

1 9 8 6 - 2

082483756

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



**INHIBICION DEL CRECIMIENTO DEL LINFOMA MURINO L5178Y
CON PLASMA ACTIVADO CON ZYMOBAN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P R E S E N T A

LENIN ANTONIO AGUILAR

GUADALAJARA, JAL. JULIO 1987

**INHIBICION DEL CRECIMIENTO DEL LINFOMA MURINO
L5178Y CON PLASMA ACTIVADO CON ZYMOBAN.**

LENIN ANTONIO AGUILAR.

EN LA CIUDAD DE GUATEMALA, A LOS [] DE [] DE [] DEL AÑO []

EL PRESIDENTE DE LA REPUBLICA, DON []

EL VICEPRESIDENTE DE LA REPUBLICA, DON []

EL MINISTRO DE EDUCACION, DON []

DIRECTOR DE TESIS:
Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA

ESTA TESIS SE REALIZO EN LA SECCION DE INMUNOPATOLOGIA DE LA DIVI
SION DE PATOLOGIA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCI
DENTE, BAJO LA DIRECCION DEL DR. HECTOR GOMEZ ESTRADA.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial al Dr. Héctor Gómez Estrada y a la Q.F.B. Ana Ma. Puebla Pérez por los conocimientos y la desintersada ayuda que me brindaron.

Al Dr. Amado González Mendoza, Jefe de la División de Patología Experimental de la U.I.B.O., por la oportunidad que me dió para realizar mi trabajo de tesis.

A todas las personas de la U.I B.O. que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

Particularmente a mi Director de Tesis y al Arq. Jorge Cuevas Pulido.

DEDICATORIAS

A mis Padres, por el amor,
la comprensión y las en-
señanzas que me han dado.

A mis hermanos,
con cariño.

A mis formadores
profesionales,
con respeto.

A mis amigos,
con estimación.

Y a María Irma, por
el apoyo moral que
siempre me ha brin-
dado. Especialmente.

I N D I C E :

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCION | 1 |
| ANTECEDENTES | 2 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 8 |
| HIPOTESIS | 9 |
| OBJETIVO | 9 |
| MATERIAL Y METODOS | 9 |
| RESULTADOS | 15 |
| DISCUSION | 18 |
| CONCLUSION | 19 |
| BIBLIOGRAFIA | 20 |

INTRODUCCION

Se ha informado que tanto en animales de experimentación como en humanos, puede provocarse la lisis de algunos tumores malignos por medio de la plicación de plasma autólogo, incubado previamente con la proteína A del Staphylococcus aureus¹⁻⁸.

La proteína A del S. aureus y el zymosán tienen la propiedad de activar el sistema del complemento⁹⁻¹⁵.

El propósito de este trabajo fué investigar si la aplicación de plasma activado con zymosán podría inhibir el crecimiento del linfoma murino L5178Y.

ANTECEDENTES

Las enfermedades neoplásicas malignas son un grave problema de sa
lud pública. En los países desarrollados constituyen la segunda
causa de mortalidad^{16,17}. En México representan la sexta causa de
letalidad y dentro de ellas las leucemias y los linfomas ocupan el
quinto lugar como causa de mortalidad, la que se incrementa anualme
mente un 10%¹⁶.

Desde distintos enfoques y con metodología diversa se realizan in
vestigaciones con el fin de llegar a conocer los mecanismos que ha
cen que una célula normal se transforma en maligna. El desconocimi
miento de esos mecanismos constituye uno de los principales obstáculos
en la investigación biomédica del cáncer^{18,19}.

Se investigan también nuevas terapias que den resultados más alenta
dores para los pacientes con cáncer¹⁹⁻²¹.

Una de las ciencias en que se realiza investigación sobre cáncer es
la Inmunología, la que tiene como objeto estudiar las interrelaciones
de los elementos del sistema inmune entre sí y de estos elementos
con los agentes extraños al organismo (antígenos)²².

La respuesta inmune consiste en una compleja serie de eventos que dependen de la interacción de los linfocitos T o B con el antígeno. Esta respuesta puede ser de dos tipos: celular o humoral.

Respuesta inmune celular. Se desencadena cuando los macrófagos y los linfocitos T tienen contacto con un antígeno. Esto suele activar a los linfocitos T, que proliferan y tienden a destruir a ese antígeno. La activación puede ser por antígenos virales, bacterianos, de rickettsias, hongos, células de órganos y tejidos transplantados, así como también antígenos de células neoplásicas²³⁻²⁵.

Respuesta inmune humoral. Se desencadena cuando los antígenos solubles o particulados de los microorganismos y de las células extrañas activan a los macrófagos y linfocitos B. Estos linfocitos producen anticuerpos, que son proteínas que se unen a los antígenos y colaboran en su eliminación del organismo²³⁻²⁵.

También dentro de los factores humorales del sistema inmunológico se encuentra el sistema del complemento. Está constituido por más de 20 proteínas séricas que normalmente se encuentran circulando en la sangre como moléculas precursoras inactivas, las que al ser activadas reaccionan en cadena y llevan a cabo sus actividades bio

lógicas. Algunas de estas actividades son la participación en los mecanismos de daño tisular, la producción de los procesos inflamatorios y la lisis de bacterias, hongos, virus y parásitos, así como también de células neoplásicas^{9,12,13,14}.

Existen dos vías de activación del sistema del complemento; la vía clásica y la vía alterna o de la properdina. La vía clásica puede ser activada por complejos inmunes, por las inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgG3 e IgM, por la proteína C reactiva y por la proteína A del Staphylococcus aureus. La vía alterna la pueden activar la IgA, el zymosán, los lipopolisacáridos de las paredes de bacterias Gram negativas, el factor del veneno de cobra y la proteína A del S. aureus^{9,11,13,12,14}.

En los pacientes con cáncer el sistema inmunológico reconoce como extrañas a las células malignas^{22,26}, pero sólo desarrolla una débil respuesta humoral y celular contra la neoplasia. Así, en la mayoría de los casos las células cancerosas logran escapar de los eventos que el sistema inmune lleva a cabo para exterminarlas²⁰⁻²².

La inmunoterapia tiene como objetivo principal la limitación o erradicación del crecimiento neoplásico maligno mediante la inducción

de una respuesta inmune de rechazo contra las células malignas²⁶.

No obstante la gran cantidad de investigación dedicada a estas enfermedades, con los tratamientos actuales solo puede curarse a un reducido número de pacientes^{20,21,27}.

Se ha informado que las células malignas son portadoras de antígenos que las hacen diferentes a las células normales del organismo^{20,22,26,27}. En base a esto, desde hace más de 90 años se ha intentado provocar una efectiva respuesta inmune de rechazo hacia las células malignas^{20,21,22,27}. Esto no se ha realizado hasta la fecha con mucho éxito, pero recientemente Terman y col. , han logrado producir lisis in vivo de tumores malignos por un procedimiento inmunológico³⁻⁵.

El procedimiento se ha aplicado para lograr el efecto oncolítico en el adenocarcinoma mamario en caninos y humanos³⁻⁵. El método consiste en obtener sangre venosa del paciente, la cual se hace pasar por una centrífuga citoseparadora de flujo continuo que separa el plasma de las células sanguíneas. El plasma se pasa a través de una columna de cromatografía que lleva adsorbida la proteína A del S. aureus. Enseguida, el plasma se mezcla con el paquete celular de la sangre

y se regresa al paciente por otra vena. El procedimiento se repite de ocho a 12 veces en cada caso, a razón de dos a tres veces por semana con lo que se logra la lisis de las células tumorales³⁻⁵

En nuestro laboratorio hemos comprobado el efecto oncolítico del procedimiento en dos casos.

Los inconvenientes del método de Terman son que se requiere una centrífuga citoseparadora de flujo continuo, equipo especializado de laboratorio, suministro constante de proteína A, y que los pacientes conserven un buen número de venas con flujo sanguíneo adecuado, lo que dificulta su aplicabilidad a estos pacientes, que generalmente se encuentran debilitados por su enfermedad y por los tratamientos quirúrgicos, radioterápico y quimioterápico que han recibido. Además, esta forma de tratamiento solo puede efectuarse en centros muy especializados y resulta muy costoso.

Por otra parte, se desconoce el mecanismo de acción del procedimiento. El efecto oncolítico se ha atribuido sin haberse demostrado, a que la proteína A del S. aureus absorbe ya sea los anticuerpos bloqueadores u otros factores que inhiben la respuesta inmune antitumoral de rechazo¹⁻⁸.

Contra esta suposición, de que la proteína A tenga un efecto depurador del plasma, llama la atención que la lisis tumoral pueda lograrse hasta con sólo tres mg de la proteína A y 90 ml de plasma por sesión.

Durante la aplicación del plasma así tratado, los pacientes presentan hipertermia y signos de anafilaxia. En las fases iniciales de la oncólisis se presenta un infiltrado de abundantes neutrófilos en torno de las células malignas³⁻⁵. Estos datos nos han sugerido que el plasma tratado con la proteína A del S. aureus puede llevar componentes activados del sistema del complemento y que el efecto oncolítico pudiera ser causado por ellos.

A este respecto, se ha informado que la proteína A del S. aureus es capaz de activar el sistema del complemento^{9,11,15}. Si el efecto oncolítico fuera causado por el sistema, la proteína A podría ser sustituida por el zymosán, que es un reactivo inmunológico clásico como activador del complemento, fácil de obtener y más barato que la proteína A. El zymosán son las partículas de la levadura de cerveza tratadas con un agente reductor^{10,12,13,14,15}.

El objetivo de este trabajo fue investigar si la aplicación de plasma activado por incubación con zymosán podría inhibir el crecimiento

to del linfoma murino L5178Y en fase ascítica.

El linfoma L5178Y es un tumor tímico monoclonal que se originó en 1958 en el Laboratorio del Dr. Fisher en un ratón macho DBA/2. Fue cedido a nuestros laboratorios por el Dr. Stevens de la Universidad de Utah y lo hemos conservado por más de 16 años por trasplante seriado intraperitoneal a ratones BALB/C que son compatibles en el locus H-2d con los DBA/2. El tumor es de una alta malignidad, muy resistente a los mecanismos inmunes de rechazo y para inhibir o abolir su crecimiento por métodos inmunológicos se requiere que el procedimiento sea muy efectivo²⁸. Por las razones anteriores, se eligió para este estudio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconoce si los componentes activados del sistema del complemento tendrán efecto oncolítico sobre las células malignas. En particular, se desconoce si la aplicación de plasma activado en el sistema del complemento con zymosan, inhibirá el crecimiento del linfoma murino L5178Y en fase ascítica.

HIPOTESIS

La inyección intraperitoneal de plasma murino activado en su sistema del complemento con zymosán, inhibirá el crecimiento del linfoma L5178Y en fase ascítica.

OBJETIVO

Investigar si la administración de plasma murino activado en el sistema del complemento por incubación con zymosán inhibe el crecimiento del linfoma murino L5178Y.

MATERIAL Y METODOS

Plan general. Se formó un grupo de ratones portadores de linfoma L5178Y y se les administró por vía intraperitoneal el plasma de otros ratones portadores de la neoplasia previamente incubado con zymosán para activar el sistema del complemento. Como testigo, un grupo de ratones con linfoma que no tuvieron ningún tratamiento. Otros testigos fueron ratones con tumor que se les inyectó plasma de ratones sanos, activado y no activado con zymosán y plasma de ratones con linfoma sin previa activación con zymosán.

Ratones. Se utilizaron 500 ratones machos BALB/C, de 3 meses de edad y de 23 a 25 g de peso, alojados en grupos de diez ratones en jaulas de plástico con cama de aserrín esterilizado y alimentados con alimento comercial para roedores (Purina-México) y agua purificada para consumo voluntario, en habitaciones con temperatura controlada a 22°C y ciclos alternos de iluminación y oscuridad de 12 horas.

Se formaron 5 grupos de 11 ratones cada uno; 360 se utilizaron como donadores de plasma y el resto, para pruebas de titulación de complemento. El primer grupo no recibió ningún tratamiento y fue grupo testigo. El segundo grupo recibió plasma de ratones portadores de linfoma, previamente activado en el sistema del complemento por incubación con zymosán. Al tercer grupo se le administró plasma de ratones portadores de linfoma no incubado con zymosán. El cuarto grupo se trató con plasma de ratones sanos previamente activado con zymosán. El quinto grupo se recibió plasma de ratones sanos no incubado con zymosán.

Linfoma LS178Y. Tanto los ratones de los 5 grupos como los donadores de plasma de ratones portadores de tumor y los empleados en las respectivas pruebas de titulación de complemento fueron inoculados

con 2×10^7 células L5178Y por vía intraperitoneal.

Preparación del zimosán. Se hizo mediante la técnica de Norris²⁹. Se suspendieron 23g de levadura de panadería en 500 ml de solución de NaCl 0.2 M regulada a pH 7.2 con amortiguador de fosfatos (SSF). Se pusieron en autoclave durante 30 minutos a 120°C y 1.1 kg de presión por cm^2 . Las levaduras se centrifugaron y se lavaron en SSF hasta obtener un sobrenadante claro. Se resuspendieron en 12.5 ml de 2-mercaptoetanol 0.1M en solución salina amortiguada y se incubaron a 37°C con agitación constante por dos horas. Se removió el 2-mercaptoetanol de las levaduras por lavado con NaCl 0.15 M y se centrifugaron a 2000 G cinco minutos. Las levaduras se resuspendieron después en 25 ml de iodoacetamida 0.02 M en NaCl 0.15 M adicionada de 20% (v/v) de SSF y se incubaron durante 2 horas a 22°C. Se lavaron por centrifugación tres veces en 60 volúmenes de SSF hasta obtener un sobrenadante claro. Finalmente se resuspendieron en 50 ml de sulfato de magnesio y 2 mg de azida de sodio. Esta mezcla se conservó a 4°C.

Obtención del plasma. Se obtuvo de los ratones donadores portadores de tumor, 10 días después de la inoculación intraperitoneal del linfoma. Se les inyectó a cada uno 300 unidades de heparina por vía

subcutánea y cuarente y cinco minutos después se sangraron al máximo por punción intracardíaca. La sangre se centrifugó a 5000 G durante 5 minutos y se separó el plasma. De igual manera se trabajaron los ratones sanos donadores de plasma.

Tratamiento del plasma con zymosán. Cada mililitro de plasma, inmediatamente de ser obtenido, se incubó con 0.2 ml de zymosán durante 45 minutos a 37°C en baño maría para activar el sistema del complemento por vía alterna^{10,11,13,14,29}. La mezcla se centrifugó a 1500 G cinco minutos y el plasma sobrenadante se inyectó a los ratones del segundo y cuarto grupos.

Aplicación del plasma incubado y no con zymosán. Tanto el plasma incubado con zymosán como el que no fue incubado, se aplicó a los grupos segundo y cuarto, y tercero y quinto respectivamente, diariamente durante 8 días por vía intraperitoneal a razón de 0.5 ml de plasma por ratón cada 24 horas a partir del tercer día de la inoculación con las células del linfoma.

Contenido de complemento. Se hicieron pruebas del contenido de complemento a los plasmas que se usaron como terapia de cada uno de los grupos trabajados así como también al plasma de los ratones que

no recibieron ningún tratamiento, mediante la técnica de Mayer³⁰. Con eritrocitos de carnero se hizo una suspensión celular al 2%. Con esta suspensión celular se preparó una solución de hemoglobina y una suspensión celular al 0.33%; con cantidades proporcionales de ambas se prepararon los colores de referencia para el título de hemolisina y para el título de complemento. Para titular la hemolisina se prepararon diferentes diluciones de ésta y se les añadió cantidades constantes de suspensión celular al 2%, de complemento de cuyo diluido 1:100 y de solución salina reguladora. Se incubaron a 37°C en baño maría por una hora y se centrifugaron obteniendo el título por comparación con los colores de referencia. Con la solución óptima de la hemolisina y con la suspensión celular al 2% en cantidades iguales se prepararon las células sensibilizadas, las que se mezclaron con cantidades variables del complemento problema (diluido 1:2) y de solución salina reguladora. Se incubaron luego en baño maría a 37°C por 30 minutos, se centrifugaron y se compararon los sobrenadantes con los colores de referencia.

La cantidad de complemento en el plasma de ratones sanos, no activado con zymosán (grupo 5) se consideró como el 100% y fue tomado como referencia para comparar los títulos obtenidos en los otros cuatro grupos.

Evaluación de los resultados. Se evaluaron en función de sobrevida y crecimiento o reducción de la masa tumoral. La sobrevida se registró diariamente luego de la inoculación del linfoma, hasta el onceavo día después de esta inoculación. La masa tumoral de cada ratón fue el total de células de linfoma presentes en el líquido ascítico que portaban. La masa tumoral desarrollada se evaluó un día después de la última dosis recibida. La cuenta de las células LS178Y se hizo en cámara cuentaglóbulos tipo Neubauer.

El Grupo 1 se evaluó once días después de la inoculación del linfoma.

Se hizo el análisis estadístico de los resultados obtenidos, mediante la prueba "t" de Student para experimentos apareados con curva de distribución normal³¹.

RESULTADOS

Los resultados se resumen en la Tabla I y Figura I.

La inoculación de 2×10^7 células L5178Y a los ratones del Grupo I les produjo a los 11 días un crecimiento tumoral en volúmen de 4.0 ± 1.07 ml y $738.08 \pm 210.17 \times 10^6$ células. Esto representa un incremento tumoral de 20 volúmenes y de 37 veces el de las células L5178Y con respecto al inóculo inicial.

En cambio, los ratones del Grupo 2, que recibieron tratamiento con plasma de ratones portadores de linfoma y activado con zymosán presentaron un promedio de 3.12 ± 1.63 ml y $346.77 \pm 222.75 \times 10^6$ células L5178Y. Esto representó un incremento tumoral de 15.6 volúmenes y de 17.33 veces en células con respecto al inóculo inicial. Al comparar este grupo con el grupo testigo anterior, la diferencia en número de células fué altamente significativa con una $p < 0.001$.

En los ratones del Grupo 3, que recibieron tratamiento con plasma de ratones portadores de linfoma, no activado con zymosán, el volúmen tumoral fué de 4.42 ± 2.08 ml y la masa tumoral de $433.81 \pm 239.15 \times 10^6$ células, lo cual representó un incremento de 22 volúmenes y de 21.7 veces en células con respecto al inóculo inicial. Al comparar

el número de células tumorales de este grupo con el grupo testigo, la diferencia dió una $p < 0.01$.

Los ratones del Grupo 4, que fueron tratados con plasma de ratones sanos, activado con zymosán, presentaron un promedio de 4.8 ± 0.48 ml de líquido ascítico y $524.06 \pm 131.89 \times 10^6$ células L5178Y. El incremento en volúmen fue de 24 veces y en número de células de 26.2 veces respecto al inóculo inicial. Al comparar el crecimiento tumoral en cuanto a número de células de este grupo con el grupo testigo la diferencia dió una $p < 0.01$.

Respecto al incremento de líquido ascítico, al comparar los Grupos 2, 3 y 4 con el testigo no hubo diferencias significativas. Por esta razón no se incluyen los datos en la tabla.

Todos los ratones de los grupos 1 al 4 sobrevivieron once días.

El aspecto clínico de los ratones fue bueno en los ratones del Grupo 2. Los demás se adelgazaron, se les erizó el pelo y se vieron poco activos, principalmente los del Grupo 5. Los ratones del Grupo 5 se encontraron clínicamente mal a partir del quinto o sexto día después de la inoculación del tumor y seis de los 15 ratones murieron al octavo y noveno día.

Contenido del complemento. En la Tabla I se muestran los resultados del contenido de complemento de los plasmas que se utilizaron como terapia de los 4 grupos trabajados así como también del plasma del grupo testigo. El título de complemento obtenido con plasma de ratones sanos no incubados con zymosán (Grupo 5) se consideró el 100%.

Los plasmas de ratones sanos previamente incubados con zymosán dieron un título de complemento de 74% (Grupo 4). En cambio los plasmas de ratones portadores de linfoma incubados con zymosán presentaron 46% (Grupo 2), y los plasmas de ratones portadores de linfoma no incubados con zymosán presentaron 63% (Grupo 3) de contenido de complemento. Los plasmas de los ratones del Grupo 1 tuvieron también 63% de complemento.

TABLA I

EFFECTO DEL PLASMA INCUBADO O NO CON ZYMOZAN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL LINFOMA MURINO L5178Y Y LA SOBREVIVENCIA DE LOS PORTADORES.

| Ratones receptores del plasma | | | | Plasma aplicado | | Crecimiento tumoral $\bar{X} \pm S$ $\times 10^6$ | Comparación con el grupo testigo 1 ^o (p) |
|-------------------------------|----------------|------------------------|------------------|------------------|--------------------|---|--|
| Grupo | No. de ratones | Días de supervivencia. | Port. de linfoma | Inc. con zymosán | Contenido de C (%) | | |
| 1 | 11 | 11 | Sí | - | 53 | 738.08 210.17 | - |
| 2 | 11 | 11 | Sí | Sí | 46 | 346.77 222.75 | <0.001 |
| 3 | 11 | 11 | Sí | No | 63 | 433.81 239.15 | <0.01 |
| 4 | 11 | 11 | No | Sí | 74 | 524.06 131.89 | <0.01 |
| 5 | 15 | 8-9 | No | No | 100 | - | - |

* Prueba "t" de Student para experimentos apareados con curva de distribución normal.

TABLA I

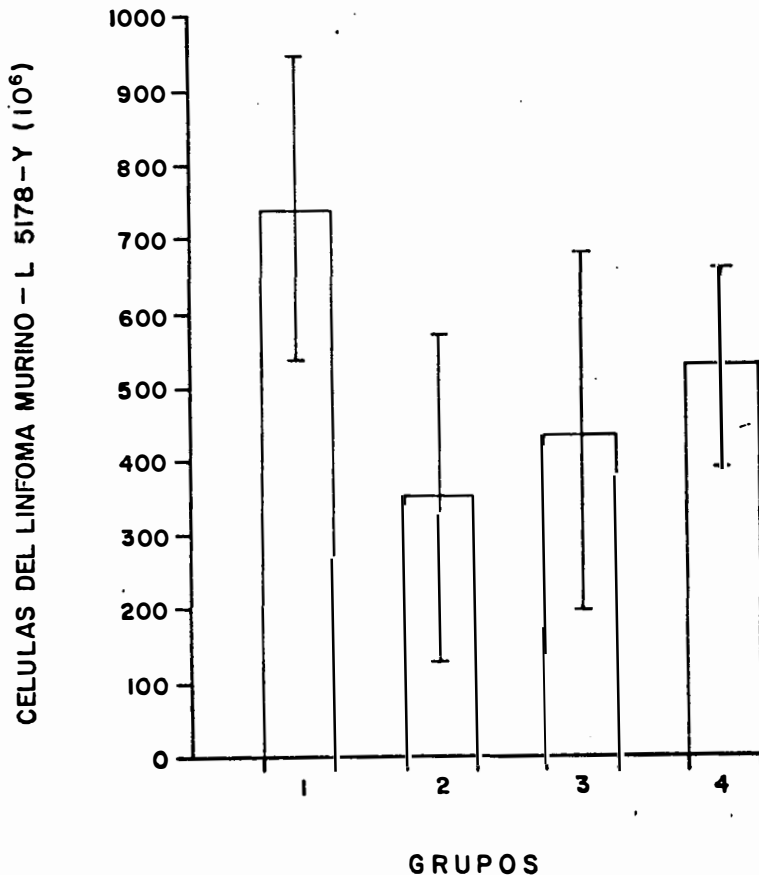
EFFECTO DEL PLASMA INCUBADO O NO CON ZYMOZAN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL LINFOMA MURINO LS178Y Y LA SOBREVIVENCIA DE LOS PORTADORES.

| Ratones receptores del plasma | | | | Plasma aplicado | | Crecimiento tumoral $\bar{X} \pm S$ $\times 10^6$ | Comparación con el grupo testigo 1 [*] (p) |
|-------------------------------|----------------|------------------------|------------------|------------------|--------------------|---|--|
| Grupo | No. de ratones | Días de supervivencia. | Port. de linfoma | Inc. con zymosán | Contenido de C (%) | | |
| 1 | 11 | 11 | sí | - | 53 | 738.08 210.17 | - |
| 2 | 11 | 11 | sí | sí | 46 | 346.77 222.75 | <0.001 |
| 3 | 11 | 11 | sí | No | 63 | 433.81 239.15 | <0.01 |
| 4 | 11 | 11 | No | sí | 74 | 524.06 131.89 | <0.01 |
| 5 | 15 | 8-9 | No | No | 100 | - | - |

* Prueba "t" de Student para experimentos apareados con curva de distribución normal.

FIGURA 1

EFECTO DEL PLASMA INCUBADO O NO CON ZYMOBAN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL LINFOMA MURINO L-5178-Y.



- 1- TESTIGO.
- 2- TRATADOS CON PLASMA - L 5178-Y INCUBADO CON ZYMOBAN.
- 3- TRATADOS CON PLASMA - L 5178-Y NO INCUBADO CON ZYMOBAN.
- 4- TRATADOS CON PLASMA - NORMAL INCUBADO CON ZYMOBAN.

DISCUSION

El linfoma murino L5178Y fue un modelo útil en nuestro estudio, ya que el crecimiento o reducción de la masa tumoral pudo valorarse tanto en volúmen ascítico como en número total de células malignas.

La administración intraperitoneal de plasmas de ratones con linfoma previamente incubados con zymosán inhibió el crecimiento tumoral de manera significativa ($p < 0.001$). Para este trabajo solo se consideró significativa una $p < 0.001$, dada la dispersión de las cuentas celulares.

Con el empleo del zymosán como activador del sistema del complemento y tomando como base el título del plasma de los ratones sanos sin incular con zymosán como el 100% (Grupo 5), obtuvimos títulos de 46% en el plasma administrado al Grupo 2; de 63% en el plasma inyectado al Grupo 3 y de 74% en el plasma aplicado al Grupo 4; el grupo testigo (Grupo 1) tuvo 63% de complemento. Con estos resultados se comprobó que el zymosán sí activó el sistema del complemento murino.

Los resultados del Grupo 5 no fueron comparables con los otros grupos, debido a que el 40% de ellos murieron entre el octavo y noveno

DISCUSION

El linfoma murino L5178Y fue un modelo útil en nuestro estudio, ya que el crecimiento o reducción de la masa tumoral pudo valorarse tanto en volúmen ascítico como en número total de células malignas.

La administración intraperitoneal de plasmas de ratones con linfoma previamente incubados con zymosán inhibió el crecimiento tumoral de manera significativa ($p < 0.001$). Para este trabajo solo se consideró significativa una $p < 0.001$, dada la dispersión de las cuentas celulares.

Con el empleo del zymosán como activador del sistema del complemento y tomando como base el título del plasma de los ratones sanos sin incular con zymosán como el 100% (Grupo 5), obtuvimos títulos de 46% en el plasma administrado al Grupo 2; de 63% en el plasma inyectado al Grupo 3 y de 74% en el plasma aplicado al Grupo 4; el grupo testigo (Grupo 1) tuvo 63% de complemento. Con estos resultados se comprobó que el zymosán sí activó el sistema del complemento murino.

Los resultados del Grupo 5 no fueron comparables con los otros grupos, debido a que el 40% de ellos murieron entre el octavo y noveno

día de haber sido inoculados con el linfoma. Es importante señalar que los que sobrevivían al onceavo día en este grupo mostraban signos clínicos desfavorables. El número total de células tumorales fue menor con respecto al grupo testigo, pero debido a una sobrevida mas corta, los datos no se tabularon.

Nuestros resultados indican que el efecto antitumoral observado es por la activación del complemento del plasma con el zymosán.

El zymosán y la proteína A del S. aureus activan el sistema del complemento por la vía alterna.

El efecto inhibitorio de los componentes del sistema del complemento sobre las células malignas no había sido descrito, por lo que será necesario continuar investigando en este sentido para confirmar los resultados de este trabajo preliminar.

CONCLUSION

La administración intraperitoneal de plasma de ratones portadores de linfoma activado en su sistema del complemento con zymosán inhibió el crecimiento del linfoma ascítico L5178Y.

BIBLIOGRAFIA

1. Holohan T., Phillips T.N., Bowles C., Deisseroth A.: Regression of canine mammary adenocarcinoma after immunoadsorption therapy. *Cancer Res.* 1982; 42:3663-3668.
2. Jones I.R., Yoshida L.H., Ladiges W.C., Kenny M.A.: Treatment of feline leukemia and reversal of FeLV ex vivo removal of IgG: A preliminary report. *Cancer.* 1980; 46:673-684.
3. Terman D.S., Yamamoto T., Tillquist R.L., Henry J.F., Cook G.L., Silvers A., Shearer W.T.: Tumoricidal response induced by cytosine arabinoside after plasma perfusion over protein A. *Science.* 1980; 209:1257-1259.
4. Terman D.S., Yamamoto T., Mattioli M., Cook G., Tillquist R., Henry J., Poser R., Daskal Y.: Extensive necrosis of spontaneous canine mammary adenocarcinoma after extracorporeal perfusion over Staphylococcus aureus Cowans I. *J. Immunol.* 1980; 124:795-805.
5. Terman D.S., Young J.B., Shearer W.T., Ayus C., Lehane D., Mattioli C., Espada R., Howell J.F., Yamamoto T., Zaleski H.I., Miller L., Frommer P., Feldman L., Henry J.L., Tillquist R., Cook G., Daskal Y.: Preliminary observations of the effects on breast adenocarcinoma of plasma perfused over immobilized protein A.N. *Engl. J. Med.* 1981; 305:1195-1200.
6. Ray P.K., Idiculika A., Mark R., Rhoads J.E., Thomas H., Basset J.G.,

- Cooper D.R.: Extracorporeal immunoadsorption of plasma from metastatic colon carcinoma patient by protein A-containing nonviable Staphylococcus aureus. *Cancer* 1982; 49:1800-1809.
7. Young J.B., Ayus J.C., Miller L.K., Divine G.W., Frommer J.P., Miller R.R., Terman D.S.: Cardiopulmonary toxicity in patients with breast carcinoma during plasma perfusion over immobilized protein A. *Am. J. Med.* 1983; 75:278-288.
 8. Bansal S.C., Bansal B.R., Thomas H.L., Siegel P.D., Rhoads J.E., Cooper D.R., Terman D.S., Mark R.: Ex vivo removal of serum IgG in a patient with colon carcinoma. *Cancer* 1978; 42:1-18.
 9. Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V.: *Immunología Básica y clínica*. Ed. Manual Moderno. 1985:119-131.
 10. Kazatchkine M.D., Fearon D.T., Silbert J.E., Austen K.F.: Surface-associated heparin inhibits zymosan-induced activation of the human alternative complement pathway by augmenting the regulatory action of the control proteins on particle-bound C3b. *J. Exp. Med.* 1979; 150:1202-1215.
 11. Verbrugh H.A., Van Dijk C.W., Peters R., Van-der T., Verhoff J.: The role of Staphylococcus aureus cell wall peptidoglycan, theichoic acid and protein A in the processes of complement activation and opsonization. 1979; 37:615-621.

12. Wilson M.R., Salvaggio J.E.: Activation of the alternative path way of complement: A mechanism in search of diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1980; 65:319-321.
13. Frank M.M.: Complement. Current concept. *Upjohn.* 1975:5-37.
14. Nelson R.A.: An alternative mechanism for the properdin system. *J. Exp. Med.* 1958; 108-515.
15. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B., Mc Carty M.: *Tratado de Microbiología.* Ed. Salvat. Barcelona, España. 1978:533-547.
16. Gómez E.H., Acosta R.R., Ramos D.M., Alpuche U.J., González M.R., Rayón R.F.: Radiosensibilidad de las células del linfoma murino L5178Y. *Arch. Invest. Med. (Mex)* 1979; 10:187-200.
17. Robbins S.L., Cotran R.S.; *Patología estructural y funcional.* Ed. Interamericana. 1984. p.133.
18. Tapia A.G., Arellano B.J., Gómez E.H.: Partículas viroides tipo A y C en el linfoma murino L5178Y. *Arch. Invest. Med. (Mex)* 1976; 7:9-16.
19. Ackerman L.V., Regate J.A.: *Cancer. Diagnosis, tretment and progno sis.* C.V. Mosby Company. St. Louis U.S.A. 1970:14-31.

20. Ross D.S., Steele G.: Current research review. Experimental models in cancer immunotherapy. J. Surg. Res. 1984; 37:415-430.
21. Evans R.: Host cells in transplanted murine tumore and their possible relevance to tumor growth. J. Reticuloendothel. Soc. 1979; 26:427-437.
22. Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V.: Inmunología básica y clínica. Ed. Manual Moderno. 1985:226-244.
23. Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V.: Inmunología básica y clínica. Ed. Manual Moderno. 1985:13-21.
24. Laurence J.: Sida y sistema inmunitario. Investigación y ciencia. 1986:44-54.
25. Marrack P., Kappler J.: La célula T y su receptor. Investigación y ciencia. 1986:6-26.
26. Gómez E.H., López R.L., Becerril M.G., Arellano B.J., Fernández Q.P.: Inmunogenicidad de las células L5178Y modificadas con diferentes reactivos. Arch. Invest. Med. (Mex) 1977; 8:113-122.
27. Lessner H.E.: Oncología Médica. Ed. Manual Moderno. 1980:61-82.
28. Ramos D.M., Gómez E.H., Hernández D.J., Tapia A.L., Feria V.A.: Ubicación de los antígenos tumorales en las células del linfoma murino L5178Y. Arch. Invest. Med. (Mex) 1980; 11:425-434.

29. Norris D.A., Lipman S.H., Weston W.L.: Human monocyte chemotaxis. A quantitative in vivo technique. Jour. Invest. Dermatol. 1979; 72:81-84.

30. Mayer M.M., Osler A.G., Bier O.G., Heidelberger M.: The activating Effect of Magnesium and others actions on the hemolytic function of complement. J. Exper. Med. 84:535-548.

31. Goldstein A.: Bioestaditics. An introductory text. Ed. New York. Mac Millan Co. 1971. p. 70.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 243/87

Sr. Lenin Antonio Aguilar
Presente. -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "Inhibición del crecimiento del linfoma murino L 5178 - y con plasma activado con zymosán" para obtener la Licenciatura en -- Biología con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega.



ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Marzo 17 de 1987

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gardiel.

c.c.p. El Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega, Director de Tesis.-Pte.

c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número

Guadalajara, Jal., Mayo 15 de 1987

C. DR. CARLOS ASTENGO OSUNA.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
P r e s e n t e.

Señor Director:

Por la presente informo a usted que he revisado la tesis titulada "INHIBICION DEL CRECIMIENTO DEL LINFOMA MURINO L 5178 Y, CON PLASMA ACTIVADO CON ZYMOBAN", presentado por el pasante de la carrera de Licenciado en Biología, señor Lenin Antonio Aguilar, la cual apruebo para que se imprima y se someta a examen, debido a que la considero apta para ello.

No teniendo otro asunto que tratar, me despido de usted

Atentamente,



Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA