1984-88 081225516

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN RATONES TRATADOS CON SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LEUCOBLASTOS L5178Y

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE

Licenciado en Biología

P R E S E N T A :

María de Lourdes Fernández Torres

GUADALAJARA, JAL.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN RATONES TRATADOS CON SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LEUCOBLASTOS L5178Y.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE MORFOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE CIENCIAS. U DE G. Y EN LA DIVI-- SION DE PATOLOGIA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIONES BIO MEDICAS DE OCCIDENTE. IMSS, BAJO LA DIRECCION DEL M - en C. GENARO GABRIEL ORTIZ Y EL M en C. RODOLFO RAMOS ZEPEDA.

Agradezco profundamente a:

Mis padres por haberme brindado
la mejor herencia ¡Mi profesión!

Beatriz y Ramón por la ayuda
y cariño que siempre me han
brindado. Sinceramente.

Con gran respeto agradezco al M en C. Rodolfo Ramos Zepeda por sus enseñanzas y orientaciones sin las cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Deseo agradecer también a mi director de tesis el M en C. Genaro Gabriel Ortíz por todo el apoyo brindado.

Al Dr. Amado González Mendoza por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis en la división de Patología.

Al Biólogo Arturo Orozco Barocio.

A mis profesores.

A la Facultad de Ciencias de la U de G.

INDICE

	Págs.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
HIPOTESIS	10
OBJETIVO	11
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	19
DISCUSION	21
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFIA	24

INTRODUCCION.

La liberación de factores inmunomoduladores como interleucinas[1], anticuerpos[2] y prostaglandina E[3,4] por las células del huésped portador de un tumor; asi como los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de las células tumorales[5], han sido ampliamente estudiados para comprender la relación huésped-tumor. Sin embargo, la liberación de factores moduladores de la respuesta inmune por células tumorales, ha sido poco estudiada[6]. En el caso del linfoma L5178Y, no existen antecedentes al respecto. Por lo que este trabajo tuvo por objeto estudiar la liberación de factores con acción inmunomodulador, tanto *in vitro* como *in vivo* por las células del linfoma L5178Y. Para ello se utilizaron sobrenadantes de cultivo de linfoblastos L5178Y, suero y líquido de ascítis de ratones portadores del linfoma. Estas sustancias fueron inyectadas intraperitonealmente en ratones sanos, a los que posteriormente se les valoró su respuesta inmune celular y humoral.

ANTECEDENTES.

El cáncer es una enfermedad conocida desde tiempos antiguos, sin embargo, no se ha encontrado un tratamiento capaz de erradicarla, a pesar de los grandes adelantos científicos y tecnológicos logrados en la medicina de hoy en día[7].

Para su estudio el cáncer se divide en dos amplias categorías: carcinomas y sarcomas. Los carcinomas son de origen ecto o endodérmico y los sarcomas son derivados del mesodermo. Entre los sarcomas se incluyen los linfomas y las leucemias que han sido motivo de múltiples investigaciones sobre sistemas tumorales experimentales[8].

Todos los tipos de cáncer presentan tres características: hiperplasia, anaplasia e invasividad[9,10]. La hiperplasia es una proliferación anormal de células por la cual se alteran los patrones normales de la arquitectura de los tejidos. La anaplasia se refiere a anormalidades estructurales y funcionales de la célula, que la asemeja con células embrionarias. Los tumores malignos tienen capacidad invasora de tejidos vecinos o distantes del tejido de origen, a esto se le denomina metastasis[11,12].

En sistemas *in vitro* se han determinado características del estado neoplásico como pérdida de la dependencia de adhesividad[13], que es la capacidad de algunas células tumorales para

crecer y formar colonias cuando se encuentran en suspensión - en un medio semisólido como agar blando; pérdida de la inhibición por contacto[14], propiedad por la cual las células normales cultivadas *in vitro* dejan de multiplicarse al formar una sola capa de células confluentes. En cambio las células tumorales pierden tales represiones y pueden crecer en múltiples capas, una encima de la otra[15].

Por otra parte existen controversias acerca de qué parte de - la célula es el primer blanco del evento oncogénico, pero se ha establecido que el genoma está alterado, ya que el estado transformado persiste através de múltiples divisiones celulares[8].

Acerca de la transformación maligna se han propuesto varias - teorías, entre ellas: infección celular por virus oncogénicos[16], mutación de genes que controlan el desarrollo celular y alteración de los mecanismos de control del crecimiento celular[13,17,18]. Sin embargo el principal obstáculo para el tratamiento del cáncer sigue siendo el desconocimiento de su - etiología, ya que es múltiple y no precisa[19].

En 1900 Paul Ehrlich propuso que los organismos tienen la capacidad de reconocer y destruír a las células cancerosas[14]. Sin embargo el hecho que marcó el inicio de la moderna inmunología del cáncer fueron los experimentos de Prhen y Main en 1957 en los que demostraron la existencia de una respuesta

inmune específica del huésped contra las células tumorales en un modelo de ratones singénicos con sarcoma inducido con metil-colantreno[20].

En la actualidad se conocen dos mecanismos naturales de protección contra las células tumorales: los sistemas específicos y los inespecíficos. Los primeros se consideran eficaces contra los tumores inmunogénicos, mientras que los inespecíficos lo son para éstos y para los menos inmunogénicos[21,22].

Entre los mecanismos específicos principalmente está la acción de los linfocitos T que incluyen subpoblaciones cooperadoras, citotóxicas y supresoras, la función de las primeras es secretar linfocinas que activan a los linfocitos citotóxicos, macrófagos, células NK y linfocitos B. Los linfocitos citotóxicos se encargan de lesionar la membrana de las células cancerosas. En cambio los linfocitos supresores regulan o inhiben la acción de los linfocitos cooperadores y citotóxicos[23]. Los linfocitos B secretan anticuerpos (Ac) que mediante la activación del sistema del complemento o por citotóxicidad celular mediada por complemento y Ac lisan las células malignas[24]. Un fenómeno asociado con los mecanismos de defensa específicos, lo constituye la inmunidad concomitante antitumoral en la cual el huésped con un tumor progresivo puede específicamente suprimir el crecimiento de células del mismo tumor implantadas en sitios distantes[5].

Los mecanismos de defensa inespecíficos están mediados por células NK, linfocitos activados por linfocinas, macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos[24-26].

Por otra parte en base a la expresión de antígenos (Ags) tumorales de superficie se estableció el principio fundamental de la inmunología del cáncer, que permitió la diferenciación de las células malignas de las normales[27]. No obstante la presencia de Ags tumorales en la superficie de las células malignas, no se comprendía porqué los tumores inmunogénicos crecen progresivamente en huéspedes inmunocompetentes[2,5]. Los intentos para explicar este fenómeno han dado origen a numerosos trabajos cuyos resultados sugieren diversas alternativas que utilizan las células malignas para evadir la respuesta inmune. Por ejemplo, el crecimiento continuo de los tumores incrementa la heterogeneidad del fenotipo antigénico de sus células[28]. En este período existe un proceso de selección de células: las que expresan Ags débiles, las no inmunogénicas y las que presentan alteraciones en el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH I), como pérdida de Ags CMH I, activación de ciertas moléculas antigénicas que no se expresan normalmente o si lo hacen es en estadios tempranos de diferenciación. Además puede haber generación de diferentes Ags CMH I por mutación, recombinación o inactivación del material genético, lo cual propicia el desarrollo de metástasis[29].

Asimismo, las células tumorales son capaces de ocultar o modificar sus Ags de superficie para evitar ser reconocidas por los Ac específicos contra ellas por un proceso llamado modulación antigénica[5,6]. De igual forma los tumores inducen la generación de factores solubles y complejos inmunes que bloquean específicamente los receptores de los linfocitos citotóxicos, aunque su naturaleza y procedencia no se han determinado con precisión[6,30]. Además los tumores favorecen la producción de prostaglandinas, esteroides y la pérdida de la inmunidad concomitante como resultado de la activación de células T supresoras[5,6]. La producción de prostaglandinas por los macrófagos facilita el crecimiento de un tumor, ya que éstas inhiben la producción de IL-2, regulan la expresión de los Ags CMH II, inhiben la actividad de las células NK y aparentemente son las responsables de la reactivación de un tumor en estadio latente como se ha observado en el linfoma L5178Y[28,31].

Otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune se presenta en la producción de Ac de facilitación que al unirse a su Ag bloquean la interacción de los linfocitos T citotóxicos con las células tumorales[32].

Por otra parte el huésped no contiene el desarrollo tumoral, debido a la presencia de factores supresores que inhiben los mecanismos normales de protección. Estos factores son producidos o inducidos por las propias células tumorales y/o facto

res séricos o celulares del huésped[33].

Los tratamientos actuales contra el cáncer comprenden quimioterapia, radioterapia, cirugía e inmunoterapia[13]. A partir de 1950 se ha logrado un considerable progreso en el tratamiento de las neoplasias humanas por el uso de quimioterápicos, pues ha sido posible obtener la regresión completa de determinados tipos de tumores de cinco o más años de establecidos, como es el caso de los linfomas, particularmente el de Hodgkin, ciertos tipos de carcinomas, tumor de Wilms y varios más[34].

No obstante, los tratamientos convencionales anti-tumorales no han sido del todo favorables pues existen grandes inconvenientes que limitan su eficiencia, como la insuficiente selectividad de los quimioterápicos que ocasionan toxicidad a los tejidos normales[2].

El conocimiento de que las células malignas tienen Ags que faltan en las normales condujo desde 1880 al uso de inmunoterapia pasiva con suero y activa con vacunas de tumor autólogo[20].

Considerando que los Ags asociados a tumores pueden inducir una respuesta específica del huésped, se ha utilizado este potencial en el desarrollo de diferntes esquemas de inmunoterapia que activen los mecanismos inmunológicos del huésped espe

cíficamente contra el tumor, sin que este fenómeno cause daño a los tejidos sanos[2].

Un tumor experimental que ha permitido estudiar ampliamente la relación huésped-tumor lo constituye el linfoma L5178Y. Este linfoma se ha empleado en diferentes trabajos de inmunoterapia e inmunosupresión[28,35-37]. Dicho linfoma se originó espontáneamente como una leucemia de origen tímico de un ratón de la cepa DBA/2 en el laboratorio del Dr. Lloyd Law en 1956 y posteriormente Fisher lo estableció como cultivo *in vitro*[38]. Las células neoplásicas fueron inoculadas con éxito en la cavidad peritoneal de animales singénicos. Desde entonces se ha conservado por pasos sucesivos como un tumor intraperitoneal que crece en forma de suspensión celular en el líquido de ascítis que provoca. El tumor fue donado a México por la Universidad de Utah E.U.A. por cortesía del Dr. Stevens. Este tumor se logró implantar en ratones de la cepa Balb/C y se ha mantenido en la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente del IMSS, por transplante semanal en ratones singénicos Balb/C, inoculando con 30 millones de células por vía intraperitoneal[35-37].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

No obstante los avances científicos y tecnológicos que se han logrado en la medicina, no se ha encontrado un tratamiento óptimo contra el cáncer. Uno de los mecanismos más controvertidos en este campo, lo constituye la relación huésped-tumor, por lo que se consideró de interés estudiar la interacción del huésped con sustancias liberadas por células tumorales, en particular por los linfoblastos del linfoma L5178Y.

HIPOTESIS.

Los linfoblastos del linfoma L5178Y liberan en cultivos *in vitro* sustancias con capacidad inmunomoduladora de la respuesta inmune de ratones normales.

OBJETIVO.

El presente estudio tuvo por objeto determinar si los linfoblastos L5178Y liberaban factores inmunomoduladores en cultivo *in vitro* que influyeran en la respuesta inmune celular y/o humoral de animales sanos después de ser tratados con sobrenadantes de cultivos de linfoblastos L5178Y.

MATERIAL Y METODOS.

Se emplearon 150 ratones machos de la cepa Balb/C de 23 a 25g de peso y de 8 a 12 semanas de edad, alojados en jaulas de policarbonato, alimentados con purina para roedores y agua purificada para consumo voluntario, con ciclos de luz de 12 hrs, humedad y temperatura ambiente controlada a 22 $\pm$ 2ºC.

LINFOMA MURINO L5178Y.

Durante el desarrollo de este trabajo el linfoma se mantuvo en ratones sanos, por transplantes periódicos de linfoblastos L5178Y por inoculación intraperitoneal (i.p.) de 3×10^7 linfoblastos resuspendidos en 0.2 ml de solución salina fisiológica (NaCl) 0.87% estéril. Estos transplantes se hicieron en dos ratones sanos cada 10 días.

LINFOBLASTOS L5178Y.

Las células del linfoma se obtuvieron de ratones con linfoma de 10 días de evolución. Se separaron del líquido de ascítis por centrifugación a 600 G/20 minutos y se lavaron dos veces con 3 ml de solución salina balanceada de Hanks (SSBH).

CULTIVO DE LINFOBLASTOS L5178Y.

Los linfoblastos L5178Y se cultivaron de acuerdo con el méto-

do de Nowell[39], en tubos de vidrio de 16 X 150 mm (PYREX) con tapón de silicón, que contenían 3 ml de medio de cultivo mínimo esencial (MEM) adicionado de 10% de suero de ternera fetal, 50 UI de penicilina y 50 ug de estreptomicina. Se agregaron en cada tubo 3 X 10^7 linfoblastos. Se incubaron a 37ºC por 24 hrs en atmósfera de 5% de CO_2. En cada ocasión se hicieron dos series de 10 cultivos cada una. A una serie se le agregaron 0.2 ml de fitohemaglutinina-M (PHA) y a la otra no.

LIBERACION DE FACTORES INMUNOMODULADORES.

Para probar si los linfoblastos L5178Y estimulados con PHA o sin ella producían factores inmunomoduladores, se tomó el sobrenadante de los cultivos de 24 hrs, se dializó contra buffer salina fosfatos pH 7.0 y posteriormente se inocularon 0.6 ml de sobrenadante durante cinco días consecutivos por vía i.p. a dos grupos de 10 ratones sanos. A los ratones tratados con el sobrenadante de los cultivos de linfoblastos estimulados (Grupo 1) o no (Grupo 2) con PHA, se les valoró la respuesta inmune celular por la prueba de hipersensibilidad retardada a dinitro fluoro benceno (DNFB) y la humoral por la prueba de células formadoras de placas de hemólisis (CFPH). Este procedimiento se realizó igualmente en un grupo de 10 ratones (Grupo 3) que recibieron durante 5 días consecutivos 0.6 ml de MEM dializado, en lugar de sobrenadante de cultivo de linfoblastos.

Como complemento de este estudio se consideró de importancia determinar la existencia de factores inmunomoduladores en los líquidos corporales de los animales portadores del linfoma - L5178Y. Para ello se adicionaron dos grupos de 10 ratones cada uno, los cuales fueron tratados con líquido ascítico (Grupo 4) o suero (Grupo 5) de ratones con linfoma L5178Y. Para ello se utilizaron ratones con 10 días de evolución del linfoma L5178Y. Se les extrajo líquido ascítico de la cavidad abdominal y sangre por punción cardíaca. Las células suspendidas en el líquido ascítico se eliminaron por centrifugación a - 8000 G/35 minutos. Se descartó el paquete celular y se utilizó el líquido sobrenadante. El suero se obtuvo por retrac--- ción del coágulo y por centrifugación a 1000 G/5 minutos.

Cada grupo de ratones se inyectó i.p. con dos dosis de 0.5 ml de líquido ascítico o suero. Como testigos se utilizaron dos grupos de 10 ratones cada uno (Grupos 6 y 7) a los que se les inyectaron i.p. 0.5 ml de NaCl 0.87% estéril o suero de ratón normal respectivamente. A estos grupos de ratones se les hi-- cieron también pruebas de hipersensibilidad retardada a DNFB y CFPH.

Dos grupos más de 10 ratones cada uno se trataron con sobrenadante de cultivo de linfoblastos de 24 hrs, estimulados o no con PHA (Grupos 8 y 9 respectivamente). Después de este tratamiento se les aplicaron 3 X 10^7 linfoblastos viables, para -

conocer el efecto específico que pudieran haber generado en los ratones los factores liberados en los sobrenadantes de los cultivos. Para la valoración de este estudio se tomó en cuenta el tiempo de evolución del tumor y la sobrevida de los animales. Este procedimiento se realizó también en otro grupo de ratones inoculados con MEM (Grupo 10).

PRUEBA DE DNFB.

Para valorar la respuesta inmune celular se utilizó la sensibilización a DNFB[40]. Este método consistió en rasurar el pelo del abdomen de los ratones en un área de 2 X 2 cm, en donde se aplicaron 20 µl de una solución al 0.5% (v/v) de DNFB disuelto en una mezcla de acetona y aceite de oliva en proporción 4:1. A las 24 hrs se repitió la aplicación de una segunda dosis sensibilizante igual que la primera. Al quinto día después de iniciar la sensibilización, se aplicó en la cara externa de la oreja derecha de cada ratón la dosis reveladora de 10 µl de DNFB al 0.2% (v/v) en el mismo solvente.

Antes de aplicar la dosis sensibilizante, se midió el grosor de la oreja derecha de cada ratón (medición basal), a las 48 hrs después de aplicar la dosis reveladora se midió nuevamente el grosor de la misma oreja con un micrómetro de precisión a presión constante regulada por su muelle. Las lecturas del grosor se obtuvieron en centésimas de milímetro --

(0.01 mm), y se realizaron en cinco ocasiones cada vez para mayor precisión de la medición y la medida consignada fue el promedio de ellas en cada ratón.
Los resultados se analizaron estadísticamente por la prueba "t" de Student.

CELULAS FORMADORAS DE PLACAS DE HEMOLISIS (CFPH).

Las células formadoras de placas se determinaron de acuerdo con el método de Cunningham[41]. Los ratones se inmunizaron con 0.5 ml de eritrocitos de carnero (EC) al 10% por vía i.p. Cinco días después los animales fueron descerebrados para obtener y homogeneizar sus bazos. Las células se resuspendieron a una concentración del 5% en SSBH (v/v). Las cámaras se realizaron por duplicado para cada animal.

Las cámaras que se utilizaron para esta prueba constaban de dos portaobjetos previamente desengrasados que se colocaron uno sobre otro, unidos por tres tiras de cinta scotch de doble pegamento colocadas entre ambos portaobjetos, en cada extremo y en el centro de ellos. Se dejó un desnivel de 1 mm en sus bordes superior e inferior. Las tiras de pegamento medían 26 X 6.5 mm c/u dejando un espacio entre ambos portaobjetos que constituyó la cámara que a su vez se dividió en dos compartimentos, los cuales se llenaron con la preparación celular.

Preparación Celular.

En un tubo de ensaye (12 X 75 mm) se colocaron 200 µl de la suspensión de células esplénicas al 5%, a la cual se le agregaron 120 µl de SSBH, 20 µl de suero de cobayo como fuente de complemento y 20 µl de EC al 20%. Con esta mezcla se llenaron los dos compartimentos de cada cámara (100 µl en c/u) con una jeringa provista de aguja 25 X 16. Los bordes superiores e inferiores de las cámaras se sellaron con una mezcla de vaselina-parafina al 50% fundida a 45ºC. Las cámaras se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 37ºC durante 1 hr. Al concluír este tiempo se contaron las placas de hemólisis en cada cámara y se obtuvo el promedio correspondiente para cada ratón. Los resultados se expresaron como células formadoras de placas de hemólisis por bazo (CFPH/bazo), para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

CFPH/bazo = No. de CFPH X cámara X factor de conversión.

Factor de conversión = 1/0.2 X 20 X 5 = 500

1 = valor para referir las CFPH/ml.

0.2 = valor aplicado en cada cámara.

20 = valor de la dilución final del bazo.

5 = volumen inicial de la suspensión del bazo.

CFPH/bazo = No. de CFPH X cámara X 500

Los resultados se analizaron estadísticamente por la prueba - "t" de Student. Para ello se compararon los resultados de - los diferentes grupos con sus testigos correspondientes y se determinó que el grado de significancia de las diferiencias - fuera de p 0.05 como mínimo.

RESULTADOS.

INMUNIDAD CELULAR.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la prueba de hipersensibilidad retardada a DNFB. Los ratones tratados con sobrenadante de cultivo de linfoblastos L5178Y estimulados o no con PHA (Grupos 1 y 2), no mostraron diferiencia estadística entre ellos, ni con los ratones tratados con medio de cultivo (Grupo 3) en lo referente a la respuesta inmune celular a DNFB.

Igualmente se observa que los ratones tratados con líquido ascítico (Grupo 4) tuvieron una respuesta a DNFB estadísticamente más elevada (p 0.001) con respecto al Grupo 5 tratado con NaCl.

Asimismo, el grupo tratado con suero de ratones con linfoma L5178Y se comportó de igual forma que los ratones tratados con suero normal (Grupo 7). Ya que su respuesta a DNFB no mostró diferiencia estadística significativa.

INMUNIDAD HUMORAL.

La Tabla 2 muestra los resultados de la prueba de CFPH. En relación con esta prueba se observó que tanto los grupos tratados con sobrenadante de cultivo estimulado o no con PHA -

TABLA No. 1

HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A DNFB EN RATONES TRATADOS CON SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LINFOBLASTOS L5178Y, ESTIMULADOS O NO CON PHA (GRUPOS 1 Y 2), CON LIQUIDO DE ASCITIS (GRUPO 4) O CON SUERO DE RATONES CON LINFOMA L5178Y (GRUPO 6) Y SUS RESPECTIVOS TESTIGOS (GRUPOS 3,5,7).

GRUPO	N	TRATAMIENTO	MEDICIONES* BASAL	48 HRS	"t"	"p"
1	20	SOBRENADANTE PHA	23 ± 2.0	40 ± 4.0	1vs2	ns
2	20	SOBRENADANTE SIN PHA	23 ± 3.0	40 ± 3.0	2vs3	ns
3	20	MEDIO DE CULTIVO	22 ± 1.0	40 ± 3.0	1vs3	ns
4	10	LIQUIDO ASCITICO	21 ± 0.8	40 ± 0.6	4vs5	0.001
5	10	SOLUCION SALINA	21 ± 0.5	35 ± 0.9		
6	10	SUERO RATON CON LINFOMA	27 ± 0.0	37 ± 0.8	6vs7	ns
7	10	SUERO RATON SANO	21 ± 0.5	36 ± 0.6		

*Los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar de las mediciones del grosor de una oreja de los ratones antes de sensibilizarlos con DNFB (basal) y 48 hrs después de la prueba reveladora de la sensibilización.

ns = no significativo.

TABLA No. 2

CFPH EN RATONES TRATADOS CON SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE LINFOBLASTOS L5178Y, ESTIMULADOS O NO CON PHA (GRUPOS 1 Y 2), CON LIQUIDO DE ASCITIS (GRUPO 4) O CON SUERO DE RATONES CON LINFOMA L5178Y (GRUPO 6) Y SUS RESPECTIVOS TESTIGOS (GRUPOS 3,5,7).

GRUPO	N	TRATAMIENTO	*CFPH/BAZO	"t"	"p"
1	20	SOBRENADANTE PHA	71,500 ± 47,500	1vs2	ns
2	20	SOBRENADANTE SIN PHA	69,500 ± 42,600	2vs3	ns
3	20	MEDIO DE CULTIVO	70,500 ± 49,000	1vs3	ns
4	10	LIQUIDO ASCITICO	95,500 ± 22,500	4vs5	0.005
5	10	SOLUCION SALINA	72,000 ± 9,500		
6	10	SUERO RATON CON LINFOMA	88,000 ± 30,500	6vs7	ns
7	10	SUERO RATON SANO	74,000 ± 12,300		

*Los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar.

ns = no significativo.

(Grupos 1 y 2) como el Grupo 6 tratado con suero de ratón, no tuvieron diferiencia estadística significativa en el número de CFPH al compararse con sus respectivos testigos (Grupos 3 y 7). En cambio el Grupo 4 de ratones tratados con líquido ascítico tuvieron una mayor cantidad de CFPH que el Grupo 5 tratado con NaCl. Esta diferiencia fue estadísticamente significativa con una p 0.005.

SOBREVIDA DE RATONES TRATADOS CON SOBRENADANTE DE CULTIVO.

Los Grupos 8 y 9 de ratones tratados con sobrenadante de cultivo de linfoblastos L5178Y viables sobrevivieron el mismo tiempo (13 y 14 $\pm$ 1 días) que los ratones tratados con medio de cultivo (Grupo 10) que sobrevivieron 13 $\pm$ 1 días, según se puede observar en la Tabla 3.

TABLA No. 3

SOBREVIDA DE RATONES RETADOS CON 3 X 10^7 LINFOBLASTOS L5178Y VIABLES, DESPUES DE SER TRATADOS CON 5 DOSIS DE 0.6 ML DE SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LINFOBLASTOS L5178Y.

GRUPO	N	TRATAMIENTO	SOBREVIDA (días)*
8	10	SOBRENADANTE PHA	13 ± 1
9	10	SOBRENADANTE SIN PHA	14 ± 1
10	10	MEDIO DE CULTIVO	13 ± 1

*Los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar de los días de sobrevida después de recibir el reto - con linfoblastos L5178Y.

DISCUSION.

La presencia de factores inmunomoduladores en el suero y en el líquido de ascítis de ratones con tumores incluyendo el linfoma L5178Y ha sido informado por diversos autores[42-46]. Sin embargo, el origen de ellos se ha establecido parcialmente. Por una parte, la liberación de prostaglandinas[3-5,28,31], interleucinas[5,22] y complejos inmunes[6,30] en los que se ha mostrado un efecto inmunomodulador importante, son producto de la interacción de células tumorales o de sus antígenos de superficie con las células y/o sustancias séricas del animal con tumor[32,47,48]. Pero por otro lado, es probable que no sólo las células tumorales y/o células del huésped tengan interacciones en forma directa, sino que éstas sean mediadas por factores liberados por las propias células tumorales tanto en el linfoma L5178Y como en otros tumores[49]. Además estos factores pueden tener un efecto modulador *per se* de la respuesta inmune de los animales portadores del tumor.

Con el propósito de saber si dichos factores eran producidos por los linfoblastos L5178Y y mostraban algún efecto sobre la respuesta inmune, en este trabajo se cultivaron *in vitro* los linfoblastos L5178Y en presencia o no de PHA y los sobrenadantes de los cultivos fueron inoculados en ratones singénicos, a los cuales se les valoraron las respuestas inmunes celular y humoral.

Asimismo se inocularon ratones con líquido de ascítis o suero de ratones con linfoma L5178Y, con el objeto de conocer el efecto de factores inmunomoduladores contenídos en estos fluídos.

Por un lado la inoculación del sobrenadante de los cultivos de linfoblastos no mostró modificación alguna de la respuesta inmune de los ratones tratados, por lo que de producirse algún factor inmunomodulador por los linfoblastos L5178Y, no fué detectado por las valoraciones de hipersensibilidad retardada a DNFB ni por la prueba de CFPH. En cambio cuando se aplicó líquido de ascítis o suero de los ratones con tumor, se observó elevación de la respuesta a DNFB y en la formación de placas de hemólisis, aunque sólo fue significativa estadísticamente en los ratones tratados con líquido de ascítis.

En diversos estudios se ha señalado una modulación negativa de la respuesta inmune por factores séricos provenientes de individuos o animales de experimentación, con diferentes tipos de tumores, inclusive el linfoma L5178Y[6,28,30,31]. Sin embargo, los resultados de este trabajo en lo referente al tratamiento con líquido de ascítis, señalan que existe un aumento en la reactividad inmunológica (modulación positiva) cuando se transfiere suero o líquido de ascítis, lo cual difiere con lo señalado en estudios previos[6,30,33]. Aunque queda por determinar si esta elevación de la respuesta inmune es benéfica para el huésped al ser retado con linfoblastos viables.

CONCLUSIONES.

Los factores liberados en los sobrenadantes de cultivo por los linfoblastos L5178Y cuando se estimularon o no con PHA, no mostraron algún efecto perceptible sobre las respuestas inmunes celular y humoral.

Por otra parte se observó que los ratones tratados con líquido ascítico tuvieron un aumento significativo en las respuestas inmunes celular y humoral.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ahmed,K., Turk,J.L.: Effect of anticancer agents neothramycin, aclacinomycin, FK-565 and FK-156 on the release of interleukin-2 and interleukin-1 in vitro. Cancer Immunol. - Immunotherapy. 28 : 87-92, 1989.

2. Brown,J.M., Rosenberg,S.A.: Serologic analysis of human solid tumors Ags. En Mihich,E. Ed. Immunological approaches to cancer therapeutics. New York. John Wiley and sons. 1--30, 1982.

3. Grinwich,K.D., Plescia,O.J.: Tumor mediated immunosuppre--ssion: prevention by inhibitors of prostaglandin synthesis. Prostaglandins. 14(6): 1175-82, 1977.

4. Plescia,O.J., Pontieri,G.M., Brown,J., Ippoliti,F., Bellelli,L., Sezzi,M.L., Lipari,M.: Amplification by macrophages of prostaglandin-mediated immunosuppression in mice - bearing tumors. Prostaglandins leukotrienes Med. 16: 205 - 23, 1984.

5. Berendt,M.J., North,R.J.: T-cell mediated suppression of - antitumor immunity. J. Exp. Med. 151:69-80, 1980.

6. Jessup,J.M., Kahan.B.D. et al.: Mechanisms of immunosuppression in tumor bearing mice. Cancer. 49: 1158-67, 1982.

7. Stites,D.P., Fudenberg,H.H., Stobo,J.D., Wells,J.V.: Inmunología básica y clínica. Ed. Manual Moderno. 1983.

8. Wolfang,J.K., Willett,P.H., Amos,P.B.: Microbiología Zinsser. Ed. Med. Panamericana, 1983.

9. Land,H., Parada,L.F., Weinberg,R.A.: Cellular oncogenes - and multistep carcinogenesis. Science. 222: 771-78, 1983.

10. Calabresi,P.: Medical Oncology: Basic principles and clinical managment of cancer. New York. McMillan. 1985.

11. Frost,P., Kerbel,R.S.: Immunology of metastasis: the immune response cope with disseminated tumors. Cancer. Met. - Rev. 2: 239-56, 1983.

12. Liotta,L.A.: The mechanism of cancer invasion and metastasis. Philadelphia, Lippincott. 28-41, 1985.

13. Greenberg,D.P.: Tumor immunology. Stites,D.P., Stobo,J.D. Wells,J.V. Ed. Basic and clinical immunology. Norwalk - Conneticut/Los altos California. Appleton and Iange. 186-196, 1987.

14. Ehrlich,P.: On immunity with special reference to cell life. Proc. R. Soc. London. 66: 424, 1900.

15. Jimenez,J.J.:Tumor cell rejection through terminal cell - differentiation. Science. 238: 1278-80, 1987.

16. Bishop,J.M.: Cellular oncogenes and retrovirus. Ann. Rev. Biochem. 52: 301-54, 1983.

17. Weinberg,R.A.: The action of oncogenes in the citoplasm - and nucleus. Science. 230: 770-76, 1985.

18. Paul,J.: In theories of carcinogenesis. Washington,D.C. - Inversen,O.H. Ed. Hemisphere. 45-60, 1988.

19. Tapia,A.G., Arellano,V.J., Gómez,E.H., Fernández,Q.P., - González,G.T., Ochoa,D.H., Antillan,A.: Partículas viroi-

des tipo a y c en el linfoma murino L5178Y. Arch. Invest. Med. 7: 9-16, 1976.

20. Myrvil,N.Q., Weiser,S.R.: Fundamentals of immunology. Edited by Lead and Febiger. 1984.

21. Cheever,M.A., Greenberg,P.D., Fefer,A.: Potential for specific cancer therapy with immune T lymphocytes. J.Biol. - Response Med. 3: 113, 1984.

22. Lotzová,E.: Interleukin-2 generated killer cells, their - characterization and role in cancer therapy. Cancer Bull. 39: 30-38, 1987.

23. Doherty,P.C., Kowles,B.B., Wettstein,P.T.: Immunological survilance of tumors in the context of major histocompatibility restriction of T cell function. Ad. Cancer. Res. - 42: 1134-38, 1984.

24. Oldham,R.K.: Monoclonal antibodies in cancer therapy. J. Clin. Oncol. 1: 582, 1983.

25. McRipley,R.J., Selvaraj,R.J., Glovsky,M.M., Sbarra,A.J. : The role of the phagocyte in host-parasite interactions. V. Phagocytic and Bactericidal Activities of leucocytes - from patients with different neoplastic disorders. Cancer Res. 27: 674-685, 1967.

26. Murray,H.W., Cohn,Z.A.: Mononuclear phagocyte antimicrobial and antitumor activity: The role of oxigen intermediates. J. Invest. Dermat. 74: 285-288, 1980.

27. Slamon,D.J., De Kernion,J., Verna,I.M.: Expression of ce-

llular oncogenes in human malignancies. Science. 224: 256 262, 1984.

28. Cheng-Ming,L., Takeshi,O. et.al.: Immune regulation of - the L5178Y murine tumor-dormant state. J. Exp.Med. 164 : 1259-73, 1986.

29. Goodenow,R.S., Vogel,J.M., Linsk,R.L.: Histocompatibility antigens on murine tumors. Science. 230: 777-783, 1985.

30. Gautam,S.C.: Production of immunosuppressive factor(s) by a weakly immunogenic fibrosarcoma T241. Anticancer. Res. 3: 263-268, 1983.

31. Matthews,C.J., Searle,R.F.: The role of prostaglandins in the immunosuppressive effects of supernatants from adhe-- rent cells of murine decidual tissue. J. Reprod. Imm. 12: 109-124, 1987.

32. Gabbert,H.: Mechanisms of tumor invasion: evidence from - in vivo observations. Cancer. Met. Rev. 4:283-310, 1985.

33. Ishida,N.: Isolation of factor responsible for the immu-- nosuppression found in tumor bearing animals. Yakugaku - Zasshi. 105: 91-108, 1985.

34. Thorn,N.G., Adams,D.R., Braunwald,E., Isselebacher,J.K.,- Petersdorf,G.R.: Harrison's Principles of Internal Medicine. Ed. McGraw-Hill Inc. 1982.

35. Gómez,E.H., Acosta,R.R., Ramos,D.M., Alpuche,V.J., González,M.R., Rayón,R.F.: Radiosensibilidad de las células - del linfoma murino L5178Y. Arch. Invest. Med. 10: 187 , 1979.

36. Ramos,D.M., Gómez,E.H., Acosta,R.R., Díaz,E.F., Vázquez, E.C.: Incremento del crecimiento del linfoma murino L5178Y por inmunización con células L5178Y radiadas. Arch. Inve. Med. 13: 29, 1982.

37. Bravo,C.A., Gómez,E.H., Ramos,D.M.: Aumento del crecimiento del linfoma L5178Y por inmunización con antígenos placentarios. Arch.Invest. Med. 13: 191, 1982.

38. Manson,L.A., Foschi,G.V., Duplan,J.F.: Isolation of transplantation antigens fron a cultured lymphoblast L5178Y. - Nature. 188: 598, 1960.

39. Nowell,P.C.: Phytohemagglutinin an initiator of mitosis - in cultures of normal human leucocytes. Cancer. Res. 20 : 462, 1960.

40. Gómez,E.H., Daneri,N.A.: Inhibición de la reacción de hipersensibilidad celular al dinitrofluorobenceno con peryodato de sodio. Arch. Invest. Med. 14: 351-361, 1983.

41. Cunningham,A.J., Szenberg,A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming - cells. Immunology. 14: 599-600, 1968.

42. Takano,S., Umenai,T., Tanaka,K., Ishida,U.: Isolation of a factor from cancer ascitic fluid increasing susceptibility of mice to listeria infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 174(1): 65-73, 1983.

43. Kumar,R.K., Lykke,A.W., Penny,R.: Immunosuppression associated with SJL/J murine lymphoma II. Characterization of

a plasma suppressor factor in tumor bearing mice. JNCI. - 67(6): 1277-82, 1981.

44. Kamo,I., Friedman,H.: Differential immunosuppressive - effects of ascites fluid from mastocytoma bearing mice in primary vs. secundary immunocuyte response. J. Immunol. - 120(2): 558-62, 1978.

45. McMaster,R., Buhler,K., Whitney,R., Levy,J.G.: Immunosu-- ppression of T lymphocyte function by fractionated serum from tumor bearing mice. J. Immunol. 118(1): 218-22, 1977.

46. Kilburn,D.G., Fairhurst,M., Levy,J.C., Whitney,R.B.: Sy-- nergism between immune complexes and serum from tumor bearing mice in the suppression of mitogen responses. J. - Immunol. 117(5 pt 1): 1612-7, 1976.

47. Greene,I.M., Shigeyoshi,F., Sehon,A.H.: Regulation of the immune response to tumor antigens. III. Characterization of thymic suppressor factor(s) produced by tumor bearing hosts. J. Immunol. 119(2): 757-764, 1977.

48. Pikovski,M.A., Ziffroni-Gallon,Y., Witz,I.P.: Suppression of immune response to sheep red blood cells in mice treated with preparations of a tumor cell component and in tumor bearing mice. Eur. J. Immunol. 5(7): 447-50, 1976.

49. Katzmann,J.A.: Myeloma-induced immunosuppression: A multistep mechanism. J. Immunol. 121(4): 1405-9, 1978.

Guadalajara, Jal. 26 de Febrero de 1990.

ING. ADOLFO ESPINOSA DE LOS MONTEROS CARDENAS.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS.
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
P R E S E N T E.

Por medio de la presente comunico a usted que la pasante de Biología María de Lourdes Fernández Torres, número de código 081225516 ha terminado satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado "ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN RATONES TRATADOS CON SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LEUCOBLASTOS L5178Y" , la cual se desarrollo en el Lab. de Morfología Celular, Fac. de Ciencias. U de G. y en la división de Patología de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente. IMSS. Bajo la dirección del M. en C. Genaro Gabriel Ortíz y el M. en C. Rodolfo Ramos Zepeda.

Sin otro particular, reiterándole un cordial saludo quedo de usted.

A T E N T A M E N T E.

M. en C. Genaro Gabriel Ortíz.
Director de la Tesis.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente .....
Número 1510/89

SRITA. MARIA DE LOURDES FERNANDEZ TORRES
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN RATONES TRATADOS CON SO__ BRENADANTE DE CULTIVO DE LEUCOBLASTOS L5178Y" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al M.en C. Genaro Gabriel Ortiz.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Noviembre 28 de 1989
EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS
EL SECRETARIO

M.EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El M.en C. Genaro Gabriel Ortiz, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Boulevard a Tlaquepaque y Corregidora, S. R. Teléfonos 19-80-54 y 19-82-92
Guadalajara, Jal.