeno. Entre los primeros debemos mencionar los radicales libres derivados del oxígeno, el peróxido de hidrógeno y el sistema de las mieloperoxidasas. Entre los segundos están las proteínas catiónicas de PMN, la lactoferrina, la lisozima y la elastasa.

Uno de los principales mecanismos oxidativos es el que representa la mieloperoxidasa (MPO) cuando se combina con una fuente de hidrógeno y un haluro (17, 22). Los leucocitos PMN son especialmente ricos en MPO mientras que los eosinófilos son igualmente ricos en otra variedad de peroxidasa conocida como la eosinófil peroxidasa (EPO) (17).

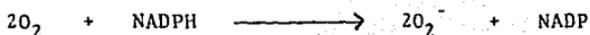
Schultz y Kaminker sugieren que en el neutrófilo humano normal el contenido de MPO es mayor de 5% del peso seco de la célula (17). Esta enzima fue llamada originalmente verdoperoxidasa por Agner debido a su color verde. Sin embargo, el nombre de MPO fue adoptado cuando se descubrió que la peroxidasa de la leche también tiene color verde.

La MPO es una proteína básica compuesta de varias subunidades con un peso molecular (PM) combinado entre 130 y 150 KD. La cantidad y estructura de las subunidades no se ha determinado en forma definitiva puesto que diferentes estudios describen la presencia de números diferentes de subunidades electroforéticas (25). La variación de estos resultados obedece aparentemente al tipo de gel usado para el análisis y el tipo de células examinadas (2, 4, 34).

La EPO difiere de la MPO en estructura primaria, en su grupo hemo y en las reacciones que cataliza. La EPO forma también un sistema citotóxico cuando se combina con H_2O_2 y un haluro, aunque esta enzima parece reaccionar menos rápidamente que la MPO con el cloruro (14).

El neutrófilo responde durante la fagocitosis, -- con un incremento del consumo de oxígeno. Esta combustión respiratoria dá como resultado la generación de oxidantes con capacidad destructiva. Entre ellos podemos citar la activación de una oxidasa unida a la membrana cuyo principal -- sustrato es aparentemente la nicotinamida adenin dinucleotidofosfato reducida (NADPH). Además la nicotinamida adenin dinucleotido reducida (NADH) también podría servir como sustrato En ambos casos hay la participación de un citocromo -- de tipo b.

Esta oxidasa cataliza la reacción



Generandose un peroxido de hidrógeno a partir del ión superoxido.



cual puede llevarse a cabo espontáneamente o con participa-- ción de la superoxido dismutasa.

El peroxido puede ejercer un efecto bactericida, -- que se incrementa al combinarse con la MPO y un haluro con -- la formación de radicales oxidantes altamente reactivos: (5, 29)



Los gránulos de los eosinófilos contienen una proteína fuertemente catiónica conocida como Proteína Básica -- Principal (PBP) que tiene propiedades tóxicas, Los eosinófilos no ingieren microorganismos tan bien como lo hacen los neutrófilos, pero pueden dañar organismos que resulten demasiado grandes para ser ingeridos. Es bien conocida la eosinofilia que se presenta en los pacientes con parasitosis, como por ejemplo con helmitos. Además hay diferencia en cuanto a los gránulos de peroxidasa que se pierden en los monocitos -- cuando se convierten en macrófagos tisulares. Los macrófagos pueden contener peroxidasa en el aparato secretor, manifestando su actividad cuando se adhieren a una superficie in vitro (14). Esta peroxidasa parece diferir de la contenida en gránulos de los neutrófilos por aparecer en el retículo endoplásmico de los monocitos adherentes de pacientes con ausencia de MPO. La peroxidasa presente en el retículo no es liberada en el fagolisosoma y no hay evidencia de que esta sea secretada hacia el fluido extravascular y así no parece estar involucrada en la actividad tóxica de los macrófagos (23, 26).

Las evidencias de participación del sistema de la -- MPO en la actividad microbicida en la célula intacta provienen del estudio de pacientes con un defecto congénito en la función del neutrófilo. La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es casi siempre mortal durante la infancia y los niños que la

padecen sufren infecciones granulomatosas repetitivas causadas por bacterias consideradas comunmente de bajo grado de patogenicidad. La causa de este tipo de infecciones fué demostrada en 1967, al comprobar que los neutrófilos de los pacientes podían fagocitar ciertas bacterias normalmente, pero eran incapaces de destruirlas. El defecto en la EGC radica en la ausencia de activación de la oxidasa de la membrana que inicia la combustión respiratoria (5). Por ello es que no se genera H_2O_2 y se pierde el complejo de destrucción MPO-haluro- H_2O_2 (7).

Otro defecto congénito del metabolismo que ha contribuido a incrementar el conocimiento de la actividad microbida del neutrófilo es la deficiencia hereditaria de la MPO. Este es un desorden genético raro en el cual se encuentra ausente la MPO de neutrófilos y monocitos, por lo que no pueden matar a los microorganismos normalmente (19, 24). En virtud de tal defecto la células utilizan como alternativa para efectuar su acción microbida los productos de reducción del oxígeno altamente reactivos como el anión superóxido, H_2O_2 y los radicales hidroxilo en combinación con los sistemas antimicrobianos independientes del oxígeno

Sin embargo el mecanismo preciso por el cual el sistema MPO-haluro- H_2O_2 ejerce una actividad bactericida sigue bajo investigación (16). Cuando el yoduro es el haluro, la yodación de la bacteria constituye aparentemente la causa de muerte

bacteriana. Cuando el cloruro es el haluro los aminoácidos se descarboxilan oxidativamente a su forma de aldehídos - con propiedades bactericidas potenciales. Algunos experimentos indican que el aldehído se forma de aminoácidos de origen microbiano ⁽²⁶⁾ mientras que el sistema de la mieloperoxidasa diamina y descarboxila glicina, alanina, ácido aspártico, cisteína, lisina, serina, fenilalanina, valina -- leucina e isoleucina ⁽²⁶⁾.

El efecto del sistema MPO-H₂O₂-haluro, puede ser inhibido por azida, cianuro, tiocianato, tapazole, tiourea, glutatión reductasa, cistina y tiosulfato ⁽¹⁶⁾.

b).- Vigilancia Inmunológica.- En cuanto a las enfermedades neoplásicas se refiere, el sistema inmune cuenta con lo que se conoce como "Vigilancia Inmunológica" (VI) bajo cuyo título se engloban todos aquellos mecanismos que -- participan de alguna manera en la prevención o eliminación de un tumor. La respuesta se genera debido al estímulo que -- constituye la aparición de neoantígenos sobre las células alteradas, por lo que son reconocidas como extrañas ⁽¹⁾.

De hecho, la membrana de la célula tumoral es un mosaico antigénico complejo que asocia estructuras normales como los Ag de histocompatibilidad, con Ag tumorales (AT). -- La intensidad y la efectividad de la respuesta inmune (RI) -- estará de acuerdo a las características físicas e inmunológicas de dichos AT ⁽²⁰⁾.

La respuesta inmune puede ser de tipo celular y humoral pero la respuesta de tipo celular (RIC) es la que se considera fundamental en la VI, manifestandose por la producción de sustancias solubles con acción directa sobre otras células normales o alteradas y por la acción directa de linfocitos para lograr la destrucción de células tumorales, con o sin la participación de moléculas producidas por otras células (24).

La RIC está representada por linfocitos T circulantes entre los cuales hay algunos capaces de destruir a las células tumorales al contacto. Estos linfocitos derivan de una célula madre en la médula ósea, maduran en el timo y residen en los órganos linfoides (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas, apéndice y placas de Peyer) en donde se liberan a la circulación sanguínea y linfática para dividirse el ser estimulado por un Ag.

La actividad de los linfocitos T ocurre primordialmente a través de un contacto íntimo entre células T y macrófagos, después de que estos últimos han tomado y procesado al Ag. Además el macrófago colabora con la célula T en la destrucción del tumor a través de un juego elaborado de señales humorales. El macrófago es atraído hacia la vecindad del linfocito inmune por factores quimiotácticos para luego ser retenido y finalmente instruido o activado por el mismo linfocito T mediante otras linfocinas (MIF y MAF). El macrófago activado pue

de ser visto como una célula asesina relativamente inespecífica que parece haber adquirido una capacidad marcada para matar selectivamente las células malignas con las cuales entra en contacto.

La respuesta inmune humoral (RIH) se encuentra representada por los linfocitos B que derivan también de células madre en la médula ósea donde posiblemente maduran para después migrar a los órganos linfoides sin pasar por el timo. Las células B proliferan cuando son estimuladas y se diferencian en células plásmáticas, que son la fuente de producción de anticuerpos (Ab). Las células B pueden ser estimuladas directamente por AT o indirectamente por medio de células T -- cooperadoras y los macrófagos. Este tipo de RI también juega un papel en el control de tumores pero ha sido visto poco efectivo, especialmente en relación a tumores sólidos. Adicionalmente; la RIH podría resultar finalmente de protección y promoción tumoral, a través de los mecanismos de manipulación del huésped que los tumores llevan a cabo. Otras células linfoides que no se han clasificado con certeza entre ninguno de los dos grandes grupos (T y B) de que hemos hablado también -- participan manifestando acción citotóxica. Estas células, cuyo mecanismo de acción no ha sido tampoco plenamente dilucidado se conocen como células NK (natural killer o célula asesina natural).

Además de las células linfoides, que son las célu-

las centrales de la RIC y RIH, también participan otros leucocitos con funciones fagocíticas y citotóxicas, a través de mecanismos como los descritos en la primera parte de la introducción.

c).- Cáncer Cérvico Uterino. - El carcinoma cervical es el tipo de cáncer que afecta más frecuentemente a las mujeres del mundo en desarrollo. En Africa y en America Latina la incidencia es de más de 50 casos por 100 000 y guarda una relación directa con el déficit sociocultural, higiénico y económico de quienes lo padecen (10).

Su etiología permanece desconocida. No obstante; varios estudios epidemiológicos han demostrado que el cáncer cérvico uterino (CaCU) es más frecuente en mujeres que inician muy jóvenes su vida sexualmente activa, que tienen su primer embarazo a tempran edad, que son multiparas y han tenido varios compañeros sexuales especialmente si los hábitos higiénicos genitales son deficientes y los compañeros sexuales no son circuncidados (18). Además, los estudios serológicos indican que las mujeres con CaCU tienen Ab contra el virus herpes simple (HS-2) con un título y una frecuencia extraordinariamente elevadas (10, 18).

De acuerdo con la Federación Internacional de Gineco Obstetricia (FIGO) el CaCU se clasifica clínicamente en 4 estadios posteriores a la displasia y al cáncer in situ o estadio 0 de acuerdo a la siguiente manera:

Estadio 0.- Carcinoma preinvasivo, también llamado in situ, en cuyas lesiones no hay evidencia de infiltración.

Estadio I.- El carcinoma está confinado estrictamente al cérvix y no se presenta induración en el parametrio se considera II A. Cuando además se presenta dicha induración en parametrios se clasificará como estadio II B.

Estadio III.- Carcinoma extendido hasta la pared pélvica (III B) o se extiende hasta el tercio inferior de la vagina (III A).

Estadio IV.- Carcinoma diseminado más allá de la -pélvis o que invade la mucosa de la vejiga o del recto (IV A) o ha metastatizado a organos distantes (IV B).

FUNDAMENTACION DEL TEMA.

Se considera que la función primordial de los polimorfo nucleares (PMN) es la ingestión y muerte de microorganismos patógenos mediante la fagocitosis. Sin embargo; los PMN también participan en otros aspectos igualmente importantes de la respuesta inmune (RI) como son la presentación del antígeno, citotóxicidad y secreción de sustancias con acción biológica como el interferón. Además se ha establecido que -- los agentes microbicidas como el interferón y el peróxido de hidrógeno son liberados en sitios extracelulares, donde afectan blancos solubles y particulados. Así mismo, existen evidencias acerca del efecto citotóxico de leucocitos humanos sobre células neoplásicas, los cuales hablan de la participación -- del sistema de la peroxidasa en esta actividad.

Se ha demostrado que los neutrófilos humanos pueden liberar cantidades citotóxicas de H_2O_2 y mieloperoxidasa (MPO) que en combinación con un haluro destruyen células tumorales murinas ⁽⁹⁾. Además también se ha demostrado potencial citotóxico de granulocitos humanos activados con acetato de forbol miristato (PMA) contra una línea celular de linfocitos T-humanos (CEM) ⁽²⁹⁾. Esta última actividad se debe a la formación de ácido hipocloroso a consecuencia de la activación del sistema de peroxidación. La participación de la MPO del neutrófilo, en mecanismos de control y actividad antitumoral fué confirmada por la inhibición de la citotóxicidad con azida de so-

dio o cianuro así como por la actividad marcadamente disminuida de los neutrófilos de los pacientes con deficiencia hereditaria de MPO y la corrección específica de este defecto al -- agregar MPO purificada (8).

En virtud de que el cáncer cérvico uterino (CaCU) es la neoplasia más frecuente en la mujer en nuestro medio; que representa un grave problema de salud pública y tomando en -- cuenta el hecho de que la RI inespecífica (RII) constituye la primera barrera hacia la proliferación de material extraño al organismo, como lo puede ser una célula aberrante, consideramos interesante evaluar dicha respuesta en pacientes con CaCU. Para ello utilizamos como primer enfoque un modelo de estudio basado en el control de crecimiento bacteriano por elementos celulares y humorales. El trabajo aquí descrito comprende la -- primera fase cuyo objetivo será el iniciar análisis y estandarización de los métodos que nos permitan evaluar las diferentes variables involucradas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se desconoce las concentraciones óptimas de los reactivos que participan en sistemas de peroxidación que son importantes en la realización de mecanismos bactericidas. El haluro involucrado puede ser cloruro, yoduro o bromuro⁽¹⁶⁾. Se sabe que el cloruro es efectivo a concentraciones fisiológicas (0.1 M) y a un pH de 5.0, mientras que la contribución neta del yoduro y/o bromuro se desconoce, aunque se sabe que están presentes en suero a concentraciones menores a 1 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ y 372 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ respectivamente y que son en realidad extremadamente bajas (33).

Los sistemas de peroxidación se ubican entre los mecanismos dependientes del oxígeno que se llevan a cabo en el interior de las células fagocíticas. Las células polimorfonucleares (PMN) en particular, son las más abundantes en circulación sanguínea. Estas células PMN constituyen parte importante de la respuesta inmune inespecífica, participando a través de la fagocitosis y eliminación de bacterias y células tumorales que toman como blanco de su actividad.

Es por ello que consideramos importante investigar la función de las células PMN de pacientes con cáncer. El cáncer cérvico uterino sigue siendo desafortunadamente un modelo de estudio obligado en nuestro país. En relación a este tipo de cáncer se han descrito varias alteraciones celulares entre las que se incluyen leucopenia, linfopenia y proporcio-

nes alteradas de subpoblaciones celulares, así como algunas otras alteraciones humorales (1, 24). En las pacientes con CaCU se ha observado previamente granulocitosis y con este trabajo se inicia un diseño experimental que pretende buscar el punto de contacto entre la función de esos números de PMN circulantes en exceso y su capacidad funcional que podría conducir hacia manifestaciones de actividad antitumoral.

Uno de los aspectos se dirigirá hacia la evaluación de esa granulocitosis que mencionamos. Posteriormente se trata de observar la capacidad de control sobre el crecimiento bacteriano en un sistema in vitro. Para ello se analizarán las diferentes variables de tiempo, temperatura y concentraciones celulares y bacterianas. Finalmente se tratará de observar la presencia de mieloperoxidasa (MPO) y la actividad de esta enzima proveniente de los mismos PMN.

Los aspectos mencionados se estudiarán haciendo una comparación entre células obtenidas de un grupo de pacientes con aquellas provenientes de un grupo de mujeres sanas a las que se practicará pruebas similares como control.

OBJETIVOS.

1.- Demostrar una alteración en la cantidad de células circulantes en sangre periférica de pacientes con CaCU en relación a controles normales.

2.- Estudiar la influencia que sobre el crecimiento bacteriano ejercen suero y células circulantes en sangre periférica de pacientes con CaCU. Para ello también se evaluará la actividad microbicida de células y suero de donadoras sanas.

3.- Analizar y tratar de optimizar las condiciones necesarias para la realización de un ensayo in vitro, útil en el estudio de sistemas de peroxidación utilizando como blanco 2 cepas bacterianas.

4.- Determinar los niveles enzimáticos de MPO en leucocitos totales de pacientes con CaCU, así como de donadoras normales, utilizando métodos fotocolorimétricos.

5.- Continuar con estos estudios otros que se han llevado a cabo anteriormente para tratar de incrementar el conocimiento de la relación que hay entre la funcionalidad del sistema inmune y la presencia de un tumor en cervix uterino.

6.- Iniciar estudios que nos permitan tratar de establecer el punto de unión entre la actividad en general de PMN y MPO en particular con la presencia de un tumor.

HIPOTESIS.

Consideramos importante la evaluación de mecanismos funcionales de las células polimorfonucleares de pacientes con cáncer en quienes suponemos que puede haber una falla en la respuesta inmune inespecífica coexistiendo con la presencia del carcinoma. Por esto hemos decidido utilizar un método de estudio con el fin de determinar el control in vitro del crecimiento bacteriano por su accesibilidad y en relación a la función primordial de los PMN (fagocitosis) - y dentro de ello, estudiar el sistema de peroxidación como representante de los mecanismos dependientes de oxígeno, -- que son necesarios para la degradación del material ingerido. Debe de establecerse una comparación entre células de pacientes con CaCU y de controles normales puesto que ello ha de definir las condiciones óptimas de análisis y las posibles alteraciones existentes en cuanto a la presencia y función de las células en estudio.

MATERIAL.

Cajas de Petri de 10 cm de diametro

Tubos de ensayo 13 x 100 mm

Tubos de ensayo 15 x 100 mm

Tubos con tapón de rosca 15 x 125 mm

Microtubos Eppendorf de polipropileno 1.5 ml.

Jeringas de 5, 10, 20 ml

Ahujas 15 x 125

Gradilla

Pipetas Pasteur 2" de largo

Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 ml

Pipeta de Thoma para glóbulos blancos.

Pipetas automáticas 0.05 0.2, 0.25 y 1 ml (GILSON)

Mechero Bunsen

Camara de Neubauer

Cubreobjetos 22 x 22 mm

Cubreboca

Portaobjetos

Celdas para espectrofotómetro

Matraces

Embudos

Papael de Estrasa

Algodón

Marcador

Papel aluminio.

EQUIPO.

Estufa de 0 a 100 °C Lab-Line

Refrigerador Acros

Congelador de 0 a -20 °C American

Congelador de 0 a -76 °C ULTRA COLD.

Centrifuga clínica Solbat 115

Centrifuga refrigerada DAMON/ICE

Espectrofotómetro Bausch-Lomb espectral 20

Potenciómetro Beckman SS-3

Microscopio óptico Zeiss

Vortex - Genie

Baño María 0 a 100 °C Thelco

Balanza analítica Mattler

Balanza granataria OHAUS

Balanza granataria de dos platillos OHAUS

Agitador magnético Megnestir

Destilador BARNSTEAD

Autoclave.

MATERIAL BIOLOGICO.

Cepas bacterianas.

Escherichia coli invasiva.- Inóculo original donado por el departamento de Bacteriología Medica de la E. N. C.B. del I. P. N., Fué aislada de liquido cefalorraquideo de un niño de un año y caracterizada como invasiva (9001 se rotipo 01. KI : H7).

Escherichia coli no invasiva.- Inóculo original donado por el cepario de la E. N. C. B. del I, P. N., Fué caracterizada como no invasiva (002-0119 B) por el personal del propio cepario.

Muestras de sangre periférica de pacientes con -- cáncer cérico uterino proporcionadas por el departamento de Cobaltoterapia del Hospital de la Mujer de la S, S, A. Muestras de sangre periférica de personal sanas que sirvieron como controles normales. Estas personas fueron mujeres - aparentemente libres de cualquier condición patológica que pudiese involucrar una alteración del sistema inmune. Estas muestras de sangre fueron tomadas y procesadas como se describe en la sección de Métodos.

MÉTODOS.

I.- Preparación del Inóculo bacteriano.

En condiciones de estricta esterilidad se sembró la bacteria en cajas de Petri con agar soya tripticaseina -- (AST) incubándose a 37 °C por 24 h . Las colonias mejor aisladas se sembraron en tubos con 5 ml de caldo soya Triptica-seina (CST) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Este crecimiento bacteriano se transfirió a un matraz con 50 ml de CST al 5 % de glicerol mezclándolo perfectamente y se repartió en alícuotas de aproximadamente 1 ml en tubos pequeños esteriles con tapón (microtubos eppendorf de polipropileno con capacidad de 1.5 ml), etiquetándolos y almacenándolos en el congelador a -70 °C hasta su utilización.

II.- Método para determinar el efecto microbicida "in vitro" del sistema de peroxidación PR-H₂O₂-Cl⁻,

Reactivos.

- 1.- Peroxidasa de rábano (PR). En una concentración de 1 µg por ml, (Sigma de México P-8375).
- 2.- Solución de glucosa 0,75 mM,
- 3.- Solución de cloruro de sodio 100 mM.
- 4.- Regulador de acetatos pH 5, 0,05 M.
- 5.- Peroxido de Hidrógeno 1 mM preparado al momento de utilizarse.
- 6.- Peroxidasa de rábano inactivada (PRI)(Sigma de

México P- 8375). Se inactivó en baño María a ebullición durante 30'.

7.- Escherichia coli invasiva cultivada a 37 °C - de 16 a 18 h antes en CST, fué ajustada a una densidad óptica de 0.1 a una longitud de onda de 620 nm y diluida 1:5 justo antes de utilizarla.

8.- Agua desionizada.

9.- Solución de Alsever.

10.- Agar soya tripticaseina (AST). (DIBICO).

11.- Caldo soya tripticaseina (CST). (DIBICO).

En condiciones estériles se montaron los siguientes tubos mezcla de reacción (TMR) por duplicado perfectamente etiquetados.

1, 2 Controles .- Con 0,5 ml de bacteria

3, 4 H₂O₂. .- 0.1 ml de H₂O₂.

5, 6 PRi .- 0.1 ml de PRi

7, 8 PR .- 0.1 ml de PR

9, 10 Sistema .- 0.1 ml de PR, 0.1 ml de H₂O₂.

A todos los tubos se le agregaron 0.7 ml de solución de glucosa 75 mM; 0.1 ml de cloruro de sodio 1 mM -- 0.05 ml de la suspensión de bacteria. El volumen final de cada tubo mezcla de reacción se ajustó a 2 ml en todos los casos con H₂O desionizada. Los TMR se incubaron a 37 °C durante 30' en baño María. Después se efectuaron tres diluciones con Alsever; la última dilución se sembró por vaciado -

en placa con AST.

Se sembraron dos diferentes volúmenes (200 y 400 μ l) por triplicado. Las placas se dejaron solidificar y se incubaron a 37 °C por 18 h. Pasado el tiempo de incubación se realizó la cuenta viable por placa y se calculó el número total de colonias bacterianas, que estuvieron presentes en cada TMR. en la siguiente forma: $N(F)(2) =$ bacterias en 2 ml.

Donde N= al número de colonias bacterianas obtenidas por placa.

F= Factor de dilución y multiplicado por 2 porque es el volumen final de cada TMR.

Finalmente se calculó el porcentaje de inhibición de cada TMR en relación a los tubos control.

III.- Obtención de leucocitos humanos de sangre periférica.

Se tomaron 15 ml de sangre por punción venosa con una jeringa de 20 ml la cual se preparó previamente con 5 ml de dextrana al 6 % en Alsever. Se homogeneizó y se dejó sedimentar aproximadamente 45' a 37 °C. Se separó el plasma del paquete eritrocitario y se centrifugó a 500 xg durante 10' a 4 °C para separar el paquete leucocitario, eliminando el sobrenadante. El botón leucocitario se resuspendió en Alsever y se lavó centrifugando nuevamente a 500 x g por 10' y se realizaron dos lavados más. Al eliminar el sobrenadante -

se dió un choque hipotónico con agua destilada, resuspendiendo cuidadosamente por 30". Pasado el tiempo se restauró la isotonicidad aforando el tubo con medio TC-199 y se centrifugó a 500 x g para eliminar el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 2 ml de solución salina isotónica y se tomó una pequeña alícuota para realizar la cuenta viable. Se aforó con medio y se volvió a centrifugar a 500 x g por 10'. El botón celular se resuspendió en 2 ml de medio TC-199 y esta suspensión fue la que se utilizó. La cuenta viable se determinó mediante la exclusión de azul tripano.

IV.- Obtención del suero.

Se obtuvieron 6 ml de sangre por punción venosa, con una jeringa de 10 ml sin anticoagulante y se colocó en un tubo de 13 x 100 mm. Se incubó durante 20' a 37 °C y posteriormente se separó el coágulo de la pared del tubo y se incubó a -4 °C. Después se centrifugó a 1400 x g durante 15'. Se separó el suero, colocándolo en 2 tubos con la misma cantidad cada uno de ellos. El contenido de uno de los tubos se descomplementó a 56 °C por 30' en baño María. La otra parte del suero se utilizó activo. Además se realizó un frotis de sangre periférica total para la diferencial de cada una de las muestras, tiñendolas con el colorante Wright-Giemsa.

V.- Método para determinar el efecto bactericida de leucocitos humanos.

Reactivos.

1.- Medio TC-199

2.- Suero activo (suero) de pacientes y donadoras sanas.

Suero descomplementado (suero d). Descomplementado a 56 °C durante 30' en baño María, tanto de pacientes con -- CaCU como de donadoras sanas.

4.- Células viables de pacientes y donadoras sanas

5.- Caldo soya Trypticaseina (CST).

Agar Soya Trypticaseina (AST).

7.- Escherichia coli invasiva previamente cultivada en CST, a 37 °C entre 16 y 18 h antes y ajustada a una -- densidad óptica de 620 nm y diluida 1:5 justo antes de utilizarla. Se eligió E. coli invasiva debido a la importancia que tiene desde el punto de vista médico además de ser una bacteria manejable en el laboratorio.

En condiciones estériles se prepararon los siguientes tubos mezcla de reacción (TMR), para analizar la actividad de suero y células tanto de pacientes en estudio como de personas que sirvieran como controles normales.

1, 2 Controles

3, 4 Suero d .- 0.2 ml de Suero d

5, 6 Suero .- 0.2 ml de Suero

- 7, 8 Suero d más .- 0.2 ml de Suero d más 2×10^6
células células.
- 9, 10 Suero más .- 0.2 ml de Suero más 2×10^6
células células.

A todos los TMR se les adicionó 1 ml del medio -- TC-199 y el volumen final de cada TMR se ajustó a 2 ml con el volumen necesario de medio TC-199. Los TMR se incubaron a 37 °C durante 70'. Posteriormente se dió choque leucocitario a 0.2 ml de cada MR en 2 ml de agua destilada por 10'. Después de este tiempo se realizaron 3 diluciones 1:11 con agua destilada, a cada TMR. La última dilución de cada TMR se sembró por vaciado en placa. con AST. Se sembraron dos diferentes volúmenes 200 y 400 μ l por duplicado cada uno de ellos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h y se realizó la cuenta viable bacteriana, calculando el número de colonias bacterianas en cada TMR analizado. Después se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de cada MR con respecto a los tubos control.

VI.- Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Fundamento.- Se postula que intervienen dos reacciones. Una interacción inicial de la proteína y los iones Cu en medio alcalino y una reducción de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y azul de molibdeno respectivamente. Esta reducción se debe a la acción del complejo proteínacobre.

Reactivos.

1.- Mezcla de reactivos, 1 ml de tartrato de sodio al 2 %, 1 ml de sulfato de cobre al 1 % y 100 ml de carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0.1 N.

2.- Reactivo de fenol (Folin-Ciocalteu, Sigma de México).

3.- Ovoalbúmina (200 mg por ml en solución salina isotónica).

La prueba se realizó por duplicado en tubos 13 x 100 mm. Se colocaron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 1.0 ml de la solución de ovoalbúmina para la determinación de la curva estándar. En otros tubos se colocaron las alícuotas correspondientes a 1.0×10^6 células de cada muestra problema. Todos los tubos se llevaron a un volumen final de 1.0 ml con solución salina isotónica. A cada tubo se le agregaron 3 ml de la mezcla de reactivos, se agitó en el vortex y se le dejó reposar 10'. Después se adicionaron a cada tubo 0.3 ml del reactivo de fenol, se agitaron y se dejaron reposar 30' más. Finalmente se leyó cada tubo contra el blanco de reactivos a una longitud de onda de 600 nm.

VII.- Determinación de la actividad de la mieloperoxidasa de leucocitos humanos por el método de la ortodianicidina.

Reactivos.

1.- Regulador de acetatos 0.1 M pH 5.

2.- Ortodianicidina 0.02 M (Sigma de México D-3252)

- 3.- Peroxido de hidrógeno 0.3 M
- 4.- Peroxidasa de rábano en una concentración de 230 ng por ml (Sigma de México P-8375).
- 5.- Acido tricloacetico al 40 %.
- 6.- Dioxano.
- 7.- Agua destilada.

La prueba se realizó por duplicado en tubos 15 x 100 mm. A todos los tubos se les añadió 0.3 ml de regulador de acetatos, 0.05 ml de ortodianicidina 0.02 M y 0.1 ml de peroxido de hidrógeno. Los primeros tubos fueron los blancos por lo que el volumen final se ajustó a 2.5 ml con agua destilada. A los siguientes tubos se les añadió 0.1 ml de la solución de peroxidasa de rábano. Al resto se les adicionó el volumen correspondiente a 0.5×10^6 leucocitos de las muestras que se analizaron. El volumen final se ajustó a 2.5 ml con agua destilada y los tubos se incubaron en baño María a 37 °C durante 20'. Después a cada tubo se le agregó 0.5 ml de ácido tricloacético al 40 % y se le centrifugó a 1400 x g durante 15'. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se añadió 3 ml de dioxano a cada uno de los tubos, que fueron entonces agitados y centrifugados a 1400 x g durante 15'. Finalmente se leyó el sobrenadante a una longitud de onda de 460 nm.

Los resultados serán analizados empleando la prueba "t" de Student para datos paramétricos ⁽³⁾, así como la prueba "U" de Mann-Whitney para datos no paramétricos ⁽⁶⁾.

RESULTADOS

Con el fin de comprobar el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano llevado a cabo por el sistema de la mieloperoxidasa decidimos analizar las diferentes variables involucradas. Así se probó el efecto del peróxido de hidrógeno, de diferentes concentraciones de peroxidasa de rábano (PR) y la suma de ambos junto con el haluro (Cl) en lo que constituiría propiamente el sistema de peroxidación in vitro. Además se observó si había cambios en la actividad de PR inactivada (PRi) por ebullición en baño María durante 30' y las pruebas se practicaron con dos cepas de Escherichia coli. Una de las cepas fué clasificada como invasiva (tabla 1) y la segunda fué considerada no invasiva (tabla 2) de acuerdo con las características expuestas en material y métodos.

Como puede apreciarse el efecto más consistente está dado por el peróxido de hidrógeno por sí solo (a la concentración de 1×10^{-5}) y por el sistema propiamente dicho. El sistema incluye, como mencionamos anteriormente, al H_2O_2 y PR a concentraciones semejantes a las que se utilizaron para probarlas solas, además de Cl^- a una concentración de $1 \times 10^{-2}M$.

Así pudimos verificar la actividad del sistema de peroxidación para lograr el control del crecimiento bacteriano. El efecto de dicho sistema fué más notable en el caso de la E. coli no invasiva, como era de suponerse por su menor --

agresividad, El sistema tuvo incluso un efecto más marcado contra la E. coli no invasiva que el que tuvo el H_2O_2 y el sistema contra la E. coli invasiva, ($P < 0.05$) a concentraciones similares.

Para estudiar la relación bacteria-célula fué -- que se realizaron los experimentos mostrados en la tabla 3 con células normales, que se incubaron durante 45' con E. coli invasiva. Posteriormente se desarrollaron también algunos experimentos en condiciones semejantes con células provenientes de sangre periférica de pacientes con CaCU (tabla 4). El porcentaje de inhibición observado tendió a ser un tanto más consistente cuando se agregaban células a la concentración de 2×10^6 , motivo por el cual se decidió tomar esta concentración para los siguientes experimentos. Sin embargo es posible observar entre las células tanto de personas sanas como de enfermas, la ausencia de efecto contra una o las 2 cepas, aún a pesar del incremento de la concentración celular y la consecuente disminución de la relación bacteria-célula. En contradicción con los resultados anteriores (tabla 1 y 2), del sistema de peroxidación libre de células, estas últimas pruebas si incluyen células, la cepa de E. coli invasiva resultó con aparente mayor sensibilidad que la no invasiva.

Al analizar el efecto de células normales (tabla 5) y de pacientes con CaCU (tabla 6) sobre el crecimiento -

bacteriano, con E. coli invasiva, a la concentración de 2×10^6 células y 45' de incubación, se observó que las células normales no ejercieron un efecto significativamente mayor ($P > 0.05$) que el suero autólogo descomplementado, por sí solo. La adición de suero autólogo descomplementado no incrementó tampoco el efecto dado por las células solas. La --- inhibición de crecimiento bacteriano realizado por las células de pacientes con CaCU fué notoriamente menos importante si bien sin alcanzar significancia estadística con respecto a las células normales. Además el efecto dado por las células de pacientes con CaCU tampoco resultó estadísticamente diferente ($P > 0.05$) del dado por el suero autólogo descomplementado que fué a su vez incapaz de incrementar el porcentaje de inhibición, en combinación con las células.

Cuando la incubación de los tubos mezcla de reacción se extiende hasta 70' el efecto de las células se minimiza puesto que en la mayoría de los casos tanto los leucocitos normales (tabla 7) como los de los pacientes con CaCU -- (tabla 8) no tienen efecto por sí solos sobre el crecimiento bacteriano. El efecto mediado por el suero autólogo inactivado solo, es esencialmente el mismo que el de las células, si bien hay algunos casos en los cuales se potencia el efecto dado por la combinación de suero descomplementado más células. El único factor que muestra un efecto consistente tanto en el caso de células de personas normales como de pacientes

con CaCU es el suero fresco o activo que controla de forma importante y significativa ($P < 0.05$) el crecimiento bacteriano con respecto a los otros casos.

En la tabla 9 podemos observar el resultado de tiempos variables de incubación (entre 20 y 120') de E. coli invasiva con diferentes combinaciones de suero y células. Ello se hizo con el objeto de encontrar las condiciones óptimas para hacer evidente el control del crecimiento bacteriano por leucocitos humanos normales.

En algunos casos se puede apreciar los cambios que constituirían propiamente una cinética sujeta a las características propias del crecimiento bacteriano y su limitación por las diferentes variables, en los tiempos estudiados.

En los experimentos que se muestran en la tabla 9 se ha pretendido demostrar la capacidad de las células PMN normales (que son la mayoría de los leucocitos en sangre periférica) individualmente y apoyada por la presencia de suero autólogo para controlar el crecimiento bacteriano por mecanismos que claramente se deben la actividad fagocítica y/o citotóxica de células PMN; dadas las condiciones del ensayo.

En la tabla 10 se ilustra el caso individual de las células de un sujeto sano que han sido estudiadas para mostrar la cinética de que hablamos entre 20 y 90' de incu

bación con las bacterias y cuyo resultado es expresado en terminos de inhibición del propio crecimiento bacteriano. Como se puede apreciar el efecto de las células por sí solas que alcanzan su máximo a los 45' es en realidad poco notable, el efecto del suero, en cambio es más importante y alcanza su máximo a los 70' utilizandolo tanto fresco como descomplementado. Un hecho interesante es el incremento que se vé en el efecto inducido por las células en presencia de suero fresco a los 70' de incubación. Tratando de demostrar un efecto debido a la opsonización en estos casos de suero más células es que se incluyó el suero descomplementado más células en pruebas paralelas, sin embargo los datos obtenidos no son concluyentes y no nos permiten descartar que el efecto observado se deba exclusivamente a la acción lítica del suero por anticuerpos, o la suma de ambos por separado,

Precisamente para hacer claramente evidente el efecto del suero fresco es que se presenta la grafica 1, con los resultados de evaluaciones de la actividad inhibitoria por el suero proveniente de varios individuos sanos. Como se puede ver dicho efecto se incrementa gradualmente hasta los 70' de incubación para despues disminuir drasticamente,

Cuando se determinó la actividad de la MPO mediante el método de la Ortodianicidina en leucocitos totales de sangre periferica de pacientes con CaCU se encontró que no había diferencias significativas en cuanto a las cifras ob-

servadas en las donadoras normales (tabla 11 y 12) sin embargo, se pudo observar que hubo varias pacientes en las cuales se determinaron cifras anormales en cuanto a la actividad de MPO ya sea por cifras totales o relativas.

En las tablas 13 y 14 se pueden observar las cuentas diferenciales y totales de leucocitos de sangre periférica de donadoras sanas y de pacientes con CaCU respectivamente. Analizando ambos grupos no se encontro diferencia significativa ni entre las cuentas diferenciales ni entre las cuentas totales de las poblaciones celulares. Sin embargo hay que señalar que existen alteraciones en algunos datos de pacientes con CaCU como en el caso de la paciente 4 la cual tiene una leucopenia y una linfopenia muy marcada.

Tabla 1.- Efecto del sistema de peroxidación contra E. coli invasiva a 30' de incubación.

Experimento	Control (a)	% de inhibición debido a			
		H ₂ O ₂ (b)	PRi (c)	PR (d)	Sistema (e)
1	18.5	0.0	0.0	0.0	28.0
2	27.2	0.0	---	---	17.1
3	14.5	25.8	20.7	0.0	16.5
4	10.5	16.5	0.0	0.0	12.0
5	1.5	9.5	0.0	6.5	0.0
6	2.0	23.2	17.1	13.7	16.0
7	1.8	0.0	0.0	0.0	19.0
8	2.2	13.7	---	---	47.8
9	1.9	5.3	---	---	23.7

(a).- Número de colonias bacterianas x 10⁶ en los controles, con tadas despues de 18 h de incubación a 37 °C. (b): La concentra ción de H₂O₂ en los TMR es igual a 1 x 10⁶ M. (c): Peroxidasa de rábano inactivada en baño Marfa a ebullición durante 30' a -- una concentración de 230 ng / ml en cada TMR. (d): Peroxidasa de rábano activa, a una concentración de 230 ng / ml en cada TMR (e): Sistema de peroxidación PR-H₂O₂-Cl⁻ donde la concentración del Cl⁻ es de 1 x 10⁻² M y la concentración de los otros dos com ponentes es igual a la utilizada para evaluarse por sí solos.

Tabla 2.- Efecto del sistema de peroxidación contra E. coli no invasiva a 30' de incubación

Experimento	Control (a)	% de Inhibición debido a			
		H ₂ O ₂ (b)	PRi (c)	PR (d)	Sistema (e)
1	8.2	65.7	0.0	0.0	83.9
2	19.8	0.0	---	---	23.0
3	12.7	8.3	40.1	37.7	28.7
4	7.4	35.2	0.0	0.0	0.0
5	1.5	42.0	61.3	84.0	55.0
6	1.8	22.3	22.3	25.0	36.2
7	5.0	0.0	55.5	0.0	23.3
8	1.8	0.0	8.4	27.0	41.7
9	1.4	21.5	21.5	11.5	82.5

(a).- Número de colonias bacterianas x 10⁶ en los controles, -- contadas después de 18 h de incubación a 37 °C, (b): La concentración de H₂O₂ en los TMR es igual a 1 x 10⁶ M. (c): Peroxidasa de rábano inactivada en baño María a ebullición durante - 30' a una concentración de 230 ng / ml en cada TMR. (d): Peroxidasa de rábano activa, a una concentración de 230 ng / ml - en cada TMR. (e): Sistema de peroxidación PR-H₂O₂-Cl⁻ donde la concentración del Cl⁻ es de 1 x 10⁻² M y la concentración de -- los otros dos componentes es igual a la utilizada para evaluarlos por sí solos.

Tabla 3.- Concentración diferente de células normales frente a E. coli a 45' de incubación.

		número de células			
		Control (a)	1.5×10^6	2×10^6	4×10^6
			*	*	*
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	---	58.8	59.9
	E. coli no inv.	2.7	---	9.3	---
4	E. coli	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 en los controles $\times 10^6$ contadas en las placas después de 18 h de incubación a 37 °C

*.- Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano con respecto al control.

Tabla 4.- Concentracion diferente de células de pacientes con CaCU frente a E. coli a 45' de incubación.

	Con. (a)	Número de células				
		0.5×10^6	1×10^6	1.5×10^6	2×10^6	4×10^6
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	---	---	---
B. 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	36.7
7 E. coli inv.	2.0	---	---	---	7.0	2.5

(a): Número de colonias bacterianas $\times 10^6$ en los controles, contadas en las placas después de 18 h de incubación a 37 °C.

* : Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano con respecto al control.

Tabla 5.- Células normales frente a E. coli invasiva a 45' de incubación.

Normales	Control (a)	% de Inhibición debido a		
		Células (b)	Suero d (c)	Células + Suero d
1	5.1	65.1	---	---
2	3.0	58.8	---	---
3	1.4	0.0	---	---
4	2.0	12.5	---	---
5	1.0	67.0	63.7	62.7
6	3.7	71.7	0.0	76.3
7	2.2	11.6	0.0	0.0
8	1.4	8.0	0.0	35.0
9	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	0.0	0.0	0.0
14	1.4	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	30.3	51.0
19	3.2	18.0	25.0	27.0

(a): Número de colonias bacterianas x 10⁶ en los controles contadas en las placas despues de 18 h de incubación a 37 °C .

(b): 2 x 10⁶ células colocadas en la MR, (c): Suero fresco descomplementado en baño María a 56 °C durante 30'

Tabla 6.- Células de pacientes con CaCU frente a E. coli invasiva a 45' de incubación.

Pacientes	Control (a)	% de Inhibición debido a		
		Células (b)	Suero d (c)	Células + Suero d
1	5.1	52.4	---	---
2	3.0	30.0	---	---
3	1.4	0.0	---	---
4	2.0	7.0	---	---
5	0.9	83.7	0.0	22.1
7	2.2	0.0	0.0	0.0
8	2.7	0.0	0.0	0.0
9	0.7	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 $\times 10^6$ en los controles, contadas en las placas después de 18 h de incubación a 37 °C. (b): 2×10^6 células colocadas en la MR. (c): Suero fresco descomplementado en baño María a 56 °C durante 30'.

Tabla 7.- Células normales frente a E. coli invasiva a 70' de incubación.

Normales	(a) Control	% de Inhibición debido a				
		(b) Células	(c) Suero	(d) Suero d	Células + Suero	Células + 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	27.4	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	96.4	24.0	97.3	11.1

(a): Número de colonias bacterianas x 10⁶ en los controles, contadas en las placas después de 18 h de incubación a 37 °C

(b): 2 x 10⁶ células colocadas en la MR. (c): Suero fresco

activo. (d): Suero fresco descomplementado en baño María a 56 °C durante 30'

Tabla 8.- Células de pacientes con CaCU frente a E. coli invasiva a 79' de incubación.

Pacientes	(a) Control	% de Inhibición debido a				
		(b) Células	(c) Suero	(d) Suero d	Células + Suero	Células + Suero d
13	7.9	0.0	77.8	0.0	8.0	90.8
14	60.5	69.6	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 $\times 10^6$ en los controles, contadas en las placas despues de 18 h de incubación a 37 °C

(b): 2×10^6 células colocadas en la MR. (c): Suero fresco activo, (d): Suero fresco descomplementado en baño María a 56 °C durante 30'.

Tabla 9.- Cinética bacteriana a diferentes tiempos.

T ^(a)	N ^(b)	(c) Control	(d) Células	Suero	(e) Suero d	Células + Suero	Células + Suero d
20'	1	3.3	65.0*	---	57.0*	71.0*	---
	2	1.2	13.8	---	10.4	0.0	---
	3	0.6	12.5	---	16.7	0.0	---
	4	1.8	40.6	20.6	4.5	0.0	32.2
	5	1.4	54.2	14.9	38.8	44.7	36.8
	6	1.3	25.2	11.8	19.3	24.5	31.9
	7	1.2	20.6	24.0	33.1	44.7	10.8
45'	2	2.1	18.6	---	0.0	14.1	---
	3	0.8	11.6	---	20.2	8.6	---
	6	3.4	35.9	30.3	40.3	56.8	50.9
	7	3.2	18.8	3.8	25.1	50.0	26.9
70'	1	4.9	37.7	---	57.0	62.0	---
	3	1.4	10.8	---	16.0	23.0	---
	4	8.3	23.5	77.7	25.1	91.4	52.1
	5	6.3	0.0	89.2	0.0	94.6	17.3
	6	14.8	71.9	72.4	65.4	62.2	66.2
	7	8.8	54.6	72.8	44.4	78.0	31.9
90'	4	15.2	21.7	97.2	40.7	92.4	50.0
	5	8.4	0.0	78.0	---	93.3	---
120'	3	12.3	---	---	52.9	---	63.5

(a): Tiempos de incubación de los TMR en minutos, (b): Sujetos normales, (c): Número de colonias bacterianas x 10⁶, en los 2 ml de la mezcla control, contadas en las placas después de 18 h de incubación a 37 °C. (d) : 2 x 10⁶ células colocadas en la MR, (e): Suero fresco descomplementado en baño María a 56 °C durante 30' .

* :Porcentaje de inhibición bacteriana en relación a los controles.

Tabla 10.- Inhibición de E. coli invasiva por leucocitos humanos.

T ^(a)	Control ^(b)	% de Inhibición debido a			Células + Suero	Células + Suero d
		Células ^(c)	Suero ^(d)	Suero d ^(e)		
20'	1.3	25.2	11.5	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): Tiempo de incubación de los tubos MR, en minutos. (b): Número de colonias bacterianas $\times 10^6$, en los 2 ml de la mezcla control, -- contadas en las placas, despues de 18 h de incubación a 37 °C. --
(c): 2×10^6 células colocadas en cada MR, (d): Suero fresco activo
(e): Suero fresco descomplementado en baño María a 56 °C durante 30'.

Tabla 11.- Actividad de peroxidasa en células de pacientes con CaCU (a).

Pacientes (b)	Proteína (c)	UE (d)
1	64.2	3.1
2	15.7	12.0
3	47.4	5.4
6	18.3	7.0
7	56.3	5.3
8	139.3	7.9
9	71.1	2.5
10	96.0	9.8
11	95.0	16.3
12	52.5	8.8
14	86.9	4.4
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	13.2
23	135.6	5.0
\bar{x}	64.3	8.3
σ	36.9	5.0

(a): Determinada por el método de la Ortodianicidina, (b): Número de pacientes de quien provienen los leucocitos totales de sangre periférica. (c): Concentración de proteína en 0.5×10^6 leucocitos totales, determinada por el método de Lowry. (d): Unidades - específicas de actividad enzimática en 100 g de proteína .

Una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un cambio de 0.1 en la densidad óptica - resultante bajo las condiciones del ensayo (28).

Tabla 12.- Actividad de peroxidasa en células normales (a).

Normales (b)	Proteína (c)	UE (d)
6	97.8	5.5
7	100.7	3.0
9	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	107.8	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	4.1
28	31.3	10.9
29	81.2	9.7
30	66.2	3.1
31	27.8	5.7
32	25.4	5.1

\bar{x} 71.7 6.2

σ 29.7 3.3

(a): Determinada por el método de la Ortodianicidina. (b): Número de las personas de quien provienen los leucocitos - totales de sangre periférica, (c): Concentración de proteína en 0.5×10^6 leucocitos totales, determinada por el método - de Lowry. (d): Unidades específicas de actividad enzimática en 100 g de proteína.

Una unidad de proteína es la cantidad de enzima necesaria para producir un cambio de 0,1 en la densidad óptica resultante bajo las condiciones del ensayo (28).

Tabla 13.- Cuentas diferenciales de controles normales.

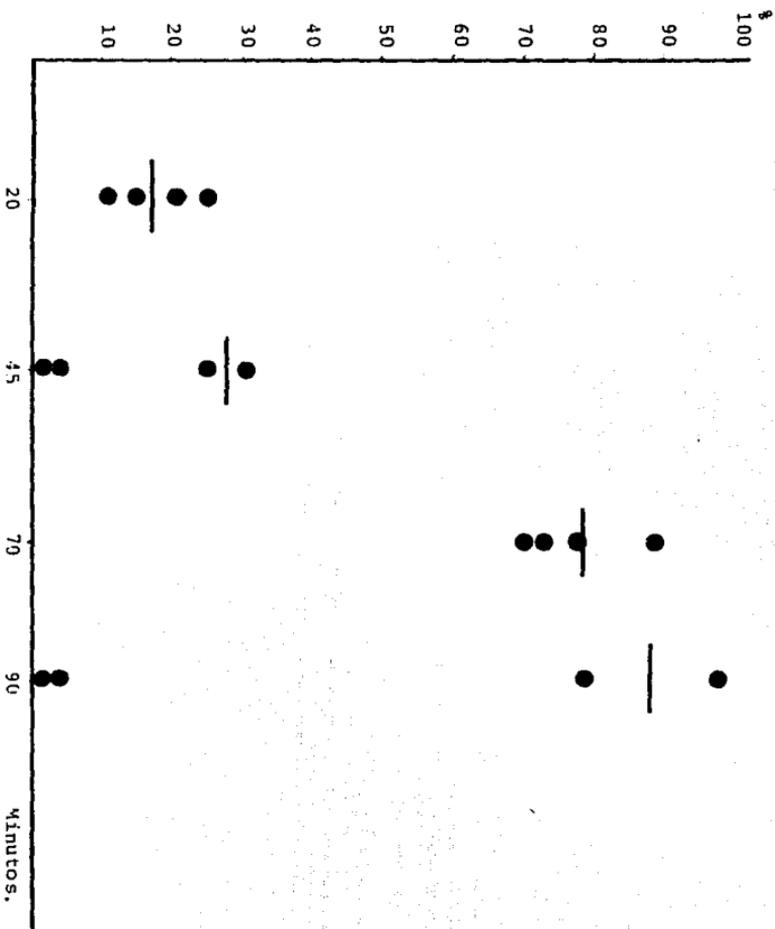
N	Cuentas porcentuales *						Cuentas totales °		
	L	Ne	M	E	Bs	Bn	Le/mm ³	Lt	Net
2	62	33	1	0	4	0	4400	2728	1452
3	60	38	2	0	0	0	10760	6456	4089
4	37	53	4	4	2	0	4100	1517	2173
6	51	47	1	0	0	1	8046	4103	3782
7	21	65	8	3	0	3	7186	1509	4671
8	32	58	4	5	1	0	5850	1872	3393
9	35	59	2	1	0	3	3391	1187	2001
11	62	35	1	1	0	1	6783	4205	2374
12	59	33	2	6	0	0	5918	3492	1953
13	46	53	0	0	1	0	9310	4283	4934
14	88	10	1	1	0	0	4089	3598	409
15	20	75	3	0	0	2	6916	1383	5187
17	55	41	3	0	0	1	2726	1499	1118
18	66	33	1	0	0	0	8113	5354	2677
19	20	76	2	2	0	0	4989	997	3790
20	69	31	0	0	0	0	7182	4955	2226
21	25	74	1	0	0	0	8711	2178	6446
24	27	68	3	2	0	0	1795	484	1221
25	50	47	3	0	0	0	5786	2893	2719
26	27	67	3	2	0	1	6858	1849	4589
27	47	46	3	2	1	1	6916	3250	3181
28	28	69	0	2	0	1	5885	1675	4130
29	50	47	2	0	0	1	6583	3291	3094
30	66	28	2	2	0	2	4788	3160	1340
\bar{x}	46	49	2	1.4	0.4	0.7	6132	2830	3039
σ	20	17	1.5	1.5	0.8	0.8	2116	1528	1505

* :Leídas en frotis de sangre periférica teñidas con colorante de Wright-Giemsa. ° : Obtenidos de acuerdo al procedimiento - descrito en la sección de métodos, L: Linfocitos, Ne:Neutrofilos. M: Monocitos. E: Eosinofilos. Bs: Basófilos. B: Bandas Le: Leucocitos. Lt: Número total de linfocitos. Net: Número total de neutrofilos, N: Número de las donadoras control,

Tabla 14.- Cuentas diferenciales de pacientes con CaCU.

P	Cuentas porcentuales *						Cuentas totales °		
	L	Ne	M	E	Bs	Bn	Le/mm ³	LT	Net
1	22	75	0	1	1	2	10600	2332	7950
2	18	61	8	13	0	0	11866	2136	7238
3	23	56	12	8	0	1	3685	847	2064
4	6	96	2	1	0	0	2600	156	2366
5	17	51	6	23	1	2	2859	486	1458
6	38	56	3	2	0	1	12435	4725	6964
7	21	69	8	2	0	0	3857	810	2661
8	27	72	1	0	0	0	4721	1274	3399
9	35	64	1	0	0	0	3059	1071	1958
10	24	74	0	0	0	2	5383	1292	3983
11	54	41	1	1	0	3	5383	2906	2207
12	54	38	6	1	0	1	5586	3016	2123
14	23	76	0	0	1	0	2726	627	2072
16	50	40	5	2	0	3	7647	3823	3059
17	30	63	3	2	1	1	5373	1612	3385
\bar{x}	29	62	4	4	0,3	1	5852	1808	3526
σ	14	15	3,5	6	0,4	1	3307	1324	2111

* :Leidas en frotis de sangre periferica teñidas con colorante de Wright-Giemsa. ° :Obtenidos de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de métodos. P :Número de la paciente. L: Linfocitos. M: Monocitos, E: Eosinofilos -- Bs: Basófilos. Bn: Bandas. Le: Leucocitos. Lt: Número total de linfocitos. Net: Número total de neutrofilos.



Gráfica I.- Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* invasiva logrado por suero fresco de personas normales a diferentes tiempos de incubación.

DISCUSION.

En este trabajo se ha abordado el estudio de un esquema complejo de interacciones de la respuesta inmune inespecífica dirigido a la observación del comportamiento de leucocitos polimorfonucleares de pacientes con cáncer cérvico uterino. Para ello se trató de estudiar el efecto que estas células pueden manifestar sobre la proliferación bacteriana. Así pues; se montó un modelo in vitro para estudiar el control que sobre el crecimiento bacteriano tenían los leucocitos solos o en presencia del suero. Ello se practicó con la intención de abundar en la función característica de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), que consiste en fagocitar material antigénico y extraño al organismo, con el fin de iniciar y posteriormente amplificar la respuesta inmune. Con el mismo propósito se practicó la determinación de mieloperoxidasa, que se encuentra fundamentalmente en los PMN.

Este trabajo se enfocó al estudio de PMN de pacientes con cáncer cérvico uterino por las razones expuestas en la introducción, que hablan de la importancia del padecimiento en nuestro medio. Por ello y basados en estudios anteriores donde se observó un exceso de leucocitos PMN en sangre periférica de dichas pacientes, fué que se hizo este trabajo con el fin de iniciar este tipo de estudios en la búsqueda de defectos enzimáticos o alteraciones celulares que contribuyan a in

crementar nuestro conocimiento sobre la relación existente entre la respuesta inmune y el desarrollo del carcinoma.

Las variables de un sistema de peroxidación fueron estudiadas en un sistema libre de células utilizando peroxidasa de rábano para ver el efecto que tenía sobre el crecimiento de 2 tipos de cepas de E. coli. Como se ha descrito, el efecto más definido estuvo dado por el sistema de peroxidación compuesto de H_2O_2 , peroxidasa de rábano y Cl^- , siendo tal efecto más marcado sobre la cepa bacteriana menos virulenta.

Posteriormente se trató de encontrar las condiciones óptimas en cuanto al número de células, relación bacteria-células y tiempos de incubación. Así, se escogió la concentración de 2×10^6 células, que fueron cultivadas por periodos variables de tiempo (45 y 70' los más efectivos) para buscar el efecto sobre bacterias ajustadas por densidad óptica previamente para que la relación se conservara entre 1 y 3 unidades formadoras de colonia por célula, al final del ensayo.

Sin embargo, pese a los diversos experimentos que se realizaron en un buen número de pacientes y de controles normales no fué posible finalmente encontrar diferencia perfectamente definida. Esto probablemente fué debido al rango de variación en el comportamiento de las células obtenidas de personas normales.

De cualquier manera, podemos afirmar que se verificó las condiciones de un sistema de peroxidación que resultó efectivo en el control del crecimiento bacteriano y se hizo evidente que este sistema es más efectivo que los componentes del mismo por sí solos. Se observó también que hubo diferencias en la susceptibilidad de las cepas bacterianas al sistema libre de células en comparación a aquel donde sí hubo participación celular, siendo esto esperable en virtud de que hay una gran cantidad de factores que podrían estar involucrados en este último caso.

Además se pudo observar que el suero autólogo descomplementado no fué efectivo en el control del crecimiento bacteriano. Tampoco hubo un efecto estadísticamente significativo de las células normales, en comparación al suero. Al comparar la actividad de células de personas normales con las pacientes con cáncer, si se observó una cierta tendencia a la menor efectividad de estas últimas para la inhibición del crecimiento bacteriano in vitro.

La relación de inhibición del crecimiento bacteriano con el tiempo de incubación llevado a cabo por el suero -- tanto de pacientes como de normales, es bien manifiesta, especialmente por los datos obtenidos en la cinética del ensayo.

En cuanto a la actividad de peroxidasa, tampoco se encontraron diferencias como grupo entre normales y pacientes. Sin embargo; hay varias pacientes cuyos datos se encuentran -

fuera de los límites normales. Lo mismo se puede afirmar en relación a las cuentas diferenciales, donde de nuevo no hay diferencia estadísticamente significativa como grupo pero - sí hay varias pacientes cuyos datos están definitivamente - fuera de los valores normales en los que se aprecia claramente la leucopenia y la linfopenia que se ha reportado repetidamente en asociación tanto del cáncer como de la radioterapia.

Así pues; podemos decir que con este trabajo iniciamos la búsqueda de las condiciones adecuadas para estandarización de pruebas para el estudio de la funcionalidad (fagocítica) y capacidad (enzimática) de células PMN de pacientes con cáncer cérvico uterino. Si bien no se ha podido demostrar claramente grandes diferencias entre normales y pacientes con cáncer, consideramos que se ha dado el primer paso para hacer evidentes posibles alteraciones que repercutan en la capacidad inmune de las enfermas y contribuyan a permitir la presencia de un tumor en coexistencia con una respuesta inmune inespecífica deficiente.

CONCLUSIONES.

1.- El control del crecimiento bacteriano no fué consistentemente realizado tanto por las células normales como de pacientes con CaCU. Sin embargo; el efecto de estas últimas fué notoriamente disminuido y no mejoró con la adición de suero autólogo.

2.- El efecto más intenso y constante dado por la células provenientes tanto de normales como de pacientes con CaCU estuvo dado por el suero autólogo fresco que manifiesta una curva de normalidad con un pico a los 70' de incubación.

3.- Se confirmó la eficacia del sistema de peroxidación en el control del crecimiento bacteriano de acuerdo al modelo utilizado.

4.- La concentración de MPO en leucocitos de pacientes con CaCU y controles normales es semejante bajo las condiciones del ensayo.

5.- No se puede demostrar correlación entre la capacidad de las células PMN y su contenido MPO.

6.- No hubo diferencia entre las cuentas de pacientes con CaCU y controles normales. Sin embargo algunas pacientes tienen cifras definitivamente anormales de células, tanto en el caso de leucocitos totales como de subpoblaciones de estos.

ANEXO.- Preparación de reactivos.

- Solución de Alsever:

Pesar los siguientes reactivos:

Glucosa 20.5 g

Citrato de sodio dihidratado 8.0 g

Acido cítrico monohidratado 0.55g

Disolver en un poco de agua destilada y llevar a 1 l de agua destilada, despues esterilizar a 10 lb de presión por 10'

-Dextrana al 6 % en Alsever.

Pesar 6 g de dextrana, disolver en 50 ml de Alsever finalmente esterilizar a 10 lb de presión por 10'.

-Solución salina isotónica (0.85 %)

Disolver 0.85 g de cloruro de sodio en 50 ml de agua destilada, Esterilizar a 15 lb de presión.

- Carbonato de sodio al 0.7 %.

Disolver 0.7 g de carbonato de sodio en un poco de agua destilada y llevar a un volumen final de 100 ml con agua destilada. Esterilizar a 15 lb de presión por 15'.

-Peroxidasa de rábano 1 μ g por ml (Sigma de México P-8375)

Pesar 0.003 g de peroxidasa de rábano y diluir en

3 ml de regulador de fosfatos 0.05 M, Ph 6.5.

- Regulador de fosfatos 0.05 M, pH 6.5.

Fosfato de sodio monobásico 0.05 M. Pesar 0.83379 g de fosfato monobásico, diluir en un poco de agua destilada y aforar a 100 ml de agua destilada.

Fosfato de sodio dibásico 0.05 M. Pesar 1.95709 g - de fosfato dibásico, disolver en un poco de agua destilada y aforar a 100 ml de agua destilada.

Una vez que se prepararon la soluciones, ajustar el pH a 6.5. Agregar gota a gota el fosfato de sodio monobásico al fosfato de sodio dibásico, agitando continuamente.

-Regulador de acetatos 0,05 M, pH 5

Acetato de sodio 0,05 M, Pesar 1.0255 g de acetato de sodio y aforar a 250 ml con agua destilada,

Acido acético glacial 0,05 M. Medir 0,075 ml de ácido acético (= 1.05 g por ml) y aforar a 250 ml con agua destilada.

Adicionar gota a gota el acetato de sodio al ácido acético glacial, con agitación continua, para ajustar a pH 5.

Solución de glucosa 0.75 M

Pesar 0.3375 g de glucosa y aforar a 25 ml de agua destilada.

- Solución de cloruro de sodio 100 mM.

Pesar 0.14625 g de cloruro de sodio y aforar a 25 ml con agua destilada.

- Peroxido de hidrógeno 1 mM.

Medir 0.1 ml de H_2O_2 al 30 % y diluir en 75 ml de agua destilada y posteriormente realizar 3 diluciones 1:10. Finalmente esterilizar a 15 lb de presión por 15'.

- Medio TC-199.

De la dilución concentrada de medio TC-199 (10X), realizar una dilución 1:10 con agua bidestilada estéril, ajustar el pH a 7.2 adicionando gota a gota carbonato de sodio al 0.7 % estéril. El vire de color amarillo a canela fué indicativo de la neutralidad.

- Líquido de Turk.

Medir 3 ml de ácido acético glacial y aforar a 100 ml con agua destilada y adicionar unas gotas de cristal violeta.

Colorante azul tripano 0.1 %.

Pesar 0.1 g de azul tripano, disolver en un poco de solución salina fisiológica y llevar a un volumen de 100 ml de la misma solución. Almacenar a temperatura ambiente para su uso.

- Colorante de Giemsa.

Pesar 0.5 g del colorante, disolver en 33 ml de gli
cerol en baño María entre 55 - 60 °C, posteriormente añadir -
33 ml de metanol. Agitar 15' cuatro veces diarias por 3 días.
Finalmente filtrar y almacenar en un frasco ambar.

Para su uso añadir una gota del colorante por 1 ml
de agua destilada.

- Hidróxido de sodio 0.1 N.

Pesar 4 g de hidróxido de sodio, disolver en un po
co de agua destilada con agitación continua y aforar a 1 li
tro de agua destilada.

- Peróxido de hidrógeno 0.3%.

Medir 0.17 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y di
luir en 4.83 ml de agua destilada.

- Tartrato de sodio y potasio al 2%.

Pesar 0.1 g de tartrato de sodio y potasio y diluir
en 5 ml de agua destilada.

- Sulfato de cobre pentahidratado al 1%.

Pesar 0.05 g de sulfato de cobre pentahidratado y -
disolver en 5 ml de agua destilada.

- Carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0.1 N.

Pesar 5 g de carbonato de sodio y disolver en 150 ml de hidróxido de sodio 0.1 N.

- Solución de ovoalbúmina a una concentración de 200 g por ml.

Pesar 0.2 g de ovoalbúmina y disolver en 1 ml de solución salina, posteriormente realizar dos diluciones 1:10.

- Ortodianicidina 0.02 N (Sigma de México D-3252).

Pesar 15.85 mg de ortodianicidina y disolver en 2.5 ml de agua destilada.

- Caldo de soya tripticaseina (DIBICO).

Pesar 1.5 g de caldo soya tripticaseina, rehidratar en 50 ml de agua destilada. Mezclar bien y esterilizar a 15 lb de presión durante 15'.

- Agar soya tripticasina (DIBICO).

Pesar 40 g del medio, rehidratar en 1 litro de agua destilada, mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1'. Después de que este bien disuelto distribuir en tubos 15 x 125 mm con tapón de rosca y esterilizar a 15 libras de presión durante 15'.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aguilar-Santelises, M., Immunología de tumores. Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología. 2: 29-35 (1984).
- 2.- Andrews, P. C. & Krinsky, N. I. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymatically active hemi-myeloperoxidase. J. Biol. Chem. 256: 4211-4218 (1981).
- 3.- Bancroft, H. Introducción a la bioestadística. (8a. ed) EUDEBA p. 205-216 (1974).
- 4.- Bakkenist, A.R., Wever, J.R., Vulman, T., Plat. H. & Van Golder, B. F. Isolation and properties of myeloperoxidase from human leukocytes. Biochem, Biophys. Acta 524: 45-54 (1978).
- 5.- Boggs, R. D. y Winkel, T. A. El leucocito (Ed. El Manual Moderno) p. 47-55 (1985).
- 6.- Campbell, R. C. Statistics for biologist (Cambridge University Press) 2a. edition. (1975).
- 7.- Clark, R. A. & Szot, S. The myeloperoxidase-hydrogen-halide system as effector of neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity; role of the peroxidase system, J. Immunol. 126: 1295-1301 (1981).
- 8.- Clark, R. A. & Klebanoff, S.J. Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system, J. Exp. Med. 141: 1442-1447 (1975).
- 9.- Clark, R. A. Klebanoff, S.J. Role of the myeloperoxidase H₂O₂-halide system in concanavalin A-induced tumor cell killing by human neutrophils. J. Immunol, 122: 2605-2601 (1979).

- 10.- Figueroa, M. y Rapp, F. Virus del herpes y cáncer humano. Bol. Of Sanit. Panam. 89: 308-321 (1980).
- 11.- Goetzl, E. J. & Austen, K.F. A neutrophil-immobilizing factor derived from leukocytes. I. Generation and partial characterization. J. Exp. Med. 136: 1564-1580 (1972).
- 12.- Goetzl, E.J., Gigli, L. S., Wasserman, S. & Austen, K. F. A neutrophil immobilizing factor derived from human leukocytes. II. Specificity of action on polymorphonuclear leukocyte mobility. J. Immunol. 111: 938-945 (1975).
- 13.- Goldstein, I. M. & Weissmann. Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocytes lysosomes. J. Immunol. 113: 1777-1782 (1974).
- 14.- Jong, E. C., Henderson, W. R. & Klebanoff, S. J. Bactericidal activity of eosinophil peroxidase. J. Immunol. 124: 1378-1382 (1980).
- 15.- Klebanoff, S. J. & Hamon C. B. Antimicrobial systems of mononuclear phagocytes. En: Van Furth, R. (ed.) Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology (Oxford, Blacwell Scientific Publications) p. 507 (1975).
- 16.- Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. J. Bacteriol. 95: 2131-2138 (1968).
- 17.- Klebanoff, S. J. & Seymour, B. Iodination of bacteria: A bactericidal mechanism. J. Exp. Med. 126: 1063-1078 (1967).
- 18.- Koss, G. L. Epidemiology of carcinoma of the uterine cervix. Proceedings XI International Cancer Congress, Florence, 3: 1063-1078 (1967).

- 19.- Lehrer, R. I. & Cline, M.J. Leukocytes myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: The role of ----- myeloperoxidase in resistance to candida infection. *J. Clin. Invest.* 48: 2478-1488 (1969).
- 20.- Levy, J.P. Inmunidad antitumoral. En: Bach, F. J. (ed.) *Inmunología* 1a. edición (Ed. Limusa México) p. 387-392 ---- (1984).
- 21.- Matheson, N. R., Wong, P. S. & Travis, J. Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. *Biochemistry* 20: 325-330 (1978).
- 22.- Nathan, C. F. Mechanism of macrofage antimicrobial ---- activity. *Transactions of Royal Society of Trop. Med. Hyg.* 77: 620-630 (1983).
- 23.- Nicholson, B. A., Bainton, D.F. & Farquhar, M. G. ----- Differentiation of monocytes, Origin, nature, and fate of --- their azurophil granules. *J. Cell. Biol.* 50: 498-515 (1971).
- 24.- Orozco-Cruz, R., Aguilar-Santelises, M., Rodriguez-Coquiez, G. y Estrada-Parra, S. Determinación de complejos inmunes --- circulantes y parámetros asociados en pacientes con cáncer cérvico-uterino. *Rev. Lat-amer, Microbiol.* 29: 145-151 (1987).
- 25.- Pember, O. S., Shapira, R. & Kinkade, M. J: Multiple forms of human neutrophilic granulocytes: Evidences in ----- compartamentalization enzymatic activity, and subunit estructura. *Arch. Biochem. Bophys.* 221: 391-403 (1983).
- 26.- Ratham, J. S., Benoy, B.P., Stauss, R., Jacobs, A. & Sbarra, J. A. Oxidative peptide cleavage and descarboxilation by the --- MPO-H₂O₂-Cl⁻ antimicrobial system. *Infect. Immunity* 9: 255-260 (1971).

- 27.- Ratnam, J. A., Zgliczynki, J. M. & Sbarra, A. J. ---
Enhanced killing for myeloperoxidase-coated bacteria in the
myeloperoxidase-H₂O₂-Cl⁻ system. *J. Infect.* 137: 481-420 -
(1978).
- 28.- Rojas-Espinosa, O., Oltra, A., Quevedo, E. & Arce, P.
Enzyme activation in peritoneal cells from mice infected -
with mycobacterium lepraemurium. *Int. J. Lepr.* 54: 476---
479 (1986).
- 29.- Slivka, A., Alberth, F., LoBuglio, & Weiss, J. S. A -
potential role for hypochlorous acid in granulocyte-mediated
tumor cell cytotoxicity. *Blood*, 55: 347-350 (1980).
- 30.- Vange, P. & Olsson, I. Cationic proteins of human ---
granulocytes. VI. Effects on the complement system and ---
mediation of chemotactic activity, *J. Immunol*, 115: 1505---
1508 (1975).
- 31.- Ward, P. A., & Hill, J. H. C5 chemotactic fragments -
produced by an enzyme in lysosomal granules of neutrophils.
J. Immunol. 104: 534-535 (1970).
- 32.- Ward, P.A. & Zvaifler. Quantitative phagocytosis by -
rheumatoid factor. *J. Immunol*, 111: 1777-1782 (1973).
- 33.- Wright, D. G. & Gallin, J. I. A functional differentiation
of human neutrophil granules: generation of C5a by a specific
(secondary) granule product and inactivation of C5a by azurophil
(primary) granule products. *J. Immunol.* 119: 1068-1076 (1977).
- 34.- Yamada, M., Mori, M. & Sugimura, T. Purification and --
characterization of small molecular weight myeloperoxidase -
from human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biochemistry*.
20: 766-771 (1981).

35.- Zigmond, S. H. & Hirsch, J. G. Leukocyte locomotion - and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of cell-derived chemotactic factor. J. Exp. Med. 137: 387-410 (1973).

FE DE ERRATAS.

En la página 11 a partir del cuarto renglon se omitieron las siguientes lineas.

Estadío II.- El carcinoma se extiende más allá del cérvix, pero no alcanza la pared pélvica ó se extiende a la vagina. En el caso de que no se presente induración en el parametrio...