

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE POSTGRADO



IDENTIFICACION DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA  
ACTIVACION DE MACROFAGOS PRESENTE EN EL  
LIQUIDO DE ASCITIS DEL TUMOR L5178Y

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
INMUNOBIOLOGIA

POR

BIOL. REBECA PALACIOS CORONA

Monterrey, N. L. México

Septiembre de 1996

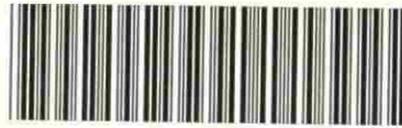
TM

Z5320

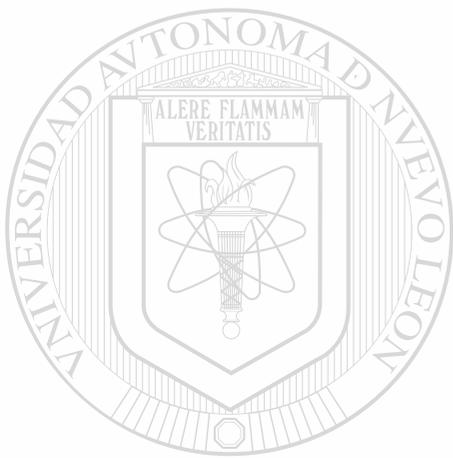
FCB

1996

P3



1020116697



# UANL

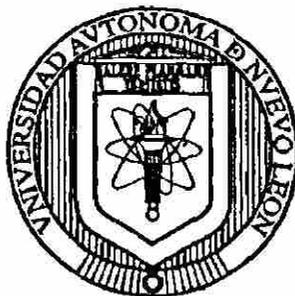
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
*DIVISION DE POSTGRADO*



**IDENTIFICACION DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA  
ACTIVACION DE MACROFAGOS PRESENTE EN EL  
LIQUIDO DE ASCITIS DEL TUMOR L5178Y**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR  
AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
INMUNOBIOLOGIA  
POR**

**BIOL. REBECA PALACIOS CORONA**

Monterrey, N.L. México

Septiembre de 1996.

TM  
Z5320  
FCD  
1996  
P3

0116-19160

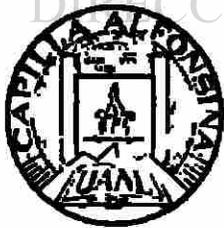


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

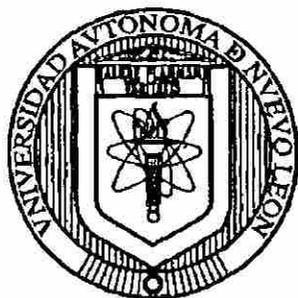
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**FONDO TESIS**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
*DIVISION DE POSTGRADO*



**IDENTIFICACION DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA  
ACTIVACION DE MACROFAGOS PRESENTE EN EL  
LIQUIDO DE ASCITIS DEL TUMOR L5178Y**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**POR**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**  
**BIOL. REBECA PALACIOS CORONA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra.Ma.Teresa González Garza y Barrón**

Monterrey, N.L., México.

Septiembre de 1996.

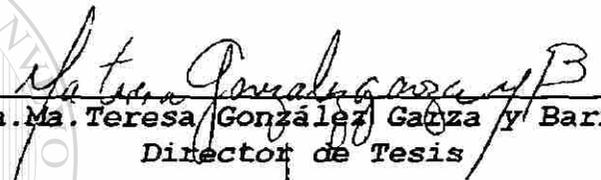
**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
*DIVISION DE POSTGRADO*

**IDENTIFICACION DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA ACTIVACION DE  
MACROFAGOS PRESENTE EN EL LIQUIDO DE ASCITIS DEL TUMOR  
L5178Y**

**TESIS**

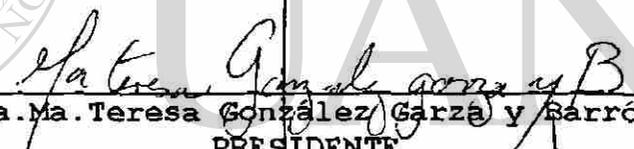
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA.**

**POR**  
**BIOL. REBECA PALACIOS CORONA**



**Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón**  
**Director de Tesis**

**APROBACION DE COMISION DE TESIS:**



**Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón**  
**PRESIDENTE**



**Dra. Cristina Rodríguez**  
**Padilla**  
**SECRETARIO**



**Dr. Reyes S. Tamez Guerra**  
**VOCAL**

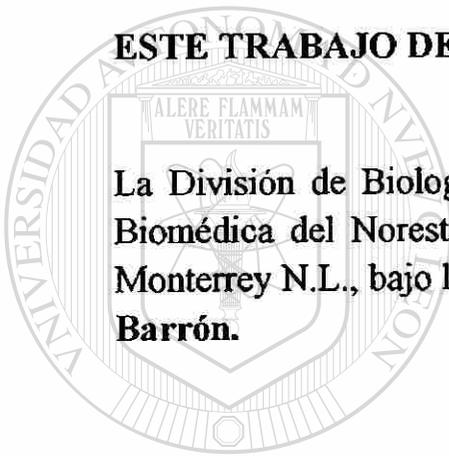


**Dr. Vianney Ortiz Navarrete**  
**ASESOR EXTERNO**

**Monterrey N.L., México.**

**ESTE TRABAJO DE INVESTIGACION FUE REALIZADO EN:**

La División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey N.L., bajo la dirección de la **Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón.**



UANL

---

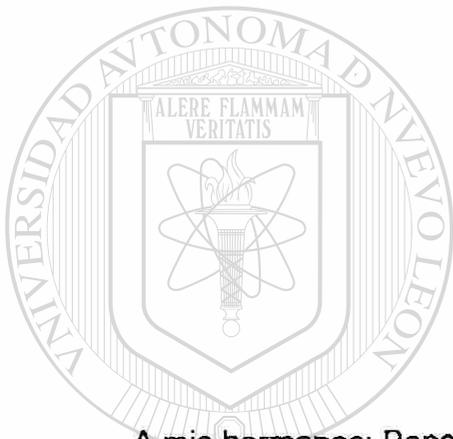
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## DEDICATORIAS

Con cariño le dedico esta Tesis a dos personas muy importantes para mi y que son mi motivo de inspiración: Mi esposo Alfonso Naranjo Carmona y a mi hijo Alan Naranjo Palacios



A mis padres, José Palacios Alvarado y Lilia Corona Ahuatzi, a quienes admiro, respeto y debo mi formación y mi carrera. A pesar de la distancia que nos separa, siempre están conmigo.

A mis hermanos: Pepe, Lilia, Yuli, Angélica y Beto. Todos ellos compartieron grandes momentos de mi vida.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A todos mis familiares y amigos, que de alguna forma siempre me han apoyado

A DIOS porque lo amo y por permitirme estar aquí

## INDICE

|   |      |
|---|------|
| DEDICATORIAS  | I    |
| INDICE  | II   |
| LISTA DE ABREVIATURAS   | IV   |
| LISTA DE FIGURAS  | VI   |
| LISTA DE TABLAS   | VII  |
| AGRADECIMIENTOS   | VIII |
| RESUMEN   | 1    |
| ANTECEDENTES  | 4    |
| A. Características generales del sistema fagocito mononuclear   | 6    |
| B. Papel de los macrófagos en la respuesta inmune hacia tumores   | 7    |
| C. Intermediarios de nitrógeno reactivos (INR), como productos de secreción debido a la acción de los macrófagos contra las células tumorales | 8    |
| D. Evasión de la respuesta inmune por las células tumorales   | 9    |
| E. Antecedentes clínicos de la inhibición de la respuesta inmune inducida por las células tumorales   | 9    |
| F. Antecedentes experimentales (modelos animales) de la inhibición de la respuesta inmune inducida por las células tumorales                  | 12   |
| G. Antecedentes directos  | 16   |
| H. Planteamiento  | 16   |
| HIPOTESIS   | 17   |
| OBJETIVO GENERAL  | 17   |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 17   |
| MATERIAL Y METODOS  | 18   |
| MATERIALES  | 19   |
| A. Origen de los reactivos  | 19   |
| B. Equipo de trabajo  | 20   |
| C. Animales de laboratorio  | 20   |
| METODOS   | 21   |
| A. Preparación del medio de cultivo RPMI-1640   | 21   |
| B. Composición y preparación de las soluciones  | 22   |
| C. Determinación de nitritos por la técnica de Griess(Stuehr, 1989)   | 22   |
| D. Cuantificación de proteínas  | 23   |
| E. Método de ultrafiltración  | 27   |
| F. Cromatografía por filtración en gel, en columna de Sephadex G-25 y G-50.   | 27   |
| G. Método de licuación  | 28   |

|   |           |
|---|-----------|
| H. Método de diálisis   | 28        |
| I. Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) en fase reversa   | 28        |
| J. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, PAGE-SDS (Laemmli, 1970)   | 29        |
| K. Linfoma L5178Y   | 35        |
| L. Aislamiento y cultivo de los macrófagos peritoneales normales  | 35        |
| M. Aislamiento y cultivo de los macrófagos peritoneales de linfoma  | 35        |
| N. Activación de los macrófagos peritoneales  | 36        |
| Ñ. Inhibición de los macrófagos peritoneales por las fracciones   | 36        |
| O. Análisis estadístico de los resultados   | 36        |
| <b>RESULTADOS</b>   | <b>38</b> |
| A. Obtención de las fracciones S1 y S2 a partir del linfoma L5178Y  | 40        |
| B. Incubación de los macrófagos con las fracciones S1 y S2 antes y después de su activación con LPS y/o IFN- $\gamma$ | 40        |
| C. Cromatografía de la fracción S1 en Sephadex G-50   | 41        |
| D. Ultrafiltración  | 45        |
| E. Estabilidad de la fracción S1-10   | 45        |
| F. Fraccionamiento de la fracción S1-10 por cromatografía en columna  | 45        |
| G. Cromatografía en HPLC en fase reversa de la fracción 1-G-25  | 49        |
| H. Cromatografía en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) al 15% de la fracción inhibidora                                 | 51        |
| I. Purificación y actividad relativa.   | 53        |
| <b>DISCUSION</b>  | <b>55</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>62</b> |
| <b>PERSPECTIVAS</b>   | <b>64</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>   | <b>66</b> |

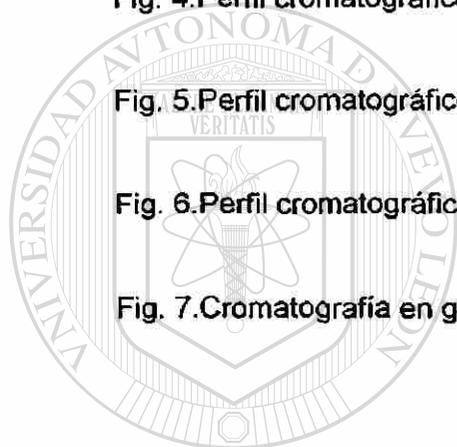
## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| Cel           | Células   |
| CFP           | Células formadoras de placa                                     |
| CGRP          | Péptido relacionado al gen calcitonin                           |
| cm            | Centímetros   |
| c/u           | cada uno  |
| EAC           | Acido epsilon amino caprónico                                   |
| EDTA          | Acido etilen diámino tetracético                                |
| FIAML         | Factor inhibidor de la activación de los macrófagos del linfoma |
| FMLP          | N-formil-metionil-leucil-fenil-alanina                          |
| Fc            | Fragmento cristalino  |
| g             | gramos  |
| GM-CSF        | Factor estimulador de colonias de macrófagos y                  |
| HPLC          | Cromatografía de líquidos de alta presión                       |
| IFN- $\gamma$ | Interferón-gama   |
| IL-2          | Interleucina 2  |
| IL-4          | Interleucina 4  |
| IL-10         | Interleucina 10   |
| INR           | Intermediario de nitrógeno reactivo                             |
| IOR           | Intermediario de oxígeno reactivo                               |
| kDa           | Kilo daltons  |
| M             | Concentración Molar   |
| MDF           | Factor desactivador de macrófagos                               |
| MHC           | Complejo principal de histocompatibilidad                       |
| mA            | Miliampers  |
| mg            | Miligramos  |
| min           | minutos   |
| ml            | Mililitros  |
| mm            | Milímetros  |
| mM            | Milimolar   |

|                |   |
|----------------|---|
| N              | Concentración normal                                  |
| NK             | Células Asesinas Naturales                            |
| nm             | nanómetros  |
| PBS            | Solución amortiguadora de fosfatos                    |
| pH             | Potencial de hidrógeno                                |
| PHA            | Fitohemaglutinina                                     |
| PM             | Peso molecular  |
| PMA            | Acetato de forbol miristato                           |
| P1             | precipitado o fracción celular del líquido de ascitis |
| rIFN- $\gamma$ | Interferón-gama recombinante                          |
| SAB            | Seroalbúmina bovina                                   |
| SDS            | Dodecil sulfato de sodio                              |
| seg            | Segundos  |
| SI             | Substancia inmunosupresora                            |
| S1             | Sobrenadante del líquido de ascitis                   |
| S2             | Sobrenadante de la fracción P1                        |
| S1-10          | Fracción menor de 10 kDa                              |
| T.A.           | Temperatura ambiente                                  |
| TEMED          | N-N'-N'-tetrametil etilen diamino                     |
| TFA            | Acido trifluoroacético                                |
| TGF- $\beta$   | Factor de crecimiento transformante-beta              |
| TNF            | Factor de necrosis tumoral                            |
|                | granulocitos  |
| UI             | Unidades internacionales                              |
| Xg             | Centrifugación relativa                               |
| °C             | Grados centígrados                                    |
| $\mu$ l        | Microlitros   |
| $\mu$ M        | Micromoles  |
| $\mu$ m        | Micrometros   |
| %              | Por ciento  |
| 1-G-25         | Pico 1 obtenido por cromatografía en Sephadex G-25    |
| 2-HPLC-C-18    | Pico 2 obtenido por HPLC                              |

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Diagrama de flujo de la obtención de los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c sanos y de ratones portadores del linfoma. 37
- Fig. 2. Diagrama de flujo de la obtención del FIAML a partir del linfoma L5178Y. 39
- Fig. 3. Perfil cromatográfico de la fracción S1 en la columna de Sephadex G-50. 44
- Fig. 4. Perfil cromatográfico de la fracción S1-10 en la columna de Sephadex G-50. 47
- Fig. 5. Perfil cromatográfico de la fracción S1-10 en la columna de Sephadex G-25. 48
- Fig. 6. Perfil cromatográfico de la fracción 1-G-25 en HPLC. 50
- Fig. 7. Cromatografía en gel de acrilamida al 15% de la fracción 1-G-25. 52



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## LISTA DE TABLAS

|             |   |                 |
|-------------|---|-----------------|
| Tabla I.    | Determinación de proteínas por el método de Lowry   | 25              |
| Tabla II.   | Determinación de proteínas por el método de Hartree   | 26              |
| Tabla III.  | Actividad inmunosupresora <i>in vitro</i> de las fracciones S1 y S2 de linfoma L5178Y sobre los macrófagos obtenidos en ratones BALB/c sanos y portadores del linfoma, activados con LPS.                               | 42              |
| Tabla IV.   | Actividad inmunosupresora <i>in vitro</i> de las fracciones S1 y S2 BALB/c de linfoma L5178Y sobre los macrófagos obtenidos en ratones sanos y portadores del linfoma, activados con IFN- $\gamma$ .                    | 42              |
| Tabla V.    | Actividad inmunosupresora <i>in vitro</i> de las fracciones S1 y S2 de linfoma L5178Y sobre los macrófagos obtenidos en ratones BALB/c sanos y portadores del linfoma, activados con la mezcla de LPS e IFN- $\gamma$ . | 43              |
| Tabla VI.   | Actividad inmunosupresora <i>in vitro</i> de las fracciones: S1-100, S1-10-100 y S1-10 (ultrafiltración) de linfoma L5178Y sobre los macrófagos obtenidos en ratones BALB/c portadores del linfoma activados con LPS.   | 46              |
| Tabla VII.  | Actividad inmunosupresora <i>in vitro</i> de las fracciones: S1-10 termoestable (56 ° C/30 min.), y liofilizada, sobre los macrófagos obtenidos en ratones BALB/c portadores del linfoma, activados con LPS.            | 46              |
| Tabla VIII. | Actividad inmunosupresora <i>in vitro</i> de las fracciones: Pico1, pico 2 y pico 3 (Sephadex G-25) de linfoma L5178Y sobre macrófagos obtenidos en ratones BALB/c portadores del linfoma, activados con LPS.           | 49 <sup>®</sup> |
| Tabla IX.   | Actividad inmunosupresora <i>in vitro</i> de las fracciones: Pico1, pico 2, pico 3 y pico 4 (HPLC) de linfoma L5178Y sobre los macrófagos obtenidos en ratones BALB/c portadores del linfoma, activados con LPS.        | 51              |
| Tabla X.    | Tabla comparativa de las concentraciones necesarias de las diferentes fracciones con las que se obtuvo una actividad inhibitoria.   | 54              |
| Tabla XI.   | Reguladores negativos de la activación de los macrófagos.   | 60              |

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada para la realización del presente trabajo.

Doy las gracias al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por haberme permitido desarrollar el trabajo de Tesis en sus instalaciones.

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas por todo el apoyo y colaboración en el trabajo de Tesis de Investigación.

Quiero agradecer especialmente a dos personas, mis padres, que me han dado todo lo que han podido y más, en todo el tiempo que viva no terminaré de agradecerles su amor, su apoyo y su motivación, etc. Gracias por todo.

Agradezco de manera muy especial y con todo mi amor a mi esposo Alfonso y a mi hijo Alan, por estar conmigo en todos los momentos de mi vida y por darme su amor, paciencia, comprensión, ayuda, etc. Puedo decir que juntos hemos superado los malos ratos y disfrutamos los buenos momentos que implicó la elaboración de este trabajo y logramos llegar felizmente a su fin, concluyendo así una etapa más en mi formación profesional.

Quiero expresar mi reconocimiento, respeto y gratitud a la Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón por su apoyo y disposición en todo momento. Su asesoría y consejos han sido fundamentales para que esta etapa en mi formación académica culmine exitosamente. También quisiera agradecerle el haber sido para mí como una amiga que me brindó su afecto y comprensión.

A la M.C. Cristina Rodríguez Padilla por todo su apoyo y por la aportación de sus conocimientos y valiosas sugerencias para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Reyes S Tamez Guerra por la revisión, colaboración y sugerencias en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Vianney Ortiz por la amistad, el tiempo, el interés y la confianza brindada para la realización de este Trabajo de Investigación, sus valiosas sugerencias apoyaron substancialmente dicho trabajo.

Al Dr. Armando Isibasi por haberme permitido la realización de parte de la Investigación en sus instalaciones y por la colaboración y facilidades prestadas.

Al personal de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI, particularmente a la Q.B.P. Carmen Maldonado por su amistad y colaboración en la purificación del FIAML.

Al M.V.Z. Gerardo Lozano Garza por su amistad y su valiosa colaboración.

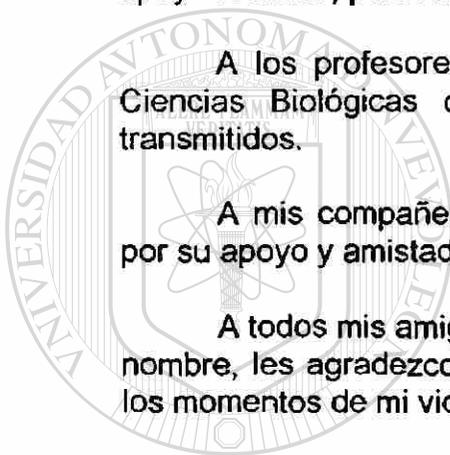
A todo el personal del CIBIN, IMSS, que de alguna u otra forma han contribuido en el desarrollo y realización de esta Tesis.

A todo el personal y grupo de Investigadores del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., por el apoyo recibido, particularmente al M.C. Juan Manuel Alcocer.

A los profesores de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por su amistad y conocimientos transmitidos.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular por su apoyo y amistad.

A todos mis amigos, que no quisiera nombrar por temor a omitir algún nombre, les agradezco su confianza, apoyo y por compartir conmigo todos los momentos de mi vida.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Se ha informado que existe un estado de inmunodepresión tanto en pacientes como en animales portadores de tumores malignos. Estudios *in vitro* con células malignas han demostrado la existencia de factores inhibidores de la activación de los macrófagos en el sobrenadante de los cultivos. Estudios similares con el homogenado celular de algunos tumores de tipo mastocitoma, también han demostrado un efecto inhibitor sobre los macrófagos.

Lo anterior ha sugerido que la célula cancerosa puede producir factores que inhiben las funciones de los macrófagos, y de esta manera aseguran su desarrollo. El objetivo de este trabajo fue identificar en el linfoma L5178Y moléculas que inhiben la actividad de los macrófagos.

Como modelo experimental se utilizaron macrófagos peritoneales de ratones tanto portadores del linfoma como de ratones normales estimulados con tioglicolato. La activación de los macrófagos se midió por la producción de nitritos, la cual fue inducida con lipopolisacáridos (LPS) y/o interferón-gama (IFN- $\gamma$ ).

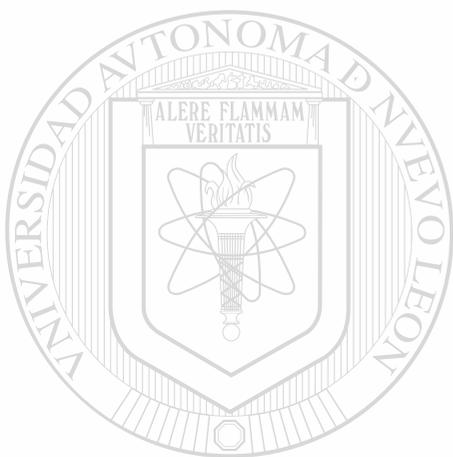
El líquido de ascitis libre de células (S1) y el homogenado celular (S2) se fraccionaron por ultrafiltración con membranas de corte de 10 kDa, cromatografía en columna de Sephadex G-25 y HPLC en fase reversa con una columna NOVA-PAK C-18 y un gradiente de elución de 0 a 40 % de acetonitrilo/0.1% ácido trifluoroacético.

Los resultados mostraron: a) La presencia de un inhibidor de la activación de los macrófagos en el sobrenadante del líquido de ascitis (76.70 % de inhibición) y en el homogenado celular (21.47 % de inhibición), b) No se encontró diferencia en la respuesta de los macrófagos normales y los

macrófagos de linfoma en presencia del inhibidor, c) El inhibidor impide la activación por LPS pero no por IFN- $\gamma$ , d) El inhibidor inhibe la activación pero una vez activados no tiene ningún efecto sobre ellos, d) Por ultrafiltración se obtuvo una fracción menor a 10 kDa con actividad inhibitoria (SI-10), e) La fracción S1-10 sometida a cromatografía en columna en Sephadex G-25 mostró un perfil de 4 picos. La fracción con actividad inhibitoria correspondió al pico 1 (fracción 1-G25). f) El cromatograma de Abs. a 220 nm de la fracción 1-G25 analizada por HPLC en fase reversa presentó un arreglo de 4 picos. La capacidad de estas fracciones para inhibir la producción de nitritos por macrófagos peritoneales solo fue positiva para el pico No. 2 (fracción 2-HPLC-C-18), g). El perfil electroforético del FIAML mostró 4 bandas de 25 a 32 kDa, en condiciones no reductoras y a temperatura ambiente, las cuales probablemente correspondan a los picos observados por HPLC. En condiciones no reductoras y temperatura de ebullición la fracción se polimerizó y/o agregó dando origen a bandas de mayor peso molecular. El grado de purificación obtenida para éste factor fue de 3051 veces. De acuerdo a nuestros resultados el FIAML suprime la activación de los macrófagos pero no induce su desactivación, ésta característica difiere con otros factores de regulación negativa ya descritos; como el TGF- $\beta$  1,2 y 3, el MDF, el CGRP, la IL-4 y la IL-10, los cuales desactivan a los macrófagos pero no inhiben su activación. El linfoma L5178Y expresa los genes que codifican para la IL-10, sin embargo ninguna de sus características físicas o biológicas corresponden a las del FIAML por lo que se descarta la posibilidad de que se trate de esta interleucina.

Este trabajo nos permite establecer la existencia de un factor de regulación negativa en el tumor L5178Y, cuyas características químicas y biológicas difieren de otros factores de origen tumoral reportados en la literatura.

Considerando el alto grado de purificación obtenida del FIAML, el siguiente paso será: por una parte, obtener su secuenciación aminoacídica y su clonación, lo que permitirá buscar en los bancos de información su posible relación con otras proteínas. Por otra parte con esta metodología, obtener suficiente cantidad para inducir anticuerpos monoclonales y usarlos para la búsqueda de este factor tanto en otros linfomas como en otro tipo de tumores malignos. Esto último permitirá establecer si se trata de un factor particular del linfoma L5178Y o si resulta común a otros tumores.



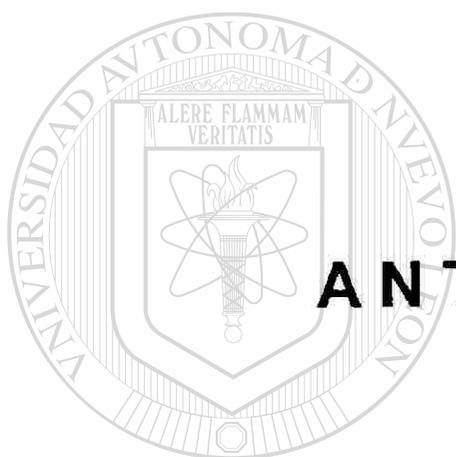
# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# ANTECEDENTES

# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El sistema inmunológico tiene como función principal, la conservación de la integridad del organismo, mediante mecanismos especializados para destruir agentes de origen extrínseco que varían desde pequeñas moléculas, virus, parásitos intracelulares, hongos etc, hasta organismos más complejos como los metazoarios. No obstante, cada vez hay más datos para sugerir que cuando menos, parte del sistema inmunológico pudo haberse formado para combatir a un tipo de parásito mucho más insidioso, cuyo origen está dentro del organismo; como es la célula neoplásica (Gordon, 1975). La respuesta inmune ha sido clasificada en a) natural o inespecífica y b) adquirida o específica. La primera, se encarga de proteger al organismo contra agentes extraños, mediante barreras físicas y químicas, linfocitos NK (Natural Killer) y células fagocíticas, entre otras. Y la segunda es iniciada mediante el reconocimiento de antígenos extraños por linfocitos específicos (Abbas y col., 1991).

La respuesta inmune, se clasifica en ; a) humoral, mediada por anticuerpos y b) celular, mediada por las células del sistema inmune, sensibilizadas específicamente (Bellanti, 1984).

Los principales constituyentes celulares del sistema inmune específico son los linfocitos B, linfocitos T y células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas) ( Roitt y col., 1993).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## A. Características Generales del Sistema Fagocito Mononuclear

El sistema fagocito mononuclear constituye la segunda población celular más importante del sistema inmune y consiste de células que tienen en común, como función primaria, la fagocitosis. Todas las células de éste sistema se originan en médula ósea y migran a los diferentes tejidos del organismo (Abbas y col., 1991).

Los fagocitos mononucleares desarrollan tres estadios diferentes: a) El estadio basal, al que se denomina "residente" por que no ha sido sometido a ningún estímulo antigénico en particular, b) El estadio de competencia en el cual, los fagocitos ya se enfrentaron a un estímulo antigénico, lo que significa que han sido estimulados y son capaces de desencadenar una respuesta inmune, con la participación de otras células y sus mediadores. c) El tercer estadio metabólico, lo representan los macrófagos "activados", los cuales fueron descritos por primera vez durante la década de los años 60 (Mackannes y col., 1970) y presentan características tales como, aumento considerable de tamaño, mayor adhesividad al vidrio, incremento en el número de vacuolas intracitoplásmicas y elevada capacidad fagocítica (Adams y col., 1984).

Posteriormente, Adams en 1984, menciona que Evans y Alexander, así como Hibbs y Remington, encontraron que los macrófagos en estadio de activación, eran sumamente eficientes para destruir células neoplásicas, empezando desde entonces a definirse el término "activación", como una capacidad para mediar efectos antimicrobianos o antineoplásicos. Adams y Hamilton, en 1984, propusieron definir el estado de activación de los macrófagos como: " la modulación adecuada de una o varias de las capacidades del macrófago, de tal suerte que una determinada función sea incrementada o aparezca cuando previamente no existía " (Adams y col., 1984).

Así, los macrófagos juegan un papel importante en la inmunidad inespecífica por su habilidad para ingerir y destruir bacterias, células deterioradas o células tumorales. También participan en la inmunidad mediada por células, la cual es responsable de la defensa contra infecciones por virus, hongos, bacterias y otras enfermedades parasitarias; además, están

involucrados en reacciones de hipersensibilidad retardada, en rechazo de transplantes y en la vigilancia inmunológica contra la aparición de tumores (Roitt y col., 1993).

Se sabe además que los macrófagos cuentan por lo menos con tres receptores membranales para llevar a cabo su función fagocítica:

- I) Receptores para la región Fc (Fragmento cristalino) de las inmunoglobulinas, con afinidad para los diversos isotipos de las mismas.
- II) Receptores que reconocen componentes del sistema del complemento.
- III) Receptores que reconocen a las glicoproteínas que poseen residuos terminales de manosa, fucosa o N-acetil-glucosamina (Imber y col., 1982) .

### **B. Papel de los macrófagos en la respuesta inmune hacia tumores**

La heterogeneidad biológica de las células tumorales, requiere una aplicación terapéutica que reconozca y destruya células tumorales, pero que no dañe células normales. Los macrófagos tumorocidas parecen cumplir con este criterio (Pak y col., 1991).

El tejido tumoral es caracterizado por el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, infiltración celular inflamatoria y reacción fibrótica. El componente inflamatorio del tejido tumoral, juega un papel importante en su expansión. Los macrófagos constituyen la parte principal de la infiltración celular inflamatoria y pueden ejercer actividad citotóxica contra células tumorales. La acumulación de macrófagos en la vecindad del tumor sugiere el reclutamiento de monocitos circulantes en sangre y la liberación local de factores quimiotácticos por los mismos (Martinet y col., 1992 y Van-Ravenswaay y col., 1992).

Una de las funciones principales de los macrófagos es su capacidad para destruir células neoplásicas. Uno de los mecanismos por los que ocurre la lisis de estas células, es mediante la unión de los macrófagos a células opsonizadas a través de los receptores para Fc. Posteriormente a esta unión, se requiere la liberación de factores solubles por parte del macrófago para completar la necrosis, entre estos factores se ha descrito el factor de necrosis tumoral (TNF) (Adams y col., 1984; Munn y col., 1991 y Fulton y col., 1992).

Otro de los mecanismos descritos requiere de dos pasos:

- a) La unión de los macrófagos a las células tumorales, mediada por receptores glicoprotéicos, (Imber y col., 1982) y,
- b) La secreción de mediadores líticos, como la proteasa citolítica e intermediarios del Oxígeno y Nitrógeno reactivos (IOR e INR, respectivamente), entre otros.

### **C. Intermediarios del Nitrógeno Reactivos (INR), como productos de secreción debido a la acción de los macrófagos contra las células tumorales**

Los macrófagos activados pueden producir grandes cantidades de INR, los cuales median algunas de las acciones citotóxicas de los macrófagos hacia las células tumorales y microorganismos patógenos. Así también, los INR median algunas de las acciones citostáticas de los macrófagos mediante la inactivación de la enzima ribonucleótido reductasa, inhibiendo la síntesis de ADN (Acido desoxirribonucleico) por las células tumorales (Nyoum y col., 1991).

Los INR y los IOR son dos grupos de compuestos inorgánicos que poseen un alto grado de reactividad química. Los IOR incluyen, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y en algunas poblaciones de fagocitos mononucleares, los productos de la mieloperoxidasa. Los INR incluyen a los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), al óxido nítrico y al dióxido de nitrógeno (Stuehr y col., 1985,1987) . La producción de INR por células de mamíferos fue descubierta recientemente (Moncada,1989). Los INR derivados de los macrófagos son de gran interés ya que: se producen después de un estímulo (Stuehr y col., 1985,1987) y parecen jugar un papel importante en las funciones anticancerígena y antimicrobiana de los macrófagos activados (Granger y col., 1988). Originalmente se sabía que los INR se generaban por una vía no enzimática de oxidación del amonio mediada por los IOR (Wagner y col., 1983 y Saul y col., 1984). Mediante trabajos subsecuentes se reconoció que los INR se generan por una vía enzimática que involucra la oxidación de la L-arginina (Iyengar y col., 1987 y Hibbs y col., 1987).

Mauel y col., en 1991, evaluaron diferentes métodos de activación de los

macrófagos estimulados *in vitro* por los inmunomoduladores, LPS e IFN- $\gamma$ , y encontraron que la medida de la producción de nitritos por los macrófagos expuestos a los inmunomoduladores resultó ser el ensayo más conveniente sobre todos los métodos analizados. En base a estos antecedentes, se eligió el método de medición utilizado por Mael, para nuestro estudio.

#### **D. Evasión de la respuesta inmune por las células tumorales**

El enfoque principal de la Inmunología tumoral, es entender las vías por las cuales las células tumorales evaden su destrucción por el sistema inmune, a pesar de su inmunogenicidad potencial. El proceso de evasión es frecuentemente llamado "escape tumoral", y puede ser el resultado de uno o más mecanismos entre los cuales se ha descrito; la inmunosupresión inducida por productos tumorales que afectan o inhiben las funciones de los macrófagos (Abbas y col., 1991).

Se ha observado que el crecimiento tumoral induce innumerables cambios en los macrófagos como son: a) inhibición de la síntesis de citocinas (Walker, 1994); b) alteración de las funciones accesorias de los macrófagos durante la proliferación de células T disminuyendo la expresión de moléculas "Ia" del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II (Yurochko y col., 1990 a; Yurochko y col., 1990 b y Walker y col., 1992); c) inhibición de la síntesis y función del Factor estimulador de colonias de los macrófagos y los granulocitos (GM-CSF) (Walker y col., 1994). Lo anterior sugiere que las células tumorales producen algún factor con actividad inhibitoria sobre el sistema inmune, y de esta forma permiten que las células cancerosas evadan la respuesta inmune.

#### **E. Antecedentes clínicos de la inhibición de la respuesta inmune inducida por las células tumorales**

Desde hace más de dos décadas se ha observado frecuentemente que los pacientes que desarrollan algún tipo de cáncer, presentan una actividad disminuida de las células que conforman el sistema inmunológico, presentando inclusive una mayor susceptibilidad a infecciones (Hausman y col., 1973 y Boetcher y col., 1974).

Nimberg y col., en 1975, aislaron una fracción peptídica, menor de 10 kDa, del suero de pacientes de 42 a 87 años de edad con cáncer (el autor no menciona el tipo de cáncer de los pacientes). La fracción peptídica suprimió la proliferación de linfocitos *in vitro* inducida por fitohemaglutinina (PHA), y el número de linfocitos en bazo determinado por la técnica de células formadoras de placa (CFP). En el suero de individuos sanos no se localizó la fracción peptídica inmunosupresora.

Lichtenstein y col., en 1980, realizaron un estudio similar al anterior. Evaluaron la respuesta inmune de acuerdo a la disminución de la respuesta a la PHA, al número absoluto de linfocitos, monocitos y de células con receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas. Esto lo hicieron en 109 pacientes, de 19 a 85 años de edad, con cáncer de pulmón (13), de vejiga (51), de mama (20), de cabeza y de cuello (25). El grupo control consistió de individuos de 21 a 70 años de edad, aparentemente sanos. Al comparar los resultados obtenidos de los niveles evaluados en los dos grupos, observaron que existían diferencias significativas entre los pacientes con cáncer y los individuos sanos, es decir, los primeros presentaron una respuesta inmune notablemente disminuida en todos los ensayos probados, por lo que sugieren que existe una interacción entre las células malignas y la supresión de las células del sistema inmune.

Por otra parte, Yamashita y colaboradores (1986), comprobaron la presencia de una sustancia inmunosupresora (SI) en el suero de 139<sup>®</sup> pacientes con tumores ginecológicos malignos (105 de cáncer cervical, 15 de cáncer endometrial y 14 de cáncer de ovario). Esta SI presentó una inhibición de la proliferación *in vitro* de linfocitos humanos, inducida por PHA (Yamashita y col., 1986). La SI a diferencia de la fracción inmunosupresora reportada por Nimberg resultó ser una glicoproteína con un peso molecular de 52 kDa. Yamanaka y su grupo de investigadores en 1988, detectaron niveles elevados de la misma sustancia inmunosupresora (SI) en el suero de 108 pacientes con cáncer de cuello y de cabeza.

Paralelos a estas investigaciones, se han llevado a cabo estudios para determinar si la respuesta antitumoral de los macrófagos es afectada de alguna manera por sustancias liberadas por las células tumorales.

Por ejemplo, Rhodes y su grupo de trabajo en el año de 1979, investigaron sobre la vigilancia inmunológica tumoral con el fin de responder a la pregunta: ¿De que manera, los tumores pueden resistir la defensa del huésped mediada por los macrófagos?. Obtuvieron un factor de peso molecular menor de 25 kDa, a partir del sobrenadante de cultivos de células tumorales obtenidas de pacientes con cáncer de vejiga, de mama y de pulmón, el cual inhibe la activación de los macrófagos *in vitro*, retados con eritrocitos. La inhibición de la activación de los macrófagos fue medida observando la disminución de la expresión funcional de los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G y una subsecuente disminución en la formación de rosetas de los macrófagos y los eritrocitos. Ellos concluyen que el tumor produce un factor, semejante a la insulina que ejerce una presión selectiva sobre los macrófagos y esto les permite evadir la respuesta inmune mediada por los fagocitos mononucleares.

En 1981, Cianciolo y col., determinaron la presencia de un factor inhibidor de otras de las funciones de los fagocitos mononucleares, con un peso molecular aproximado a 25 kDa que se encuentra presente en el líquido de ascitis tumoral de pacientes con diversos tipos de cáncer; adenocarcinomas de páncreas, de ovario de pulmón, melanomas, linfomas, etc. Este factor inhibe la polarización y quimiotaxis de los monocitos inducida por el quimiotactante, N-formil-metionil-leucil-fenil-alanina (FMLP). Con este estudio demostraron que algunas efusiones cancerosas contienen nuevas proteínas que funcionan como potentes inhibidores de la función de los monocitos y que son reconocidos por anticuerpos que reaccionan con la proteína transmembranal de 15 kDa o componente P<sub>15</sub> (E) de los retrovirus (virus de la leucemia murina). La célula tumoral, al producir tal factor puede sobrevivir a la inmunovigilancia mediada por los monocitos.

También, Siziopikou y col., en 1991, analizaron la inhibición de la activación de los macrófagos alveolares en pacientes con cáncer de pulmón, aunque no caracterizaron el factor o factores inhibidores de dicha activación, demostraron una vez más que el sobrenadante de las células tumorales induce la inhibición de la activación de los macrófagos activados con IFN- $\gamma$ , acetato de forbol miristato (PMA) y endotoxinas.

## **F. Antecedentes experimentales (modelos animales) de la inhibición de la respuesta inmune inducida por las células tumorales**

Desde 1972 existe el antecedente del estudio de los factores inmunosupresores producidos en el sobrenadante de cultivos de células tumorales, cuando el grupo de Masaki (1972) llevó a cabo un estudio para investigar el principio inmunosupresor de los componentes subcelulares del tumor ascítico de Ehrlich. Para probar la actividad inmunosupresora de esta fracción, evaluaron la inhibición de la respuesta inmune secundaria de células linfoides obtenidas de ratones ddO inmunizados con *Bacillus subtilis* y adyuvante incompleto de Freund, expuestas a la fracción de cromatina nuclear. Llegaron a la conclusión de que la célula tumoral libera componentes nucleares que actúan como agentes inmunosupresores en los órganos linfoides del huésped que posee el carcinoma de Ehrlich.

También, Zolia en el año de 1972, analizó el efecto de los plasmacitomas en la respuesta inmune de ratones BALB/c, determinando el número de células formadoras de placa en el bazo de los animales portadores del tumor y demostró que los plasmacitomas causaron una supresión en la habilidad del huésped para montar una respuesta primaria contra un estímulo de eritrocitos de carnero, el número de CFP en el bazo de los ratones portadores del tumor, fue inversamente proporcional al tamaño del tumor. En base a sus resultados, propuso que es posible que los plasmocitos malignos produzcan un factor soluble que interfiera con un paso específico en la respuesta inmune primaria.

Otro estudio donde se demuestra la existencia de un factor inmunosupresor de origen tumoral, es el realizado por Kamo y col., en el año de 1975; demostraron una supresión de la respuesta anti-eritrocitos de carnero, cuando las células de bazo de ratones DBA/2 y C57BL/6 portadores del tumor (mastocitoma), fueron incubadas *in vitro* y puestas en contacto con eritrocitos de carnero. Los mastocitos producen un factor menor de 12 kDa que provoca la inmunosupresión de la respuesta celular y según explica Kamo es posible que este factor tenga un papel importante como inmunoregulador de los procesos malignos per se. Posteriormente, Cornelius y col., en 1988, encontraron que el líquido de ascitis del mastocitoma P815 en ratones DBA/2, producía un factor

de 10 kDa, el cual inhibe fuertemente la proliferación de linfocitos estimulados con mitógeno.

Nelson y col., en 1990, demostraron en un estudio *in vitro* que células tumorales humanas de melanoma y de cáncer de mama, producen sustancias que deprimen la liberación de Interleucina-2 (IL-2) por las células T murinas ( línea CTLL ) activadas con concavalina A o PMA. Los factores responsables de la inhibición parecen estar también relacionados inmunológicamente a la proteína retroviral de envoltura P<sub>15</sub> (E) como fue reportado previamente por Cianciolo y col. (1981).

Recientemente Hao y col. (1993) detectaron que las células metastásicas de linfoma RAW117-H10 causaron una disminución de la respuesta inmune en ratones BALB/c portadores del linfoma; extrajeron, moléculas de superficie de las células metastásicas por técnicas de isoelectroenfoque y determinaron que estas moléculas inhiben la citotoxicidad mediada por células NK, la formación de colonias de granulocitos y macrófagos y la producción de IL-2 por los linfocitos T. La molécula supresora tiene un peso molecular aproximado de 70 kDa. Concluyeron que las células metastásicas del linfoma RAW117-H10 expresan moléculas inmunosupresoras que facilitan el crecimiento y metástasis *in vivo* de las células tumorales.

---

Aunado a estos estudios existen evidencias experimentales, que demuestran la presencia de un inhibidor de la actividad de los macrófagos tanto en el medio de cultivo como en el homogenado de células de origen tumoral.

Fauve y col., en 1974, analizando los efectos antiinflamatorios de las células malignas obtenidas de ratones NCS, 129/Sv, C57/B16 y CBA, determinaron que las células tumorales de teratocarcinoma, M1 y las 3LL, producen un factor de peso molecular menor de 10 kDa, capaz de prevenir la reacción inflamatoria de los macrófagos hacia las células tumorales, es decir, impide la diseminación y el reconocimiento de la célula tumoral por los macrófagos. También demostraron que las células tumorales muertas no producen este factor.

Snyderman y col., en 1976, demostraron que las células de sarcoma o hepatoma deprimen la migración de los macrófagos en ratones C3H/HeJ. Esta migración, *in vivo*, fue suprimida en un 61 % y la respuesta quimiotáctica *in vitro*, de los macrófagos peritoneales de los ratones portadores del tumor resultó marcadamente deprimida. Paralelo a este estudio, Pike y col., en el año de 1976, comprobaron la existencia de un factor inhibidor de peso molecular menor a 10 kDa en ratones portadores de cuatro neoplasmas diferentes; linfosarcoma, hepatoma, fibrosarcoma y teratocarcinoma. Este factor inhibe la acumulación de los macrófagos *in vivo* y la quimiotaxis *in vitro*.

North y col. en 1976, determinaron que algunos tipos de neoplasmas malignos ( linfomas, sarcomas, mastocitoma P815 y carcinoma mamario) disminuyen la respuesta inmune celular contra *Listeria monocytogenes* ó *Yersinia enterocolitica*, en ratones DBA/2, C57BL/6 y BALB/c infectados. Como consecuencia de esto el hígado del huésped es infectado por dichas bacterias, ya que las células mononucleares del sistema inmune, están aparentemente inhibidas por la presencia de las células tumorales y los ratones estuvieron expuestos al crecimiento bacteriano en el hígado. Esto mismo fue observado en 1982 por Szuro-Sudol y col. Ellos realizaron un estudio *in vitro*, referente a la supresión de la actividad antimicrobiana por productos de células tumorales y sobre la supresión del metabolismo oxidativo de los macrófagos. Utilizaron células de mastocitoma P815 y diferentes líneas tumorales de linfomas mantenidas en ratones BALB/c y DBA/2. Evaluaron el número de parásitos fagocitados y la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de Hidrógeno) por los macrófagos para medir su acción antiprotozoaria. Los resultados que obtuvieron mostraron que los macrófagos liberaron niveles considerablemente bajos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la capacidad de fagocitar a los parásitos fue disminuida en un 90%. Lo anterior los llevó a la misma conclusión que North, las células tumorales pueden inhibir la respuesta inmune celular del huésped contra ciertos parásitos, de tal manera que estos pueden infectar al huésped portador del tumor (Szuro-Sudol y col., 1982 y 1983).

En 1986 Tsunawaki y Nathan, realizaron un estudio sobre la desactivación de los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones de la cepa ICR y activados con PMA y caseína. Ellos aislaron un factor desactivador de los macrófagos (MDF) del sobrenadante de cultivo de células murinas del

mastocitoma P815. Este factor suprime marcadamente la liberación de  $H_2O_2$  debido a la activación de los macrófagos. Roit en 1993, define al MDF como un factor de regulación negativa de las funciones efectoras de los macrófagos. Así también explica que existen otros factores que llevan a cabo esta función, refiriéndose a los siguientes factores: el CGRP (péptido relacionado al gen calcitonin), el TGF- $\beta$  1, 2, y 3 (factor de crecimiento transformante- beta) y la IL-4 (interleucina-4).

Tsunawaki y col., en 1988, demostraron la desactivación de los macrófagos activados con caseína y PMA por el TGF- $\beta$  liberado por células tumorales. Al año siguiente, este mismo grupo de trabajo comparó el TGF- $\beta$  con el MDF y comprobó que a pesar de que estos dos factores son liberados por células tumorales, son diferentes. Existen dos razones para concluir lo anterior: 1) El MDF no es afectado por los anticuerpos que neutralizan al TGF- $\beta$ , y 2) El mecanismo de acción del TGF- $\beta$  sobre la supresión de la explosión respiratoria de los macrófagos no involucra alteraciones de la cinética de la enzima oxidasa NADPH (productora del superóxido), por el contrario, el MDF suprime la capacidad de los macrófagos para llevar a cabo la explosión respiratoria debido a una disminución en la afinidad de dicha enzima por el NADPH.

Hart y Nong en 1989, dieron a conocer a la IL-4 y a el CGRP, como factores desactivadores y de regulación negativa de los macrófagos activados con LPS e IFN- $\gamma$ , al suprimir la capacidad de llevar a cabo la explosión respiratoria de los macrófagos (Hart y col., 1989 y Nong y col., 1989). Ya, en 1990 Srimal y Nathan purificaron el MDF y lo describieron como un factor de naturaleza peptídica, con un peso molecular aproximado de 13 kDa.

Por último, Fiorentino y col., en 1991, confirmaron la existencia de un nuevo factor de regulación negativa (IL-10) de los macrófagos activados con LPS e IFN- $\gamma$ . Examinaron los efectos directos de la IL-10 en los macrófagos peritoneales, Mac-1, B220 y las líneas celulares de los macrófagos, IG.18.LA, y la PU5.1. La IL-10 inhibió la producción de IL-1, IL-6 Y TNF- $\alpha$  de los macrófagos activados con LPS e IFN- $\gamma$ .

## G. Antecedentes directos

En un trabajo previo en ratones portadores del linfoma murino L5178Y, se observó que los macrófagos no desarrollaban su activación normal cuando se encontraban en presencia de los linfoblastos malignos (González-Garza y col., 1978), pero si la célula tumoral estaba dañada o muerta, los macrófagos desplegaban todo su potencial. Fauve (Fauve y col., 1974) hizo observaciones similares trabajando con el teratocarcinoma PCC4, el melanoma M1 y el tumor murino de pulmón 3LL. Lo que sugirió la presencia de uno o varios factores en la célula tumoral que bloqueaban ó impedían la activación de los macrófagos.

## H. PLANTEAMIENTO

Existen muchos tumores que pueden escapar de la respuesta inmune del huésped. El enfoque principal de la inmunología tumoral es entender las vías por las cuales las células tumorales evaden la respuesta inmune, no obstante de su potente inmunogenicidad. Los procesos de evasión son frecuentemente llamados "escape tumoral", y pueden ser el resultado de uno o más mecanismos, entre los cuales se encuentra la inmunosupresión inducida por productos tumorales que afectan las funciones propias de las células encargadas de defender al huésped contra las células malignas. Dada la importancia que desempeñan los macrófagos en la respuesta inmune contra la formación de tumores y las consecuencias que lleva consigo la inhibición de las actividades de dichas células, es necesaria la realización de estudios que nos conduzcan a identificar los factores liberados por las células tumorales que provocan un deterioro en las funciones de los macrófagos. La purificación a homogeneidad de los factores descritos a la fecha no ha sido conseguida en la mayoría de los casos, por lo que no se ha podido establecer una constante general entre los diferentes inmunosupresores de origen tumoral. El estado actual de este campo de estudio es muy controversial; consecuentemente es necesaria la búsqueda, purificación y caracterización de estos factores inhibidores en otras células tumorales con el fin de establecer algún factor común que nos permita avanzar en el conocimiento de la relación sistema inmunológico-célula tumoral.

## HIPOTESIS

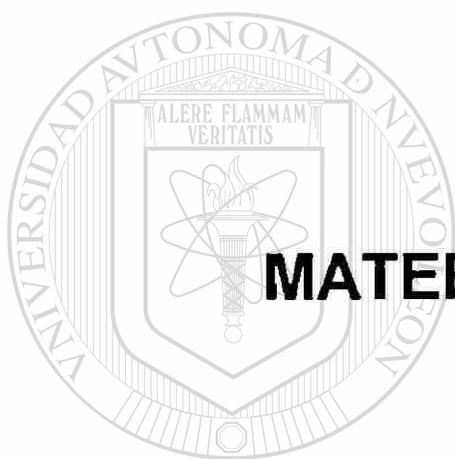
Es posible que el mecanismo de activación de los macrófagos en contra de las células tumorales del linfoma murino L5178Y en ratones BALB/c sea inhibido por la presencia de uno o varios factores producidos por la célula tumoral.

## OBJETIVO GENERAL

Identificación y caracterización parcial del factor (s) inhibidor de la respuesta de los macrófagos contra las células tumorales.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Aislamiento y cultivo de los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c normales.
- 2) Aislamiento y cultivo de los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c portadores del tumor L5178Y.
- 3) Montaje de las técnicas de activación de los macrófagos.
- 4) Determinación de la posible existencia de un factor inhibidor de los macrófagos, en el líquido de ascitis y/o linfoblastos del tumor L5178Y.
- 5) Caracterización parcial del factor (s) inhibidor de los macrófagos presente en el líquido de ascitis y/o linfoblastos del tumor L5178Y.



# **MATERIAL Y METODOS**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## MATERIALES

### A. Origen de los reactivos.

1. Dodecil sulfato de sodio, seroalbumina bovina (fracción V), reactivo de Folin Ciocalteu, glicina, EDTA, cloruro de manganeso, cloruro de magnesio, trizma base, kit para electroforesis (buffer electrodo 10X, buffer de muestra 2X, buffer concentrador, buffer separador, acrilamida, N-N- metilen bis acrilamida, persulfato de amonio, lauril sulfato (SDS), solución de azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol, solución de lauril sulfato 10 %, TEMED y marcadores de peso molecular), medio RPMI-1640, naftiletildiamina, sulfanilamida, ácido epsilon amino caprónico (EAC), ácido trifluoroacético (TFA), acetonitrilo, Lipopolisacáridos (LPS), Interferón-gama recombinante de ratón (rIFN- $\gamma$ ). De Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA).
2. Sulfato de magnesio, caldo tioglicolato. De Merck (México).
3. Hidróxido de sodio, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, cloruro de sodio y ácido clorhídrico. De Reactivos Monterrey (México).
4. Penicilina G-sódica 200,000 UI y sulfato de estreptomina. De Lakeside S.A. (México).
5. Bicarbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio, y, ácido acético. De J.T. Baker de México.
6. Cloruro de potasio, fosfato dibásico de potasio. De Técnica Química S.A. (México).
7. Metanol, nitrato de sodio. De Control Técnico y Representaciones (México).
8. Dithiothreitol. De Calbiochem (San Diego, Calif.).
9. Sephadex G-25 y G-50 finos. De Pharmacia Fine Chemicals AB (Uppsala, Sweden).
10. NycoPrep 1.068. De Nycomed Pharma Centrifugation Media (Oslo, Norway).

**B. Equipo de trabajo.**

Material de disección

Balanza analítica (Sartorius)

Potenciómetro (Beckman Century SS-1)

Centrifuga refrigerada (Damon/IEC, USA) B20 A, rotor 11/79 y 289

Revco a -70 ° C

Termo-Baño (Felisa) Mod. FE-372

Vortex (Thermolyne, USA) T-37600

Lector de microplacas EIA multi-well reader (Sigma, USA)

Equipo de electroforesis (Bio-rad, USA)

Equipo de electroforesis (BLR, USA)

Fuente de poder (CAMAG)

Fuente de poder (LKB 2001)

Placa de calentamiento (CORNING, USA) PC-320

Espectrofotómetro (Carl Zeiss, Alemania) Mod. PM Q III

Incubadora de CO<sub>2</sub> (National, USA)

Microscopio invertido Mod. "D" (Carl Zeiss)

Microscopio compuesto (Carl Zeiss)

Centrifuga refrigerada (SORVALL, USA) RC-3B

Cromatógrafo Waters 600 S Controller, con detector de diodos Waters 996 (Millipore) con Sistema Millenium versión 2.0.

Colector de fracciones LKB, BROMMA, 7000 ultrarac.

Celdas de cuarzo de 1 ml

Laminillas de 55 X 5 mm

Hemocitómetro (American Optical Scientific Instruments Div. USA)

Microplacas de poliestireno de fondo plano con 96 pozos (Sigma, USA)

Columna de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala Sweden)

Liofilizadora LABCONCO, Freeze Dry-12 (USA)

Kit of Dialysis Cassette Sample, Slide-A-Lyzer 10 k (PIERCE, USA)

**C. Animales de laboratorio.**

Ratones de la cepa BALB/c, de 6 a 8 semanas de edad, de ambos sexos y provenientes del bioterio del CIBIN, fueron utilizados. Los animales se mantuvieron en el bioterio a una temperatura de 18 a 20 ° C, en jaulas de

acrílico con cubierta de rejilla metálica y se alimentaron con nutricubos para roedores (Lab. Diet. 5001 U.S.A.) y agua *ad libitum*.

## MÉTODOS

### A. Preparación del medio de cultivo RPMI-1640.

Se indican las concentraciones de las soluciones madre con un número seguido de una X que representa su concentración respecto a la solución de trabajo o solución 1X. Se disolvió un frasco de medio en polvo RPMI-1640 suplementado con L glutamina (2mM), y se añadieron 2.2 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 10 ml de la solución de antibióticos 100X y 100 ml de suero fetal bovino. Se ajustó el pH a 7.0 y se aforó a 1000 ml. Se esterilizó por filtración a través de membranas de nitrocelulosa HAWP (poros de 0.22  $\mu\text{m}$ ), y se distribuyó el medio en volúmenes de 100 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca, se incubó el medio una semana a 36 ° C, para probar su esterilidad y se almacenó a 4 ° C.

#### SOLUCIÓN DE ANTIBIOTICOS (100X).

Penicilina G-sódica 2000,000 U.I. y sulfato de estreptomicina 0.5 g, ambos antibióticos se disolvieron por separado en 100 ml de agua desionizada. Se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 ° C, en alícuotas de 10 ml en tubos estériles con tapón de rosca (16 X 100 mm, Pyrex).

#### SUERO FETAL BOVINO.

El suero se obtuvo a partir de sangre colectada en el rastro de la ciudad de Monterrey, la cual al cuagularse permitió la separación del mismo. Una vez separado el suero, este se esterilizó por filtración o a través de una serie de filtros HAWP Millipore de 10  $\mu$  a 0.22  $\mu$ . El suero se distribuyó en volúmenes de 40 a 100 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca. Previo a su uso se descomplementó por calentamiento a 56 ° C por 30 min y se probó su esterilidad, sembrando 1 ml de cada botella de suero a probar en 10 ml de medio RPMI-1640 y se incubó por una semana, se almacenó a -20 ° C.

## **B. Composición y preparación de las soluciones.**

### **MEDIO LIQUIDO DE TIOGLICOLATO AL 2%.**

Se disolvieron 2 g de caldo tioglicolato en 100 ml de agua desionizada y se esterilizó en autoclave, se almacenó a temperatura ambiente, en alícuotas de 10 ml.

### **SOLUCION HOMOGEGINIZADORA DE CELULAS 1 mM..**

Se disolvieron 0.0930 g. de EDTA , 0.0328 g de ácido épsilon amino caprónico (EAC) y 0.0385 g de dithiothreitol. Se aforó a 250 ml con agua destilada. Se almacenó en una botella estéril de borosilicato con tapón de rosca y se almacenó en refrigeración a 4 ° C.

## **C. Determinación de Nitritos por la técnica de Griess (Stuehr, 1989).**

Consideramos utilizar la técnica de Griess para determinar la liberación de los nitritos por los macrófagos activados con LPS y/o IFN- $\gamma$  en base a que se ha demostrado que los nitritos juegan un papel primordial en la actividad antitumoral de los macrófagos (Stuehr y col., 1989, Klostergaard y col., 1991 e Yim y col., 1993). Además, en 1991, Mauel y col. comprobaron que la estimación de los nitritos liberados por los macrófagos activados por los inmunomoduladores, LPS e IFN- $\gamma$ , *in vitro*, es la técnica más adecuada, con respecto a otras técnicas de evaluación de productos tóxicos antitumorales con la ventaja de su gran reproducibilidad, bajo costo y alta confiabilidad.

## **Composición y preparación de las soluciones.**

### **REACTIVO A.**

Se disolvieron 0.1 g de naftiletildiamina en 100 ml de agua desionizada y almacenó en botella de borosilicato con tapón de rosca a 4°C.

### **REACTIVO B.**

Se disolvió 1g de sulfanilamida en 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 5%. Se almacenó en botella de borosilicato con tapón de rosca a 4°C.

#### **CURVA ESTANDAR DE $\text{NaNO}_2$ .**

Se disolvieron 0.068 g de  $\text{NaNO}_2$  para obtener una solución 1 mM en 100 ml de agua desionizada. A partir de esta solución se hizo una curva con concentraciones de 0.244, 0.488, 0.976, 1.95, 3.9, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500  $\mu\text{M}$ .

#### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE LOS NIVELES DE $\text{NO}_2$ , EN EL MEDIO DE CULTIVO DE LOS MACROFAGOS.**

Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del medio sobrenadante de los macrófagos cultivados y se agregaron 50  $\mu\text{l}$  del reactivo A de Griess más 50  $\mu\text{l}$  del reactivo B, la mezcla se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó en el lector para microplacas (ELISA) a 545 nm. La concentración de nitritos se obtuvo por extrapolación en la curva estándar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **D. Cuantificación de proteínas.**

La concentración de proteínas biológicas se determinó por los métodos de Lowry (Lowry, 1951) y el método de Lowry modificado por Hartree (Hartree, 1972). Los ensayos se realizaron por triplicado.

---

#### **Método de Lowry. Composición y preparación de las soluciones.**

##### **SOLUCION A.**

Se disolvieron 2 g de carbonato de sodio en 100 ml de hidróxido de sodio 0.1 N. La solución se almacenó en una botella estéril de color ámbar de borosilicato con tapón de rosca a temperatura ambiente.

##### **SOLUCION B.**

B1. Se disolvieron 2 g de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua desionizada.

B2. Se disolvió 1 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml de agua desionizada y se almacenó en una botella estéril de color ámbar de borosilicato con tapón de rosca a temperatura ambiente.

##### **SOLUCION C.**

Se diluyó 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu con 15 ml de agua desionizada. Esta solución se preparó al momento de utilizarse.

#### SOLUCION D

Mezcla de reacción; se mezclaron 0.5 ml de la solución B1, 0.5 ml de la solución B2 y 50 ml de la solución A.

#### SOLUCION ESTANDAR (SAB 1mg/ml).

Se disolvieron 25 mg de seroalbumina bovina (Fracción V) en 25 ml de agua desionizada con agitación lenta.

#### **Método de Hartree. Composición y preparación de las soluciones.**

##### SOLUCION A.

Se disolvieron 25 g de carbonato de sodio y 500 mg de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua desionizada, se agregaron 125 ml de hidróxido de sodio 1N y se aforó a 250 ml con agua desionizada. La mezcla se almacenó en una botella estéril de color ámbar de borosilicato con tapón de rosca a temperatura ambiente.

##### SOLUCION B.

Se disolvieron 250 mg de sulfato de cobre y 500 mg de tartrato de sodio y potasio en 15 ml de agua desionizada, se le agregaron 2.5 ml de hidróxido de sodio 1N más 22.5 ml de agua desionizada. Se almacenó a temperatura ambiente.

##### SOLUCION C.

Se diluyó 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu con 15 ml de agua desionizada. Esta solución se preparó al momento de utilizarse.

##### SOLUCION ESTANDAR (SAB 1 mg/ 1 ml).

Se disolvieron 100 mg de seroalbumina bovina (Fracción V) en 20 ml de agua desionizada con agitación lenta y se aforó a 100 ml con agua desionizada.

**PROCEDIMIENTO:****Tabla I. Determinación de proteínas por el método de Lowry.**

| Estándar ASB<br>μl | Muestra | NaCl μl<br>(0.85%) | Sol. D<br>μl | 10 min<br>T.A. | Sol. C | 30 min T.A.<br>(obscuridad) |
|--------------------|---------|--------------------|--------------|----------------|--------|-----------------------------|
| BLANCO             | 0       | 400                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| BLANCO             | 0       | 400                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| 10                 | 10      | 390                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| 20                 | 20      | 380                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| 30                 | 30      | 370                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| 50                 | 50      | 350                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| 100                | 100     | 300                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| 150                | 150     | 250                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| 200                | 200     | 200                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |
| 250                | 250     | 150                | 2            | ✓              | 200    | ✓                           |

La lectura de Absorbancia se realiza con las siguientes condiciones:

Filtro de luz                      500 o 550 nm  
muestras                            leer por triplicado

**PROCEDIMIENTO:**

**Tabla II. Determinación de proteínas por el método de Hartre (micrométodo).**

| Agua desionizada<br>$\mu\text{l}$ | Estándar ASB<br>$\mu\text{l}$ | Sol. A<br>$\mu\text{l}$ | 10<br>min<br>50°C | 12<br>min<br>T.A. | Sol. B<br>$\mu\text{l}$ | 10<br>min<br>T.A. | Sol. C<br>$\mu\text{l}$ |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| 250                               | BLANCO                        | 200                     | ✓                 | ✓                 | 20                      | ✓                 | 700                     |
| 200                               | 50                            | 200                     | ✓                 | ✓                 | 20                      | ✓                 | 700                     |
| 150                               | 100                           | 200                     | ✓                 | ✓                 | 20                      | ✓                 | 700                     |
| 100                               | 150                           | 200                     | ✓                 | ✓                 | 20                      | ✓                 | 700                     |
| 50                                | 200                           | 200                     | ✓                 | ✓                 | 20                      | ✓                 | 700                     |
| —                                 | 250                           | 200                     | ✓                 | ✓                 | 20                      | ✓                 | 700                     |
| Muestra<br>50                     | 200                           | 200                     | ✓                 | ✓                 | 20                      | ✓                 | 700                     |
| Muestra<br>100                    | 150                           | 200                     | ✓                 | ✓                 | 20                      | ✓                 | 700                     |

En la microplaca de lectura se colocaron 200  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tubos iniciando en la posición A1 con el blanco y en seguida se colocaron las soluciones del estándar por duplicado, de menor a mayor concentración, se colocaron también las muestras por duplicado en seguida de la curva. La placa se introduce en el lector de microplacas, programado bajo las siguientes condiciones:

|                       |       |                                   |
|-----------------------|-------|-----------------------------------|
| Filtro de luz         | ----- | 492 nm                            |
| Método                | ----- | regresión lineal                  |
| Coordenadas           | ----- | Y= absorbancias, X= concentración |
| Calibrador            | ----- | 50, 100, 150, 200, 250            |
| Calibrador y muestras | ----- | leer por duplicado                |

### E. Método de ultrafiltración.

La muestra S1 (2ml) se diluyó en una cantidad equivalente de PBS y se filtró a través de una cámara de amicon (Farmacia) utilizando membranas de corte (DIAFCO) de peso molecular de 10 y 100 kDa con presión de nitrógeno.

### F. Cromatografía por filtración en gel, en columna de Sephadex G-25 y G-50.

#### Composición y preparación de las soluciones.

#### SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS).

Se pesaron 6.5 g de NaCl ; 2.8 g de  $K_2HPO_4$  ; 0.5 g de  $KH_2PO_4$  y se diluyeron en 100 ml de agua desionizada estéril ajustando el pH a 7.4-7.5 con NaOH 10 N. La solución se esterilizó en autoclave y se almacenó a temperatura ambiente, en alícuotas de 100 ml

#### RESINA DE SEPHADEX G-25.

Se hidrataron 9 g de Sephadex G-25 en 150 ml de PBS. La suspensión se dejó reposar al menos 180 min antes de utilizarla.

#### RESINA DE SEPHADEX G-50.

Se mezclaron 4 g de Sephadex G-50 en 100 ml de PBS. La suspensión se dejó reposar al menos 180 min antes de utilizarla.

#### Procedimiento:

- A) Se montó una columna de 30 cm de largo y 2 cm de diámetro en posición vertical, mediante un sujetador localizado a un lado del colector de fracciones.
- B) Se agregó buffer PBS, hasta la mitad de la columna. y en seguida se agregó lentamente el Sephadex hidratado en PBS por 3 h.
- C) Se reguló la salida del buffer mediante una manguera delgada que sale de la parte inferior de la columna, a manera que la resina se fuera empaquetando hasta llegar a 2 cm del extremo superior de la columna.
- D) Se agregaron gota a gota 500  $\mu$ l de la muestra.

E) Se obtuvieron al menos 75 fracciones de 1 ml en los tubos de ensayo colocados en el colector de fracciones, regulando la velocidad a un tiempo de 500 $\mu$ l/ min por tubo.

G) Las fracciones se leyeron a una densidad óptica de 280 nm.

### **G. Método de liofilización.**

Se colocaron de 2 a 3 ml de la muestra 1-G-25 en cada una de las ampollas, especiales para el proceso de la liofilización. Las ampollas se refrigeraron en posición horizontal a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el Revco hasta que estuvieron perfectamente congeladas. Posteriormente se transportaron a la liofilizadora en un recipiente contenedor de una mezcla de gas carbónico-acetona o nitrógeno líquido y se colocaron en los tubos del rotor de la liofilizadora, una vez que se comprobó que el aparato alcanzó las condiciones de temperatura ( $-50^{\circ}\text{C}$ ) y vacío (25-50 micrones) deseadas.

### **H. Método de diálisis.**

En este procedimiento se utilizaron los implementos del kit de diálisis con cassette de muestra. Se inyectó la muestra 1-G-25, con una jeringa de 3 ml, en el cassette de diálisis y se extrajo el vacío. Posteriormente se colocó la muestra en un recipiente con 1 l de agua desionizada por 24 h, durante este tiempo se realizaron tres cambios de agua. El proceso de diálisis se realizó en agitación constante a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

### **I. Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC) en fase reversa.**

#### **Composición y preparación de las soluciones.**

**SOLUCION DE ACIDO TRIFLUOROACETICO (TFA), (SOLVENTE ACUOSO).**

Se mezclaron 500 ml de la solución de TFA al 0.1% y 200 ml de agua desionizada, el pH se ajustó a 2.3 y se aforó a 1000 ml con agua desionizada. Se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**SOLUCION DE ACETONITRILLO (SOLVENTE ORGANICO).**

Se mezclaron 500 ml de la solución de acetonitrilo al 0.1% y 200 ml de agua desionizada, el pH se ajustó a 2.3 y se aforó a 1000 ml con agua desionizada.

Se almacenó a 4 °C.

**Procedimiento:**

- A) Se colocó una columna NOVA-PAK C-18 (3.9 mm x 15 cm) en el cromatógrafo.
- B) La columna se equilibró en TFA al 0.1 % en agua a temperatura ambiente
- C) Se inyectaron 50 µl de la muestra.
- D) Se eluyó con un gradiente continuo de 0 a 40 % de acetonitrilo en TFA al 0.1 % en agua y a una velocidad de 500 µl/ min.
- E) Se colectaron, al menos, 35 fracciones en tubos de ensayo.
- F) Las fracciones se monitorearon a 220 nm de absorbancia.

**J. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, PAGE-SDS (Laemmli, 1970)**

En este procedimiento se utilizaron los implementos del sistema BLR para geles de 20 X 20 cm, y del sistema Bio-rad para geles de 10 X 10 cm.

**Electroforesis, con geles de acrilamida/bis de 20 X 20 cm al 15%.  
Composición y preparación de las soluciones.**

**SOLUCION DE ACRILAMIDA.**

Se disolvieron 30 g de acrilamida y 0.8 g de N-N acrilamida/bis en 100 ml de agua destilada. La solución se filtró y almacenó a 4 °C en la oscuridad.

**BUFFER SEPARADOR. TRIS HCL 1.5 M pH 6.8.**

Se disolvieron 18.17 g de Tris base  $C_4H_{11}NO_3$  en 50.10 ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 8.8 con HCl 2N y se aforó a 100 ml de agua bidestilada. Se almacenó a 4 °C.

**BUFFER CONCENTRADOR. TRIS HCL 0.5 M pH 6.8**

Se disolvieron 6.0 g de Tris base en 50 ml de agua bidestilada. Se ajustó a pH 6.8 y se aforó a 100 ml de agua bidestilada. Se almacenó a 4 °C.

**DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) AL 10%.**

Se disolvieron 10g de SDS en 100 ml de agua bidestilada. La solución se almacenó a 4° C.

**PERSULFATO DE AMONIO (APS).**

Se disolvieron 0.1 g de APS en 1 ml de agua bidestilada inmediatamente antes de su uso.

**AMORTIGUADOR DE CORRIMIENTO pH 8.3 (BUFFER ELECTRODO).**

Se disolvieron 3 g de Tris base, 14.4 g de glicina y 1 g de SDS en 1000 ml de agua bidestilada. La solución se almacenó a 4° C.

**PREPARACION PARA MUESTRAS.****AMORTIGUADOR DE MUESTRA.**

Se mezclaron 25 ml de Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 2 g. de SDS, 10 ml de glicerol, 5 ml de 2-mercaptoetanol y 1.1 ml de azul de bromofenol 0.1%. La mezcla se aforó con agua bidestilada a 50 ml. Se almacenó a 4° C.

**SOLUCION FIJADORA.**

Se mezclaron 400 ml de metanol, 70 ml de ácido acético y 530 ml de agua bidestilada. Se almacenó a temperatura ambiente.

**SOLUCION REVELADORA.**

Se mezclaron 454 ml de metanol al 50 %, 46.1 ml de ácido acético y 1.25 g de azul de Coomassie R250. La mezcla se aforó a 500 ml y almacenó a temperatura ambiente.

**SOLUCION DECOLORANTE.**

Se mezclaron 30 ml de metanol, 7 ml de ácido acético y 63 ml de agua bidestilada. Se conservó a temperatura ambiente.

**SOLUCION CONSERVADORA**

Se mezclaron 70 ml de ácido acético al 7.5% y 930 ml de agua desionizada. Se almacenó a temperatura ambiente.

**GEL SEPARADOR AL 15%.**

Se mezclaron 15 ml de acrilamida-bis, 7.5 ml de Tris HCl pH 8.8 y 7.05 ml de agua destilada. La mezcla se agitó suavemente por 5 min y se le agregaron

0.66 ml de SDS al 10%, 15  $\mu$ l de TEMED y 100  $\mu$ l de APS. Se utilizó inmediatamente.

#### GEL CONCENTRADOR AL 3.8%.

Se mezclaron 1.25 ml de acrilamida-bis, 1.87 ml de Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 4.25  $\mu$ l de agua destilada, 150  $\mu$ l de SDS al 10 %, 10  $\mu$ l de TEMED y 100  $\mu$ l de APS. Se utilizó inmediatamente.

#### SOLUCION DE MUESTRA.

Se mezclaron 20  $\mu$ l de la muestra y 20  $\mu$ l de buffer de muestra y se hirvieron en baño de agua por 3 min y se dejó enfriar por 5 min previo a su utilización y la solución restante se almacenó a -20 °C.

**MEZCLA DE MARCADORES DE PESO MOLECULAR (1mg/ml )** (alfa-Lactoalbumina PM 14,200; Inhibidor de tripsina PM 20,100; Tripsinógeno PMSF PM 24,000; Anhidrasa carbónica PM 29,000; Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa PM 36,000; Albúmina de huevo PM 45,000; Albúmina bovina PM 66,000).

Se diluyó el contenido del frasco en 1.5 ml del buffer de muestra (150  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol y 10  $\mu$ l de solución de azul de bromofenol y se hirvió en baño de agua por 3 min, se dejó enfriar por 5 min antes de su utilización y el restante se almacenó a -20 °C.

#### Procedimiento:

- A) Las placas se montaron con un espacio entre ellas de 0.25 cm, en su base, ajustando herméticamente con unas pinzas.
- B) Se agregó el gel separador al 15% y se dejó reposar durante 1 h para su polimerización.
- C) Posteriormente se agregó el gel concentrador e inmediatamente se colocó el peine formador de 20 canales y se dejó polimerizar por 1 h.
- D) Se colocaron 20  $\mu$ l de muestra o marcador por carril.
- E) Posteriormente se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder con un voltaje de 35 mA durante 5 a 6 h.
- F) La fuente de poder se apagó, cuando el frente de corrimiento llegó hasta 1 cm antes del extremo final del gel separador.

- G) Se recuperaron los geles y se colocaron en la solución reveladora durante 1 h.
- H) Se realizaron tres lavados con la solución decolorante durante 30 min por cada lavado.
- I) Por último se colocaron en la solución conservadora.

**Electroforesis, con geles de acrilamida/bis de 10 X 10 cm al 15%.  
Composición y preparación de las soluciones.**

**BUFFER SEPARADOR. TRIS-HCL 3.0 M, pH 8.7-8.9.**

Se disolvió el contenido del frasco del buffer separador en 20 ml de agua desionizada, se agitó suavemente y se aforó a un volumen de 40 ml de agua desionizada. La solución se almacenó a 4°C.

**BUFFER CONCENTRADOR. TRIS HCL 0.5 M, pH 6.7-6.9.**

Se disolvió el contenido del frasco del buffer concentrador en 20 ml de agua desionizada, se agitó suavemente y se aforó a 40 ml de agua desionizada. Se almacenó a 4°C.

**BUFFER ELECTRODO 10X.**

Se disolvieron los contenidos de las botellas de lauril sulfato (3 ml) y la del buffer electrodo (436 g) en cantidades de 200 ml de agua desionizada hasta la completa disolución ajustando el volumen final a 2500 ml de agua desionizada. Se almacenó a 4°C.

**BUFFER ELECTRODO 1X. TRIS 0.025 M, pH 6.8, GLICINA 0.192 M Y LAURIL SULFATO 4%.**

Se mezclaron 35 ml de buffer electrodo 10 X y 315 ml de agua desionizada inmediatamente antes de su utilización.

**SOLUCION ACRILAMIDA/BIS. N-N, METILEN BIS ACRILAMIDA 30%/2.7%.**

Se mezclaron los contenidos de los frascos de acrilamida y el de acrilamida /bis y se aforó a 100 ml con agua desionizada. Se almacenó la solución a 4°C.

#### SOLUCION DE PERSULFATO DE AMONIO.

Se disolvieron 45 mg de persulfato de amonio en 3 ml de agua desionizada inmediatamente antes de su utilización.

#### SOLUCION DECOLORANTE.

Se mezclaron 400 ml de metanol, 70 ml de ácido acético glacial y 530 ml de agua desionizada. Se almacenó a temperatura ambiente.

#### SOLUCION REVELADORA.

Se disolvieron 0.5 g de azul brillante en 500 ml de solución decolorante. Se almacenó a 4° C.

#### SOLUCION CONSERVADORA.

Se mezclaron 70 ml de ácido acético al 7.5% y 930 ml de agua desionizada. Se almacenó a temperatura ambiente.

#### GEL SEPARADOR 15%.

Se mezclaron 5 ml de acrilamida/bis, 1.25 ml de buffer separador, 100  $\mu$ l de solución de lauril sulfato al 10%, 3.1 ml de agua desionizada, 500  $\mu$ l de solución de persulfato de amonio y 7.5  $\mu$ l de TEMED. Se utilizó inmediatamente después de su preparación.

#### GEL CONCENTRADOR 3.8%.

Se mezclaron 2.5 ml de acrilamida/bis, 1.25 ml de buffer concentrador, 100  $\mu$ l de solución de lauril sulfato al 10%, 5.65 ml de agua desionizada, 500  $\mu$ l de solución de persulfato de amonio al 1.5% y 10  $\mu$ l de TEMED.

#### SOLUCION DE MUESTRA.

Se mezclaron 500  $\mu$ l de la muestra (65.17  $\mu$ g/ml) y 500  $\mu$ l del buffer de muestra, 20  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol y 7  $\mu$ l de solución de azul de bromofenol. Se hirvió en baño de agua por 3 min y se dejó enfriar 5 min antes de su uso o se almacenó a -4° C.

MEZCLA DE MARCADORES DE PESO MOLECULAR 1mg/ml (Anidrasa carbónica PM 29,000; Albúmina de huevo PM 45,000; Albúmina bovina PM 66,000; Fosforilasa  $\beta$  PM 97,410;  $\beta$ -galactosidasa PM 116,000; Miosina PM

205,000). Se diluyó el contenido del frasco en 1.5 ml de buffer de muestra (150  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol y 10  $\mu$ l de solución de azul de bromofenol). Se hirvió en baño de agua por 3 min y se dejó enfriar por 5 min. Una vez frío se utilizó o se almacenó a  $-4^{\circ}$  C.

**Procedimiento:**

A) Se prepararon las cámaras para elaborar los geles, colocando dos placas de vidrio de diferente altura (10 x 8.3 y 10 x 7.3 cm ) separadas 0.25 cm por dos espaciadores y se colocaron en el portaplacas, se alinearon y se sujetaron apretando los tornillos del portaplacas.

B) A continuación se colocaron 3.4 ml de solución del gel separador en forma rápida entre las dos placas de vidrio , se agregó una pequeña cantidad de agua desionizada uniforme para dar una terminación homogénea a la parte superior del gel separador. Se dejó reposar de 10 a 15 min para permitir su polimerización.

C) Posteriormente se eliminó el agua sobrante, y se agregó la solución del gel concentrador en forma rápida sobre el gel separador adicionando solución hasta el borde superior de la placa de vidrio más pequeña, se colocó el peine que sirve como guía para hacer las hendiduras o celdas donde se colocan las muestras.

D) Completada la polimerización de los geles, las dos placas se colocaron en el dispositivo que se introduce en la cámara de electroforesis (cuidando que queden bien selladas con el objeto de que no se fugue el buffer de cámara), se llenó con el buffer el compartimento interno de las placas hasta sobrepasar el borde de la placa interna, se retiraron los peines. Se aplicaron 10  $\mu$ l de la muestra por carril con una microjeringa.

E) En el momento que el frente de corrimiento llega aproximadamente hasta 1 cm antes del final del gel se apagó la fuente de poder.

F) Se desmontaron los porta placas y se despegaron los vidrios para poder sacar los geles. Con la ayuda de guantes se despegaron los geles y se colocaron en un recipiente con la solución reveladora por 1 h.

G) Posteriormente se realizaron tres lavados de 30 seg c/u con la solución decolorante para eliminar el exceso de colorante del gel, finalmente se pasaron los geles a la solución conservadora.

#### **K. Linfoma L5178Y.**

En ratones de la cepa BALB/c se mantuvieron las células tumorales, se inocularon 200,000 células / 100  $\mu$ l por vía intraperitoneal obtenidas por punción intraperitoneal de un ratón portador del linfoma. El inculo se realizó cada 12 días.

#### **L. Aislamiento y cultivo de macrófagos peritoneales normales.**

Se utilizaron ratones de ambos sexos de 5-8 semanas de edad. La obtención de los macrófagos peritoneales se realizó mediante la inoculación intraperitoneal de 2 ml de caldo tioglicolato al 2% en PBS. Cuatro días después se recuperaron los macrófagos mediante lavados de la cavidad peritoneal con medio RPMI-1640. El volumen total (3 ml) de los lavados se juntó en un tubo estéril con tapón de rosca. La suspensión celular se agregó a un volumen igual de NycoPrep, se centrifugó 15 minutos a 450 X g. La banda superior conteniendo a los macrófagos se extrajo con una pipeta pasteur, se determinó el número de macrófagos por ml con hemocitómetro contando el número de células observadas en los 8 cuadrantes del hemocitómetro, esta cantidad se dividió entre 8 y se multiplicó por 10,000. Los macrófagos se cultivaron en una microplaca de 96 pozos, colocando  $2 \times 10^5$  macrófagos/200 $\mu$ l/por pozo (Fig.1).

#### **M. Aislamiento y cultivo de los macrófagos peritoneales de linfoma.**

Los macrófagos fueron obtenidos del líquido de ascitis de la cavidad peritoneal de ratones portadores del linfoma L5178Y. Los ratones portadores del linfoma con 12 días de evolución se sacrificaron por dislocación cervical, . Se tomaron aproximadamente 3 ml del líquido de ascitis y se colocaron en el tubo estéril con tapón de rosca. La suspensión celular se agregó a un volumen igual de NycoPrep, se centrifugó 15 minutos a 450 Xg. La banda superior conteniendo a los macrófagos se extrajo con una pipeta pasteur, se determinó el número de macrófagos por ml con hemocitómetro contando el número de

células observadas en los 8 cuadrantes del hemocitómetro, esta cantidad se dividió entre 8 y se multiplicó por 10,000. Los macrófagos obtenidos se cultivaron en microplaca de 96 pozos, colocando  $2 \times 10^5$  macrófagos/200µl/pozo (Fig.1).

#### **N. Activación de los macrófagos peritoneales.**

Para activar a los macrófagos peritoneales de ratones sanos y de ratones portadores del linfoma se colocaron  $1 \times 10^6$  células en 1 ml de medio RPMI-1640 se agregaron 25 µg de LPS y/o 200 U de rIFN- $\gamma$ . De aquí, se agregaron 200 µl a la microplaca y la producción de nitritos se determinó 48 horas después de la estimulación, por la técnica de Griess.

#### **Ñ. Inhibición de los macrófagos peritoneales por las fracciones.**

Los macrófagos peritoneales ( $1.2 \times 10^7$ ) obtenidos a partir del linfoma L5178Y ó de animales sanos fueron cultivados en microplacas de 96 pozos, colocando  $2 \times 10^5$  macrófagos por pozo con 200 µl de medio RPMI-1640 el cual contenía los activadores: 25 µg de LPS y/o 200 U de IFN- $\gamma$ . Se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. El reto con las fracciones (10 µl) se realizó estimulados con lipopolisacáridos y/o interferón. El reto con las fracciones se realizó 24 h antes y 24 h después de la estimulación. La producción de nitritos se determinó 48 horas después de la estimulación, por la técnica de Griess.

#### **O. Análisis estadístico de los resultados.**

Para determinar si existe una diferencia significativa entre los niveles de nitritos liberados por los macrófagos de ratones sanos y de macrófagos de ratones portadores del linfoma, bajo diferentes condiciones experimentales, se obtuvo la media, la desviación estándar y la prueba de t de Student (Zar, 1974), con una  $P < 0.005$ .

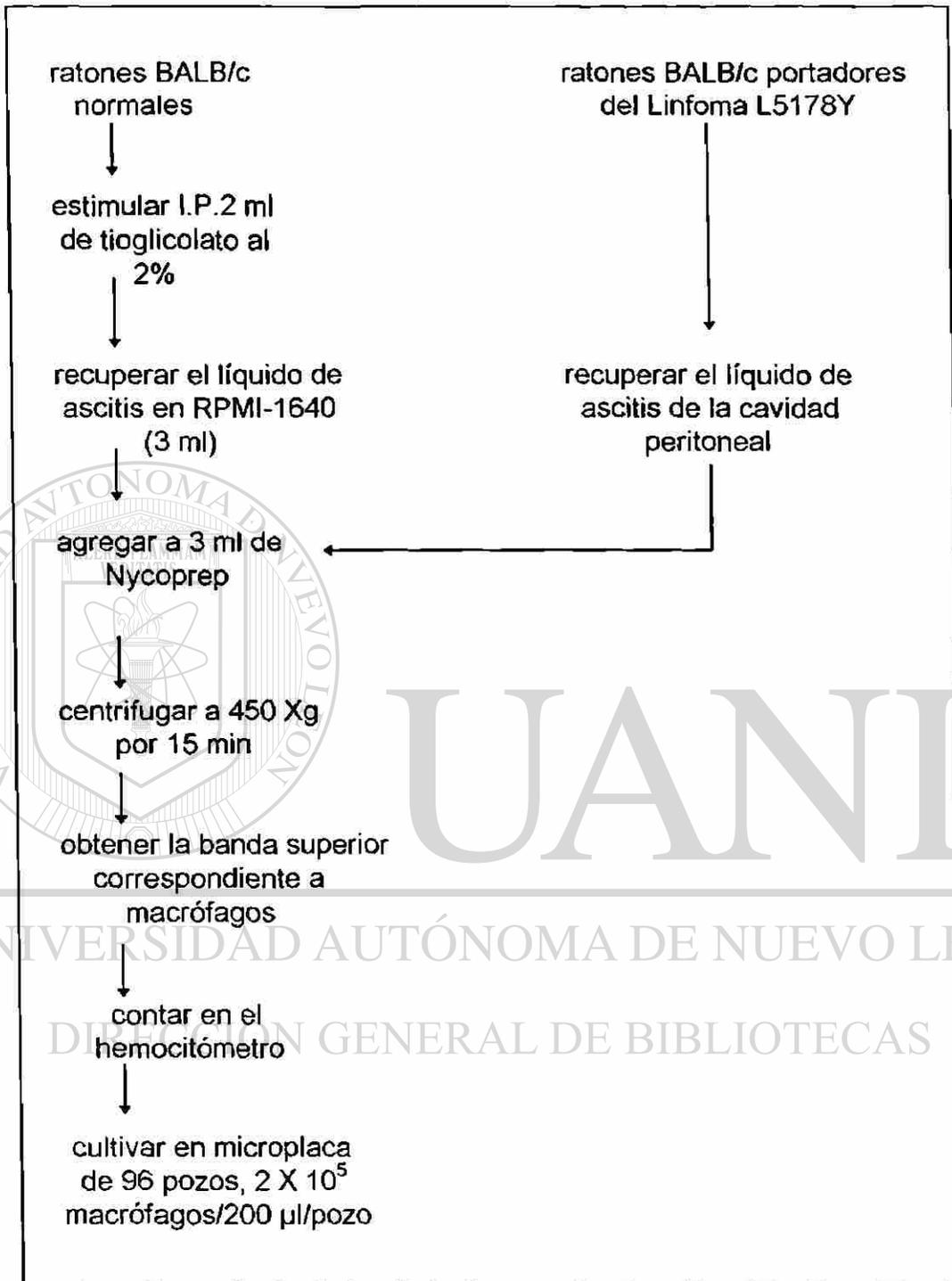
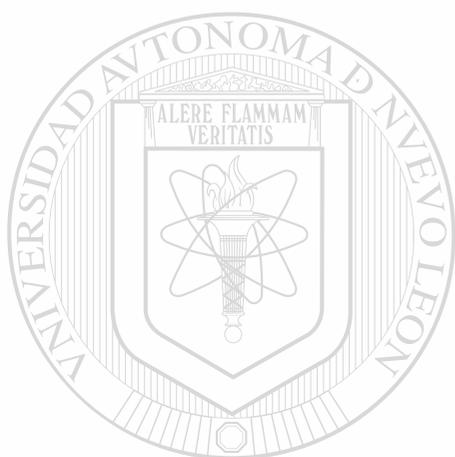


Fig. 1. Diagrama de flujo de la obtención de los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c sanos y de ratones portadores del linfoma.



# RESULTADOS

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

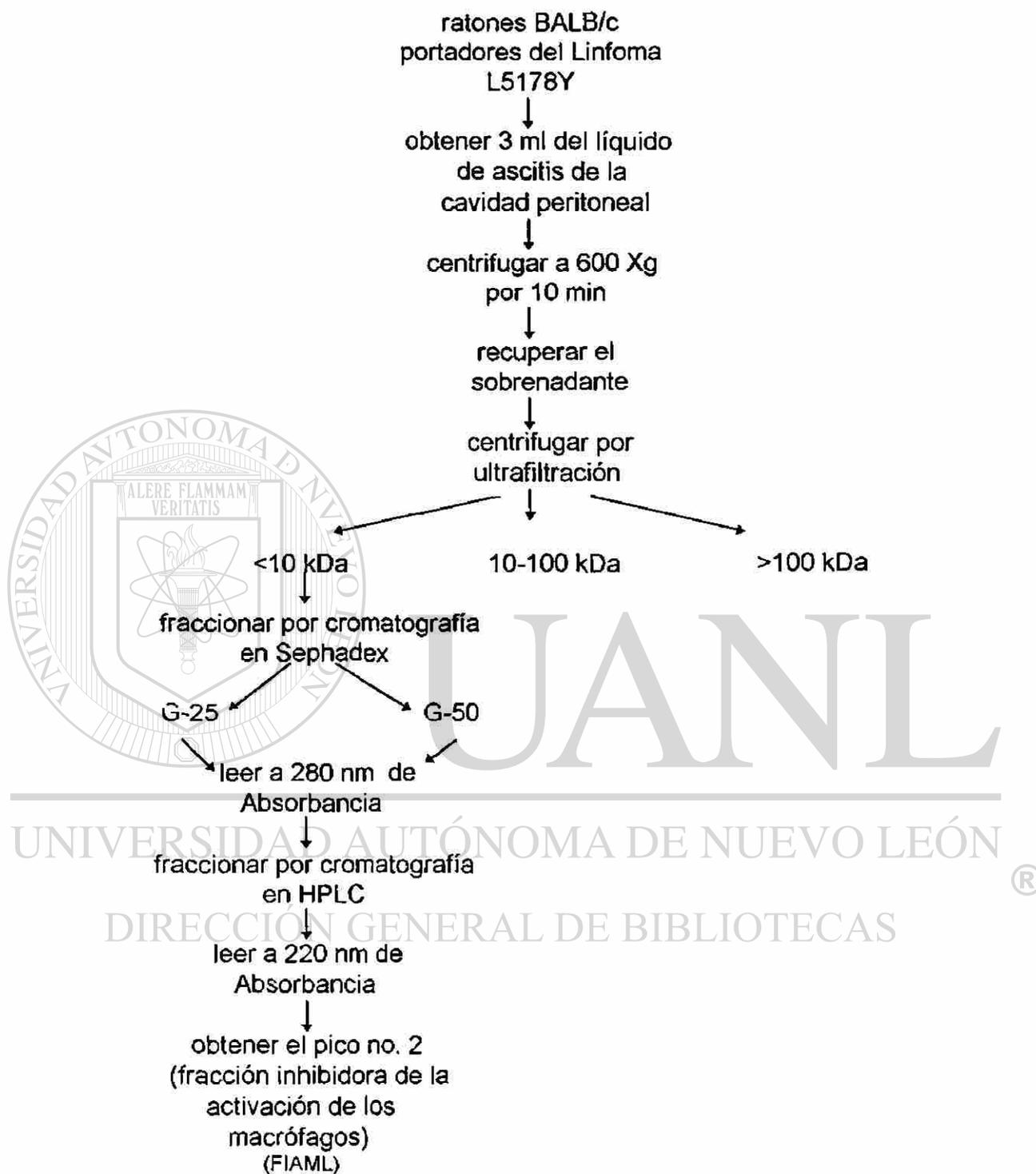


Fig.2. Diagrama de flujo de la obtención del FIAML a partir del Linfoma L5178Y.

### **A. Obtención de las fracciones S1 y S2 a partir del linfoma L5178Y.**

Se obtuvieron de 2 a 3 ml de líquido de ascitis del linfoma L5178Y, el cual se centrifugó a 600 Xg por 10 min, se recuperó un sobrenadante que se denominó fracción S1 y un precipitado o paquete celular. Este último se homogeneizó con un volumen equivalente de solución homogeneizadora de células, se dejó en reposo durante 12 h y se centrifugó a 600 Xg durante 10 min. Después de la centrifugación se obtuvo un sobrenadante o fracción S2 y un precipitado, conteniendo los detritos celulares, el cual se desechó.

### **B. Incubación de los macrófagos con las fracciones S1 y S2 antes y después de su activación con LPS y/o IFN- $\gamma$ .**

1) *Activación con LPS*: Las fracciones S1 y S2, presentaron actividad inhibitoria cuando estas fueron incubadas con los macrófagos 24 h antes de agregar el activador. Los resultados obtenidos al utilizar los macrófagos de ratones sanos, mostraron una inhibición de 76.70 % para S1 y de 21.47 % para S2. Para los macrófagos obtenidos de ratones portadores de linfoma, el porcentaje de inhibición fue del 82 % para S1 y del 22 % para S2. Los valores obtenidos de producción de nitritos se muestran en la Tabla III. No se observaron diferencias significativas entre la respuesta a la estimulación por LPS de los macrófagos provenientes de ratones sanos o de ratones portadores del linfoma. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el efecto inhibitorio de las fracciones S1 y S2 sobre los macrófagos de ratones normales o portadores del linfoma activados previamente con LPS (48 h), con respecto al control (Tabla III). No se obtuvo la desactivación.

2) *Activación con IFN- $\gamma$* . Los macrófagos peritoneales que fueron incubados con las fracciones S1 y S2 durante 24 h y posteriormente activados con IFN- $\gamma$ : mostraron los siguientes resultados: tanto en los macrófagos de ratones sanos como en los macrófagos de ratones portadores del linfoma no se observó inhibición de los nitritos liberados. En respuesta al IFN- $\gamma$  tampoco se observaron diferencias significativas entre los macrófagos de ratones normales y ratones portadores del linfoma. Cuando los macrófagos fueron incubados con el activador (IFN- $\gamma$ ) y posteriormente incubados con las fracciones, no se

observaron diferencias significativas con respecto al control. Los valores obtenidos de producción de nitritos se muestran en la Tabla IV.

3) *Activación con la mezcla de LPS e IFN- $\gamma$* : En la liberación de nitritos por macrófagos de ratones sanos y de ratones portadores de linfoma, activados con la mezcla de activadores, no se observaron diferencias significativas comparadas con el control para ninguno de los dos casos, con ninguna de las fracciones. De igual manera, no se observaron diferencias significativas cuando se dio primero la activación de los macrófagos (Tabla V).

Estos resultados mostraron que el inhibidor se encontró en mayor proporción en la fracción S1, y que éste es capaz de inhibir la activación con LPS considerando la liberación de nitritos como un índice de activación. Sin embargo este inhibidor no induce su desactivación.

Por otra parte no se observaron diferencias en la activación con LPS y/o IFN- $\gamma$  entre los macrófagos provenientes de ratones sanos o portadores del linfoma.

### **C. Cromatografía de la fracción S1 en Sephadex G-50.**

Considerando que la mayor actividad inhibitoria se encontró en la fracción S1, la purificación parcial del inhibidor se continuó con dicha fracción. Los resultados de la cromatografía en Sephadex G-50 de dicha fracción dieron un perfil de 21 picos, de los cuales solo en el pico No. 14 se detectó actividad inhibitoria. El perfil obtenido se muestra en la figura 3. Dado que la actividad no se encontró en los primeros picos, que corresponden a proteínas de alto peso molecular (30 a 60 kDa), se consideró eliminar estas por ultrafiltración antes de la cromatografía en columna .

**TABLA III. Actividad inmunosupresora *in vitro* de las fracciones S1 Y S2 del linfoma L5178Y sobre los macrófagos obtenidos en ratones BALB/c sanos y portadores del linfoma, activados con LPS.**

| Adición al cultivo de macrófagos | Liberación de nitritos ( $\mu$ Moles) |                       |
|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
|                                  | Macrófagos normales                   | Macrófagos de linfoma |
| S1 / LPS                         | 4.21 $\pm$ 1.91 *                     | 3.72 $\pm$ 0.46*      |
| S2 / LPS                         | 14.19 $\pm$ 1.12 *                    | 14.04 $\pm$ 0.82*     |
| LPS / S1                         | 19.20 $\pm$ 2.53                      | 18.54 $\pm$ 0.93      |
| LPS / S2                         | 19.26 $\pm$ 1.81                      | 22.52 $\pm$ 0.90      |
| CONTROL LPS                      | 18.07 $\pm$ 1.88                      | 16.95 $\pm$ 1.71      |

\* Significativo P < 0.05

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la DE por triplicado de tres experimentos similares. Se colocaron 0.2136 mg de la fracción S1 y 0.1555 mg de la fracción S2, 24 h antes y 24 h después de agregar el activador. Se agregaron 5  $\mu$ g de LPS a una cantidad de  $2 \times 10^5$  macrófagos 48 h antes y 48 h después de colocar las fracciones S1 y S2.

**TABLA IV. Actividad inmunosupresora *in vitro* de las fracciones S1 Y S2 de linfoma L5178Y sobre los macrófagos obtenidos en ratones BALB/c sanos y portadores del linfoma, activados con IFN- $\gamma$ .**

| Adición al cultivo de macrófagos | Liberación de nitritos ( $\mu$ Moles) |                       |
|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
|                                  | Macrófagos normales                   | Macrófagos de linfoma |
| S1 / IFN- $\gamma$               | 20.21 $\pm$ 1.67                      | 16.59 $\pm$ 0.29      |
| S2 / IFN- $\gamma$               | 21.71 $\pm$ 3.89                      | 17.89 $\pm$ 1.51      |
| IFN- $\gamma$ / S1               | 21.71 $\pm$ 2.42                      | 21.29 $\pm$ 1.51      |
| IFN- $\gamma$ / S2               | 19.97 $\pm$ 3.71                      | 17.56 $\pm$ 2.00      |
| CONTROL IFN- $\gamma$            | 19.20 $\pm$ 1.01                      | 17.25 $\pm$ 0.42      |

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la DE por triplicado de tres experimentos similares. Se colocaron 0.2136 mg de la fracción S1 y 0.1555 mg de la fracción S2, 24 h antes y 24 h después de agregar el activador. Se agregaron 40 U de IFN- $\gamma$  a una cantidad de  $2 \times 10^5$  macrófagos 48 h antes y 48 h después de colocar las fracciones S1 y S2.

**TABLA V. Actividad inmunosupresora *in vitro* de las fracciones S1 Y S2 de linfoma L5178Y sobre los macrófagos obtenidos en ratones BALB/c sanos y portadores del linfoma, activados con la mezcla de LPS e IFN- $\gamma$**

| Adición al cultivo de macrófagos | Liberación de nitritos ( $\mu$ Moles) |                       |
|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
|                                  | Macrófagos normales                   | Macrófagos de linfoma |
| S1 / IFN- $\gamma$ + LPS         | 16.36 $\pm$ 1.05                      | 17.22 $\pm$ 1.15      |
| S2 / IFN- $\gamma$ + LPS         | 15.52 $\pm$ 0.77                      | 17.33 $\pm$ 1.54      |
| IFN- $\gamma$ + LPS / S1         | 21.90 $\pm$ 1.06                      | 19.75 $\pm$ 1.20      |
| IFN- $\gamma$ + LPS / S2         | 19.97 $\pm$ 2.89                      | 18.37 $\pm$ 2.13      |
| CONTROL LPS + IFN- $\gamma$      | 18.90 $\pm$ 3.19                      | 18.46 $\pm$ 2.68      |

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la DE por triplicado de tres experimentos similares.

Se colocaron 0.2136 mg de la fracción S1 y 0.1555 mg de la fracción S2, 24 h antes y 24 h después de agregar la mezcla de los activadores. Se agregaron 5  $\mu$ g de LPS y 40 U de IFN- $\gamma$  a una cantidad de  $2 \times 10^5$  macrófagos 48 h antes y 48 h después de colocar las fracciones S1 y S2.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

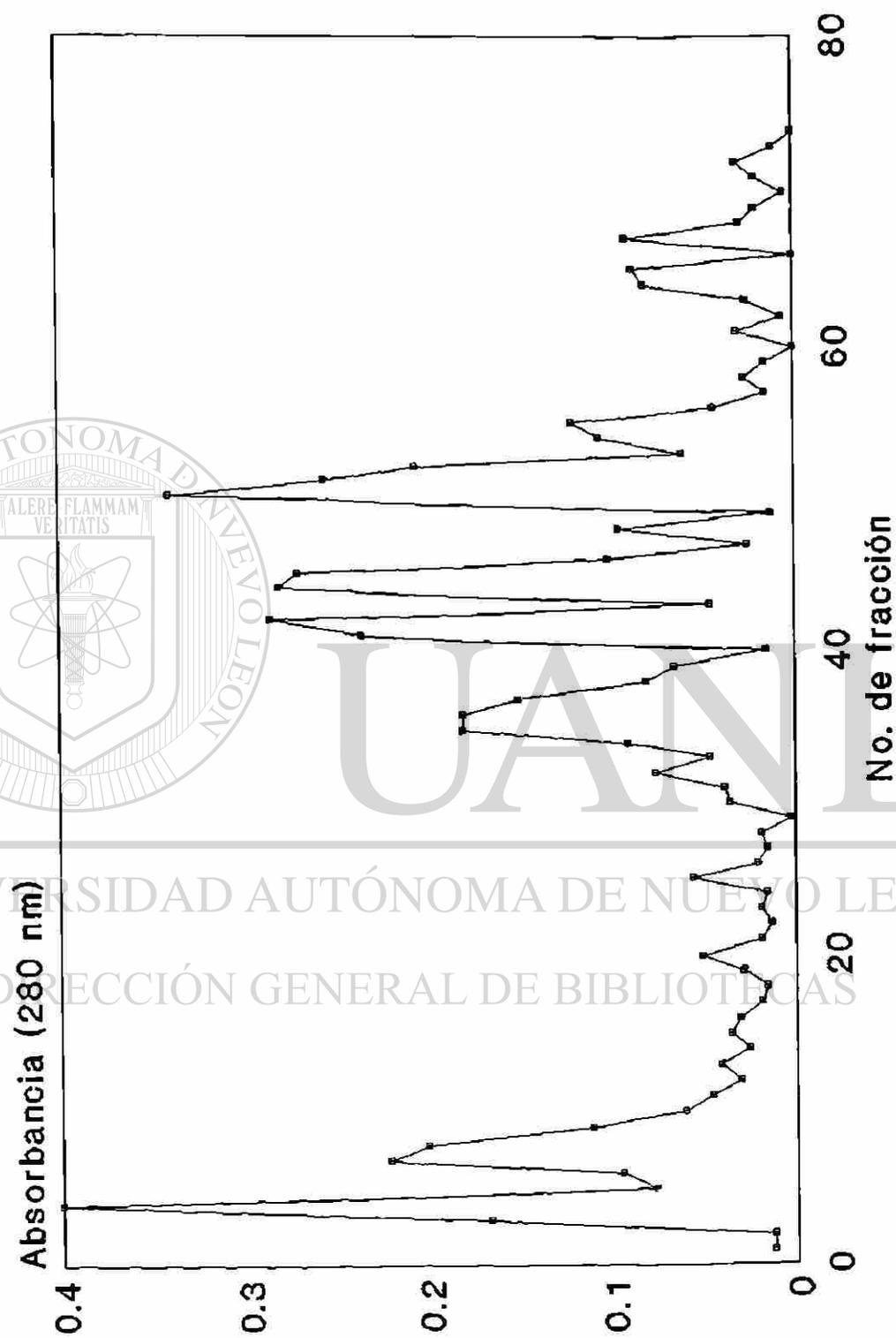
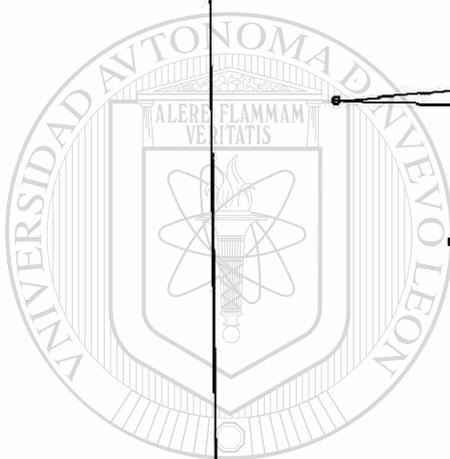


Fig. 3. Perfil cromatográfico de la fracción S1 en la columna de Sephadex G-50.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### **D. Ultrafiltración.**

La fracción S1 fue sometida a un proceso de ultrafiltración utilizando membranas de corte de 10 y 100 kDa. Se obtuvieron tres fracciones; una fracción menor de 10 kDa (S1-10), otra de 10 a 100 kDa (S1-10-100) y la última mayor de 100 kDa (S1-100). La mayor actividad inhibitoria se encontró en la fracción menor de 10 kDa, a ésta se le denominó S1-10 (Tabla VI).

#### **E. Estabilidad de la fracción S1-10.**

*Termoestabilidad* : la fracción S1-10 fue calentada en baño maría durante 30 min a 56 °C y posteriormente se probó su capacidad de inhibición, la cual fue positiva en un 100% (Tabla VII).

#### **F. Fraccionamiento de la fracción S1-10 por cromatografía en columna.**

Se analizó la fracción S1-10 con dos diferentes resinas: Sephadex G-50 y G-25. Los resultados mostraron una mejor resolución cuando se empleo Sephadex G-25.

El perfil obtenido en la cromatografía en Sephadex G-50 de la fracción S1-10 dio un perfil de 6 picos (Fig.4), la actividad inhibitoria se localizó en el pico 3. Dicha inhibición fue del 100%.

El perfil de la cromatografía en Sephadex G-25 presentó una mejor resolución (Fig. 5) en donde se distinguen 4 picos. La actividad inhibitoria fue localizada en el pico No.1, mostrando un 100 % de inhibición (Tabla VIII). A esta fracción se le denominó 1-G-25.

El proceso de purificación a partir de S1-10 se repitió hasta agotar la muestra inicial. El volumen total obtenido por la recolección de las fracciones 1-G-25 obtenidas, se concentró por liofilización. La muestra resultante se resuspendió en 1 ml de agua desionizada y se comprobó su actividad inhibitoria (Tabla VII).

**TABLA VI. Actividad inmunosupresora *in vitro* de las fracciones: S1-100, S1-10-100 y S1-10 (ultrafiltración) de linfoma L5178Y sobre los macrófagos peritoneales obtenidos en ratones BALB/c portadores del linfoma, activados con LPS.**

| Adición al cultivo de macrófagos | Liberación de nitritos ( $\mu$ Moles) |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| S1- 100 / LPS                    | 12.78 $\pm$ 0.83                      |
| S1- 10-100 / LPS                 | 11.13 $\pm$ 0.66                      |
| S1-10 / LPS                      | 0.0                                   |
| CONTROL DE LPS                   | 13.80 $\pm$ 2.80                      |

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la DE por triplicado de tres experimentos similares.

Se colocaron: 0.00244 mg de la fracción S1-100, 0.0464 mg de la fracción S1-10-100 y 0.02835 mg de la fracción S1-10. Se agregaron 5  $\mu$ g de LPS/pozo 48 h después de agregar las fracciones.

**TABLA VII. Actividad inmunosupresora *in vitro* de la fracción S1-10 termoestable ( 56 °C/ 30 min. ), y liofilizada, sobre los macrófagos peritoneales obtenidos en ratones BALB/c portadores del linfoma y activados con LPS.**

| Adición al cultivo de macrófagos | Liberación de nitritos ( $\mu$ Moles) |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| S1-10 (termoestable) / LPS       | 0.0                                   |
| S1-10 (liofilizada) / LPS        | 0.0                                   |
| CONTROL DE LPS                   | 13.80 $\pm$ 2.80                      |

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la DE por triplicado de tres experimentos similares.

Se colocaron: 0.02835 mg de la fracción S1-10 y 5  $\mu$ g de LPS a una cantidad de  $2 \times 10^5$  macrófagos. Se agregaron 5  $\mu$ g de LPS/pozo 48 h después de agregar las fracciones.

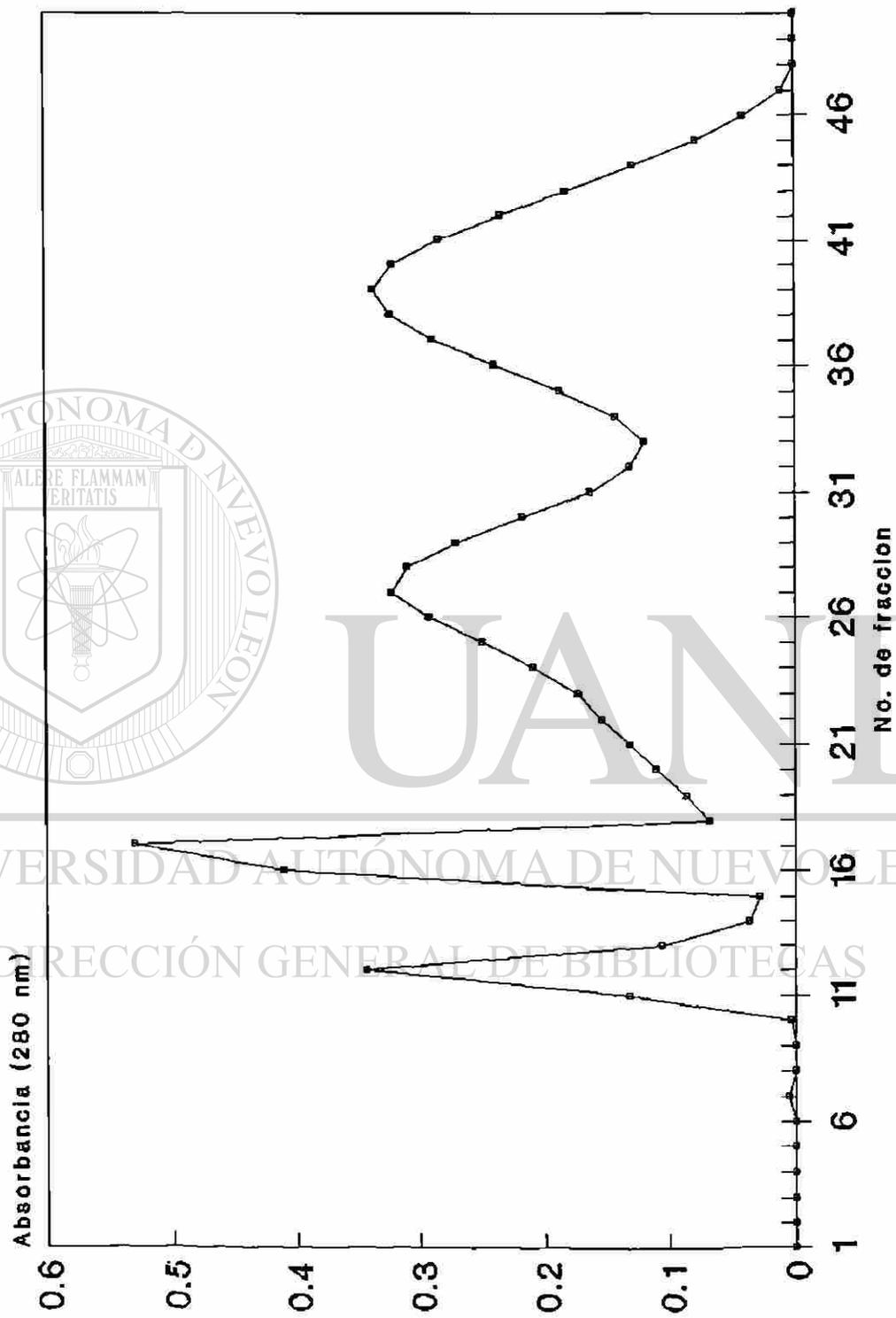
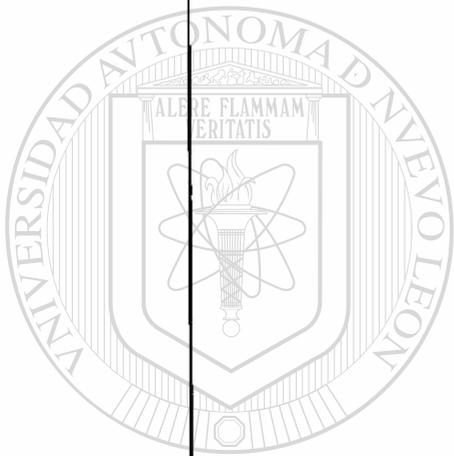


Fig. 5. Perfil cromatográfico de la fracción S1-10 en la columna de Sephadex G-25.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

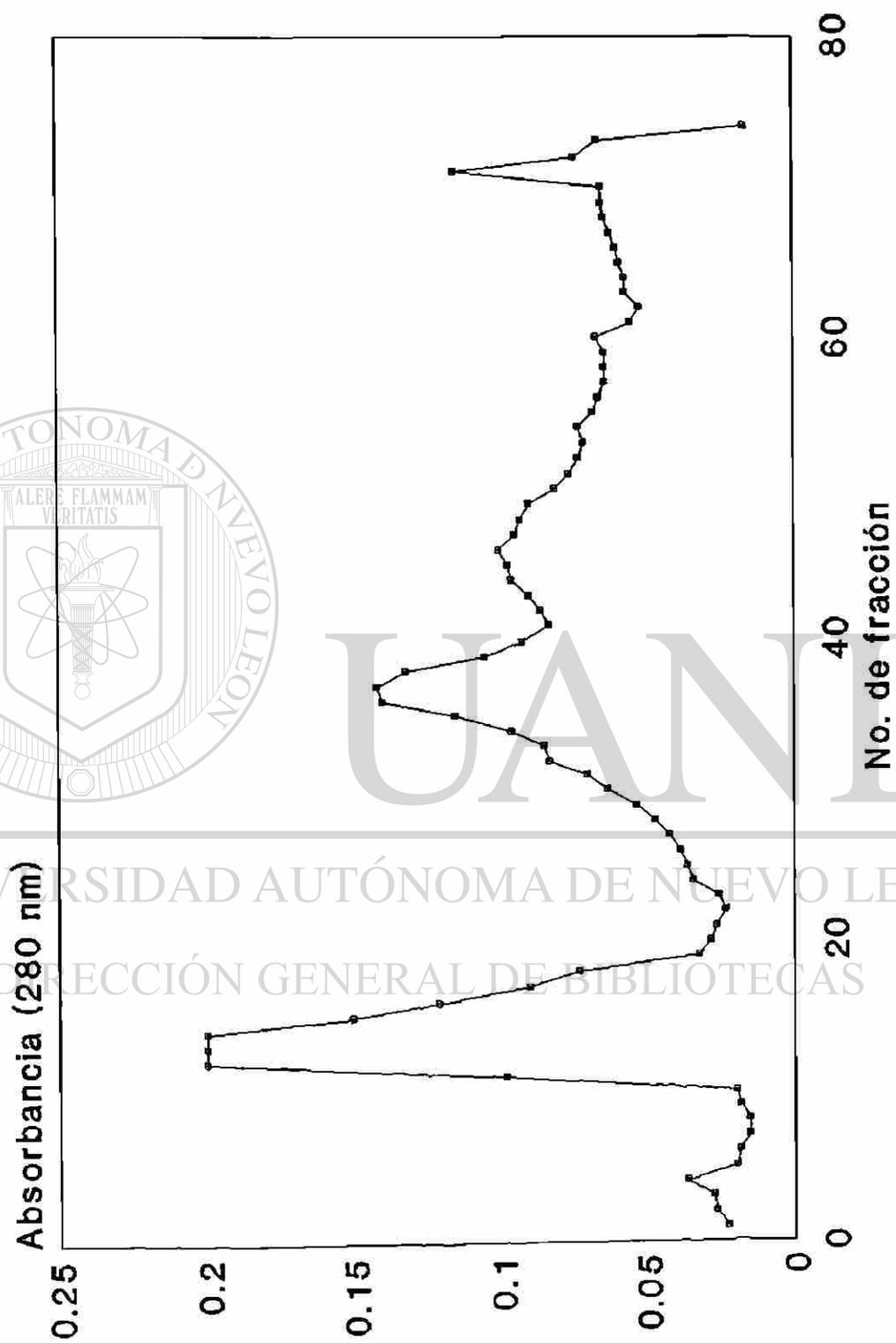


Fig. 4. Perfil cromatográfico de la fracción S1-10 en la columna de Sephadex G-50.

**TABLA VIII. Actividad inmunosupresora *in vitro* de las fracciones: Pico 1, pico 2 y pico 3 (Sephadex G-25) de linfoma L5178Y sobre los macrófagos peritoneales obtenidos en ratones BALB/c portadores del linfoma, activados con LPS.**

| Adición al cultivo de macrófagos | Liberación de nitritos ( $\mu$ Moles) |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| PICO 1                           | 0.0                                   |
| PICO 2                           | 14.66 $\pm$ 0.59                      |
| PICO 3                           | 14.10 $\pm$ 1.30                      |
| CONTROL DE LPS                   | 14.20 $\pm$ 0.17                      |

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la DE por triplicado de tres experimentos similares.

Se colocaron: 10  $\mu$ l de cada uno de los picos obtenidos por Sephadex G-25 y se agregaron 5  $\mu$ g de LPS/pozo 48 h después de agregar las fracciones.

### G. Cromatografía en HPLC en fase reversa de la fracción 1-G-25.

De la muestra liofilizada y resuspendida en 1 ml de agua desionizada, se tomaron 50  $\mu$ l y se inyectaron en la columna Novapack C-18. Se colectaron 35 fracciones eluidas a 500  $\mu$ l/min con un paso de gradiente de 0 a 40 % de acetonitrilo. La lectura se realizó a 280 y 220 nm, las mejores lecturas se obtuvieron a 220 nm. En la figura 7 se muestra el perfil obtenido, en el cual se observaron 4 picos de los cuales solo el pico 2 o fracción 2-HPLC-C-18, presentó la actividad inhibitoria (Tabla IX).

La fracción 2-HPLC-C18 fue estable a altas temperaturas (56 °C durante 30 min.).

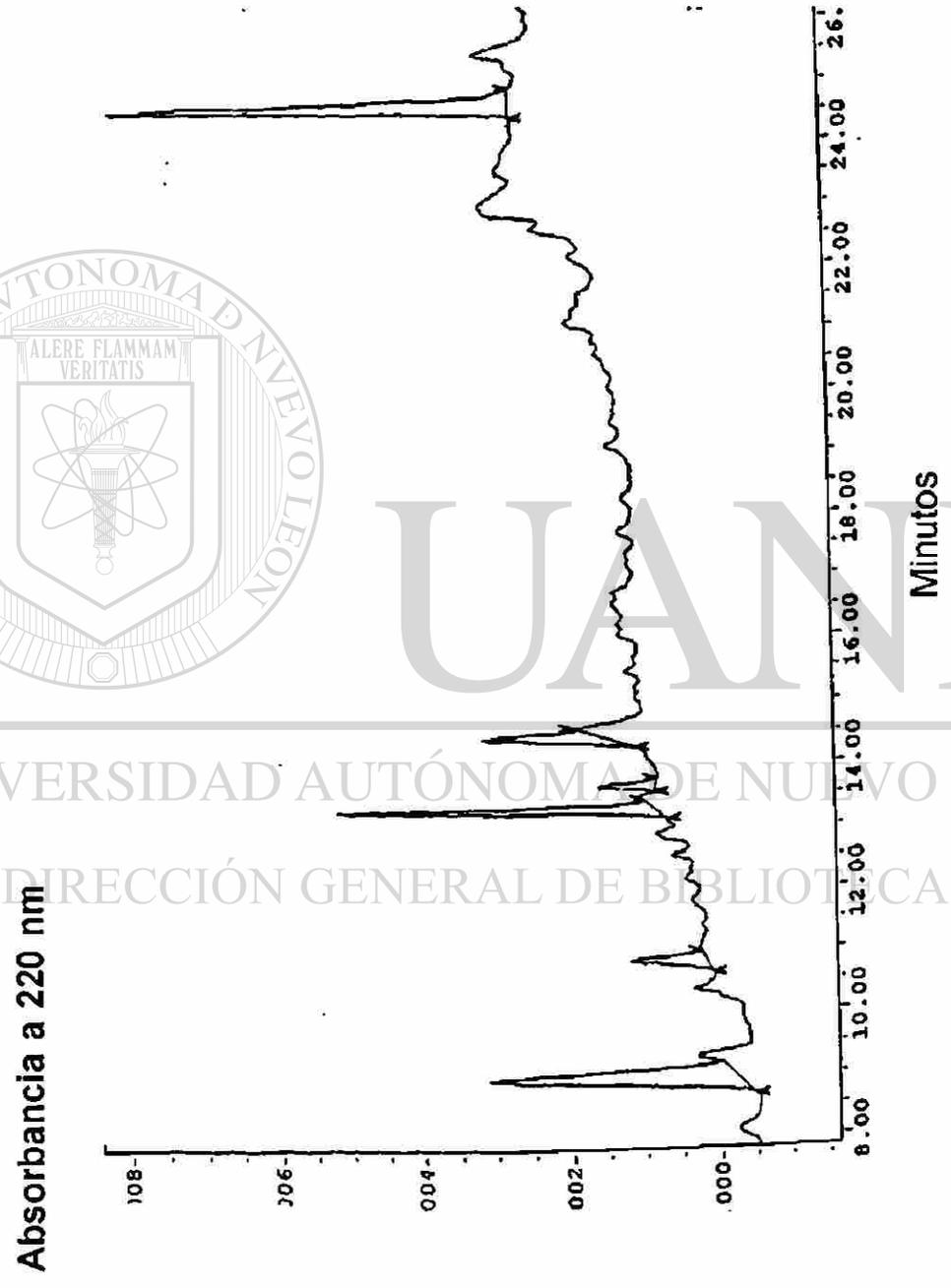
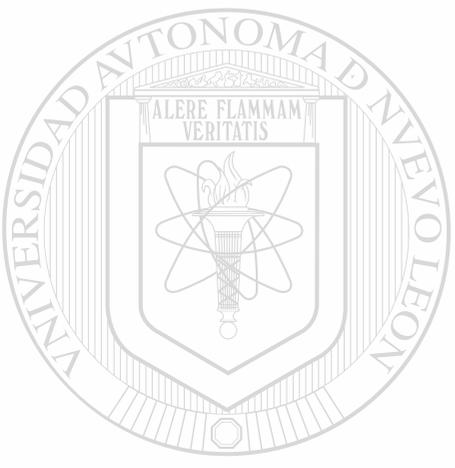


Fig. 6. Perfil cromatográfico de la fracción 1-G-25 en HPLC.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**TABLA IX Actividad inmunosupresora *in vitro* de las fracciones: Pico 1, pico 2 y pico 3 (HPLC) del linfoma L5178Y sobre los macrófagos peritoneales obtenidos en ratones BALB/c portadores del linfoma, activados con LPS.**

| Adición al cultivo de macrófagos | Liberación de nitritos ( $\mu$ Moles) |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| PICO 1                           | 13.06 $\pm$ 0.18                      |
| PICO 2                           | 3.08 $\pm$ 1.02                       |
| PICO 3                           | 14.66 $\pm$ 0.86                      |
| PICO 4                           | 13.55 $\pm$ 0.57                      |
| CONTROL DE LPS                   | 14.73 $\pm$ 0.99                      |

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la DE por triplicado de tres experimentos similares.

Se colocaron: 10  $\mu$ l de cada uno de los picos obtenidos por HPLC y se agregaron 5  $\mu$ g de LPS/ pozo, 48 h después de colocar las fracciones, a una cantidad de  $2 \times 10^5$  macrófagos.

**H. Cromatografía en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) al 15 %, de la fracción inhibidora.**

La fracción 1-G-25 fue tratada bajo condiciones de reducción y no reducción en altas temperaturas y temperatura ambiente. En condiciones reductoras tanto a temperatura ambiente como a altas temperaturas la muestra se degradó, por lo que no se observaron bandas.

En condiciones no reductoras y temperatura ambiente, el perfil electroforético mostró cuatro bandas de 25 a 32 kDa. En condiciones no reductoras y altas temperaturas la fracción se polimerizó y/o agregó dando origen a bandas de mayor peso molecular (Fig. 7).



Fig. 7. Cromatografía en gel de acrilamida al 15% de la fracción 1-G-25.

## I. Purificación y actividad relativa.

1) *Unidad*: Una unidad inhibitoria (UI) es definida como el 50% de  $\mu\text{Moles}$  de nitritos liberados del control. Por ejemplo, la liberación de nitritos por los macrófagos peritoneales activados con LPS fue de  $149.2 \mu\text{Moles / ml}$ , por lo que 1 UI corresponde a  $74.6 \mu\text{Moles de nitritos/ml}$  bajo las condiciones experimentales de éste estudio. La actividad relativa se calculó dividiendo las UI obtenidas por ml, entre los miligramos de proteína/ml de cada fracción.

$$\text{Actividad relativa} = \frac{\text{UI / ml}}{\text{mg / prot. /ml}}$$

Se observó un aumento de la actividad relativa con el avance de la purificación de la muestra, siendo de  $0.069 \text{ UI/mg}$  para la fracción S1, hasta alcanzar un valor de  $105.71 \text{ UI/mg}$  en la fracción 2-HPLC-C18 (Tabla X).

2) *Purificación*: El grado de purificación se determinó dividiendo los miligramos de proteína total inicial de la fracción S1 entre los miligramos de proteína total recuperada en la etapa de purificación correspondiente. La purificación alcanzada al final del proceso fue de 3051.42 veces con respecto a la muestra inicial S1.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

mg prot. total inicial (S1)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

mg prot. recuperada al

final del proceso



**Tabla X. Tabla comparativa de las concentraciones necesarias de las diferentes fracciones con las que se obtuvo una actividad inhibitoria.**

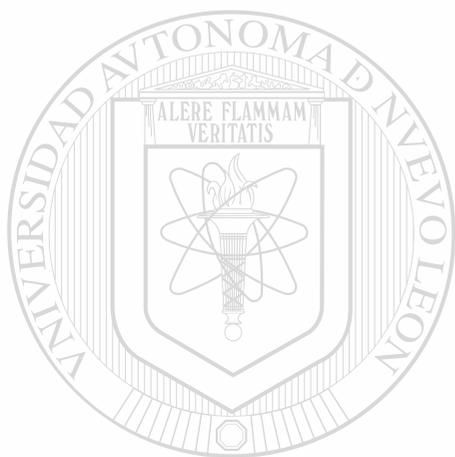
| Fracción    | Proteína total (mg) | Actividad relativa* (U/mg de proteína) | Purificación |
|-------------|---------------------|--|--------------|
| S1          | 42.72               | 0.069                                  | --           |
| S1-10       | 5.67                | 0.746                                  | 7.53         |
| 1-G-25      | 0.08                | 25.000                                 | 534.00       |
| 2-HPLC-C-18 | 0.014               | 105.710                                | 3051.42      |

\* La actividad relativa se calculó dividiendo las UI obtenidas por ml, entre los miligramos de proteína/ml de cada fracción.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



## **DISCUSION**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se ha hipotetizado, que una función evolutivamente esencial del sistema inmune de los vertebrados, es reconocer y destruir células neoplásicas malignas. De acuerdo a esta hipótesis, aquellos neoplasmas que son vistos como tumores verdaderos pueden ser eliminados naturalmente. A pesar de ello muchos tumores malignos se desarrollan y se ha sugerido que la no detección y destrucción de la célula neoplásica se deba a algún defecto en el mecanismo de la inmunovigilancia (Burnet, 1970, Kensey y col., 1973).

Dentro de las tareas principales del inmunólogo tumoral están el descubrir porque el mecanismo de inmunovigilancia falla al no detectar y destruir células tumorales, y porque las células del sistema inmunológico no ejercen sus funciones normales para destruir un tumor progresivo.

La capacidad de inhibir la función de los macrófagos puede ser uno de los mecanismos por medio del cual las células neoplásicas escapan a la destrucción y se convierten en tumores establecidos. Se han descrito varios factores de origen tumoral que inhiben la migración, la quimiotaxis, la actividad microbicida y la actividad antitumoral de los macrófagos (Pike y col., 1976, Snyderman y col., 1976, North y col., 1976, Szuro-Sudol y col., 1983, Tang y col., 1991 y Siziopikou y col., 1991). North y col., en 1976, comprobaron que la inyección subcutánea de células de sarcoma, fibrosarcoma, mastocitoma, carcinoma y linfoma, liberaron un factor a la circulación que suprime severamente la habilidad del ratón a resistir la infección experimental por *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolítica*. En base al conocimiento de que la resistencia natural y adquirida hacia la infección por *Listeria* es modulada por los macrófagos, los autores sugieren que el factor supresor tumoral ejerce su efecto directa e indirectamente, interfiriendo con la función de estas células fagocíticas. (North y col., 1976, b).

Nuestros datos confirmaron la presencia de un inhibidor de la activación de los macrófagos peritoneales, tanto en el líquido de ascitis como en el homogenado celular del tumor L5178Y. Detectamos que la actividad inhibitoria es mayor en el líquido de ascitis que en el homogenado celular, por lo que se decidió continuar con la purificación del FIAML a partir de la fracción S1. Estos resultados coinciden con los de otros grupos de investigadores, quienes han reportado la existencia de factores inmunosupresores en el líquido de ascitis de

otros tumores como, linfoma YAC, mastocitomas y gastrointestinales (Cornelius y col., 1988, Tamura y col., 1981, Spitalny y col., 1980, Hirte y col., 1991, Fuji y col., 1987, Badger y col., 1977). Sin embargo, no todos han sido caracterizados por lo que no se puede establecer aun si se trata de un factor común o solo es un fenómeno común pero a consecuencia de diferentes factores.

Por otra parte, se ha sugerido que los macrófagos de pacientes con cáncer o animales portadores de algún tipo de tumor, presentan una actividad disminuida cuando éstos son activados *in vitro* con LPS y/o IFN- $\gamma$  y no recuperan su capacidad de activación (Yurochko AD y col., 1990, Klobuscicka M y col., 1992, Bilyk y col., 1995) argumentándose que los macrófagos provenientes de pacientes con cáncer o animales portadores de alguna neoplásia presentan *per se* una deficiencia en su capacidad de respuesta. Sin embargo, nosotros encontramos que la respuesta de los macrófagos obtenidos de ratones sanos, fue igual a la de los macrófagos obtenidos de ratones portadores de linfoma, es decir conservaron su actividad, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Srimal y col., 1990, Tang y Siziopikou y col., 1991). Inclusive Willtrout y col. (1982), demuestran que los macrófagos obtenidos de ratones portadores del linfoma L5178Y, pueden ser activados por LPS o poly I:C para llevar a cabo la citólisis de las linfoblastos malignos, es decir, conservan todo su potencial; por lo que consideramos que la no activación de los macrófagos en presencia del tumor no se trata de un defecto de los macrófagos, sino de la existencia de por lo menos un inhibidor.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Es importante mencionar que la inhibición se presentó cuando los macrófagos fueron activados por LPS pero no por IFN- $\gamma$ . Consideramos la posibilidad de que la inhibición de los macrófagos sea de alguna manera específica o dirigida. El mecanismo celular, bioquímico y molecular del LPS no es bien conocido. Xiaoke, en 1993, determinó que el LPS induce efectos de estimulación selectiva en la producción de TNF- $\alpha$  y NO en macrófagos peritoneales murinos, probablemente por las siguientes causas: a) iniciando cambios intracelulares donde se lleva a cabo la ruta bioquímica de la producción de TNF- $\alpha$  y NO, b) que el LPS pudiera iniciar algunos de los pasos comunes en la señal de transcripción y c) que module selectivamente la respuesta de los macrófagos a un nivel subsecuente

a la activación de los factores de transcripción tales como el NF- $\kappa$ B. El concluye que pueden estar involucrados diferentes mecanismos en el disparo y estimulación de los macrófagos para producir NO y que se requiere de estudios posteriores que ayuden a esclarecer las funciones de los LPS sobre los macrófagos. Actualmente se sabe que el LPS incrementa la transcripción del marcador CD14. El CD14 es una glicoproteína membranal que sirve como receptor para el LPS, esta involucrada en la producción de citocinas inducida por LPS, y su efecto es bloqueado por anticuerpos contra CD14 (Landman R y col, 1996). También se sabe que el LPS a diferentes concentraciones estimula la producción de TNF- $\alpha$  (0.01 ng/ml de LPS), IL-6 (0.1 ng/ml de LPS) y NO (1 ng/ml de LPS) (Hirohashi y Morrison, 1996).

Un análisis comparativo del mecanismo de inhibición del FIAML y de otros inhibidores, sugirió que probablemente se traten de factores diferentes. Ya que por ejemplo el factor liberado por las células de cáncer de pulmón, inhibe la activación de los macrófagos tanto por LPS como por IFN- $\gamma$ . (Siziopikou y col., 1991), difiriendo con ello con el FIAML. Otra característica del factor inhibidor identificado en este estudio, es que el factor inhibe la activación de los macrófagos pero no revierte su activación. Esto muestra diferencias con otros factores de regulación negativa de los macrófagos; como el TGF- $\beta$  <sub>1,2,3</sub> (Tsunawaki y col., 1988, Vodovotz y col., 1993), el MDF (Tsunawaki y col., 1986, Srimal y col., 1990), el CGRP (Nong y col., 1989), la IL-4 (Hart y col., 1989, Lehn y col., 1989) y la IL-10 (Bogdan y col., 1991, Fiorentino y col., 1991, Hart y col., 1995), los cuales desactivan a los macrófagos pero no inhiben su activación (Tabla XI).

Se sabe que el linfoma L5178Y expresa los genes que codifican para la IL-10 (factor de regulación negativa de los macrófagos) (Alcocer y col., 1996), sin embargo ninguna de sus características físicas o biológicas corresponden a las del FIAML, por lo que se descarta la posibilidad de que se trate de esta interleucina. Por otra parte el linfoma no expresa la IL-2, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  (Alcocer y col., 1996). Por lo cual la posibilidad de que se trate de estos inmunoreguladores también se desecha.

Es importante mencionar que a pesar de que durante el proceso de purificación del FIAML se utilizaron filtros de corte de 10 kDa, la

cromatografía en gel de acrilamida detectó moléculas de mayor peso molecular. Bajo condiciones no reductoras y temperatura ambiente, mostró un arreglo de cuatro bandas de 25 a 32 kDa y en condiciones no reductoras y temperatura de ebullición se observaron tres bandas de 26, 48 y 60 kDa. Los resultados sugieren que las bandas observadas a temperatura ambiente se agregan al incrementarse la temperatura, formando moléculas de mayor peso molecular. Este comportamiento fisicoquímico es similar al descrito para el factor movilizador de lípidos liberado en el líquido de ascitis de diferentes tumores, como linfomas, hepatomas, sarcomas, entre otros (McDevitt y col., 1995). Este factor movilizador de lípidos tiene un peso molecular de 24 kDa, se agrega a temperatura de ebullición originando una molécula más potente, pero no se ha informado si tiene alguna función inhibitoria sobre los macrófagos. Con los datos que se tienen no se puede asegurar que se trate del mismo factor o sean diferentes.

Es posible que el perfil de elución obtenido por HPLC, corresponda al perfil electroforético en condiciones no reductoras y temperatura ambiente. De acuerdo con los resultados, únicamente uno de los picos del HPLC mantuvo la actividad inhibitoria, por lo que se puede pensar que el factor inhibitorio corresponde a una de las bandas y por lo tanto su peso molecular es de 25 a 32 kDa.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Tabla XI. Reguladores negativos de la activación de los macrófagos.**

| Factor       | PM (kDa) | Origen  | Función              |
|--------------|----------|---|----------------------|
| FIAML        | 28-32    | linfoma L5178Y                                  | Inhibe la activación |
| TGF- $\beta$ | 25       | Cel T, plaquetas, mastocitoma (A)               | Desactivación        |
| MDF          | 13       | Mastocitoma P815 (A)                            | Desactivación        |
| CGRP         | 3.789    | Cel. del sist. nervioso                         | Desactivación        |
| IL-4         | 14-16    | Cel. T (A,H)                                    | Desactivación        |
| IL-10        | 18.5     | Cel. T, B, linfoma, cel. cebadas, m $\emptyset$ |                      |

A = Animal, H = Humano

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

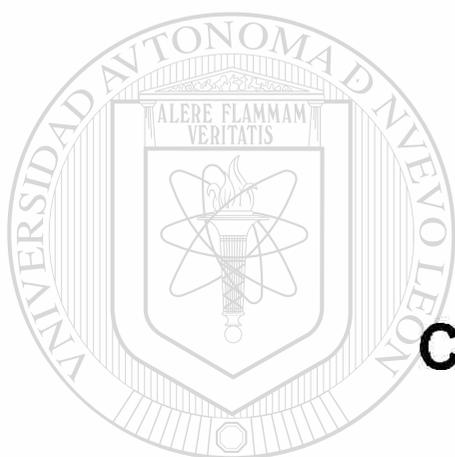
El FIAML fue estable a 56 °C por 30 min.. De forma similar que el factor reportado por el grupo de Nimberg (1975), sin embargo este factor difiere en su peso molecular con el FIAML, lo que indica que se trata de factores diferentes.

Los resultados referentes al peso molecular y termoestabilidad del FIAML reportados por nosotros son congruentes con lo reportado por los grupos de Rhodes y (1979) y Cianciolo (1981), para los factores inhibidores que ellos identificaron. Sin embargo, debido a que se utilizaron diferentes técnicas para monitorear su efecto, no se puede asegurar si se trata del mismo factor.

En general, la mayoría de los factores inhibidores de la respuesta inmune celular, se han identificado de manera parcial, describiéndose principalmente como moléculas de peso molecular que varía de 10 hasta 70 kDa, termoestables, sensibles a tripsina y algunos de ellos relacionados con proteínas de origen viral. Por lo tanto, estas características son insuficientes para establecer una constante general entre los diferentes inmunosupresores de origen tumoral.

El grado de pureza alcanzado para el FIAML y su disponibilidad relativa permitirán su posterior caracterización biológica, incluyendo sus mecanismos de acción y su búsqueda en otros tumores, tanto en el suero de animales portadores de un tumor, como en el suero de pacientes con cáncer.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# CONCLUSIONES

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1. Se determinó la existencia de un factor inhibidor de la activación de los macrófagos peritoneales, en el líquido de ascitis del linfoma L5178Y (FIAML).
2. El FIAML es capaz de inhibir la activación de los macrófagos estimulados por un antígeno (LPS) pero no por una citocina (IFN- $\gamma$ ).
3. El FIAML es capaz de inhibir la activación de los macrófagos pero no induce su desactivación.
4. El factor inhibidor presenta un peso molecular de 25 a 32 kDa, es dializable, termoestable y mantiene su actividad biológica en sus diferentes etapas de purificación.

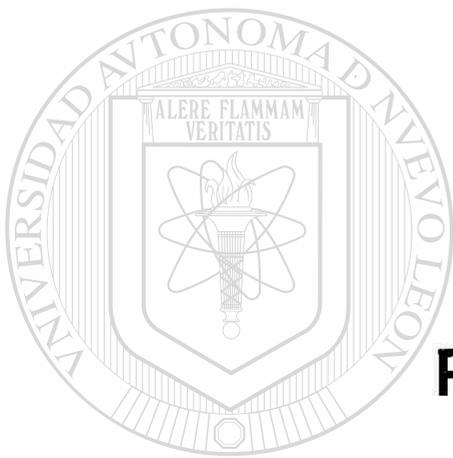


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# PERSPECTIVAS

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Considerando el alto grado de purificación obtenida del FIAML, el siguiente paso será: por una parte, obtener su secuenciación aminoacídica y su clonación, lo que permitirá buscar en los bancos de información su posible relación con otras proteínas. Por otra parte con esta metodología, obtener suficiente cantidad para inducir anticuerpos monoclonales y usarlos para la búsqueda de este factor tanto en otros linfomas como en otro tipo de tumores malignos. Esto último permitirá establecer si se trata de un factor particular del linfoma L5178Y o si resulta común a otros tumores.

También es importante conocer el mecanismo molecular de acción del FIAML para poderlo bloquear.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 1991. Cellular and Molecular Immunology. W B Saunders Company. USA, pp 336,347.
  - Adams DO, Hamilton TA. 1984. The Cell Biology of Macrophage Activation. Ann. Rev. Immunol. 2: 283-318.
  - Alcocer JM, Tamez-Guerra RS and Madrid-Marina V. 1996. Expresion cytikines Th1 and Th2 in limphoma subcutaneous murine. Immunology. En prensa.
  - Badger AM, Cooperband SR, Merluzzi VJ and Glasgow AH. 1977. Immunosuppressive activity of ascites fluid from patients with cancer metastatic peritoneum. Cancer Res. 37: 1220-1227.
  - Bellanti JA. 1984. Inmunología II. 2a. Ed. Interamericana. México, DF, pp 17-22.
  - Bilyk N and Holt PG. 1995. Cytokine modulation of the immunosuppressive phenotype of pulmonary alveolar macrophage populations. Immunol. 86: 231-239.
- 
- Boetcher DA, Leonard EJ. 1974. Abnormal monocyte chemotactic response in cancer patients. J Natl Cancer Inst 52:1091-1097.
  - Bogdan C, Vodovotz Y and Nathan C. 1991. Macrophage Deactivation by Interleukin 10. J. Exp. Med. 174:1549-1557.
  - Burnet FM. 1970. The concept of immunological surveillance. Prog. Exp. Tumor Res. 13:1-139.
  - Cianciolo G, Hunter J, Silva J, Haskill JS y Snyderman R. 1981. Inhibitors of Monocyte Responses to Chemotaxins Are Present in Human Cancerous Effusions and React whith Monoclonal Antibodies to the P 15(E) Structural Protein of Retroviruses. J. Clin. Invest. 68: 831-839.

- Cornelius JG y Normann SJ. 1988. Isolation of a low molecular weight inhibitor of lymphocyte proliferation from tumorous ascites. *J Immunol.* 141:2175-2180.
  - Fauve RM, Hevin B, Jacob H, Gaillard JA y Jacob F. 1974. Antiinflammatory effects of murine malignant cells. *Proc Nat Acad Sci.* 71:4052-4056
  - Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M y O'garra A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147:3815-3822.
  - Fujii M, Takahashi N, Hayashi H. 1987. Purification and characterization of immunosuppressive (IS) substance obtained from ascitic fluids of patients with gastrointestinal cancer. *Clin. Biochem.* 20: 183-189.
  - Fulton AM y Chong YC. 1992. The role of macrophage-derived TNF $\alpha$  in the induction of sublethal tumor cell DNA damage. *Carcinogenesis* 13:77-81.
  - González-Garza MT, Fernández-Quintero P, Arellano-Blanco J y Gomez-Estrada H. 1977. Inducción de la autólisis de linfoblastos malignos. *Arch Invest Med.* 9:33-50.
  - Gordon BL. 1975. Lo esencial de la Inmunología. 2a. Ed. El Manual Moderno, S.A., México pp 1-15.
- 
- Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR y Durack DT. 1988 Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 81:1129-1137.
  - Hao W, McDonald TL, Brunson KW y Joshi SS. 1993. Enhanced immunosuppressive activity associated with metastatic lymphoma cells. *Cancer Research* 53:1921-1928.
  - Hart PH, VittiGF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS y Hamilton JA. 1989. Potencial antiinflamatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:3803-3807.
  - Hartree EF. 1972. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 48.422-427.

- Hausman MS, Brosman S, Fahey JL Snyderman R. 1973. Defective monocyte function in patients with genitourinary carcinoma, Clin Res 22:430-438.
- Hirohashi N and Morrison DC. 1996. Low-Dose Lipopolysaccharide (LPS) Pretreatment of Mouse Macrophages Modulates LPS-Dependent Interleukin-6 Production *In Vitro*. Infection and Immunity 64: 1011-1015.
- Hirte H and Clark DA. 1991. Generation of lymphokine-activated killer cells in human ovarian carcinoma ascitic fluid: identification of transforming growth factor-beta as a suppressive factor. Cancer Immunol. Immunother. 32: 296-302.
- Hibbs JB, Taintor RR y Vavrin Z. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science 235:473-477.
- Imber M, Pizzo SV, Johnson WJ y Adams DO. 1982. Selective diminution of the binding of Mannose by murine macrophages in the later stages of activation. J. Biol. Chem. 257: 5129-5135.
- Iyengar R, Stuehr DJ y Marletta MA. 1987. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:6369-6376.
- Kamo I, Patel Ch, Kateley J y Friedman H. 1975. Immunosuppression induced *in vitro* by mastocytoma tumor cells and cell-free extracts. J. Immunol. 114:1749-1755.
- Kensey JH, Spector BD y Good RA. 1973. Immunodeficiency and cancer. Adv. Cancer Res. 18:211-217.
- Klobusicka M and Kusenda J. 1992. Cytochemical study of activated peritoneal macrophages in normal and tumor-bearing rats. Neoplasma 39: 291-306.
- Klostergaard J, Leroux ME and Hung MCH. 1991. Cellular models of macrophage tumoricidal effector mechanisms *in vitro*. Characterization of

cytolytic responses to tumor necrosis factor and nitric oxide pathways *in vitro*. *J. Immunol.* 147: 2802-2809.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage "T4". *Nature* 227:2478-2483.
  - Landman R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R and Zimmerli W. 1996. Human Monocyte CD14 Is Upregulated by Lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* 64: 1762-1769.
  - Lehn M, Weiser YW, Engelhorn S, Gillis S and Remold HG. 1989. IL-4 inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 143: 3020-3028.
  - Lichtenstein A, Zigelboim J, Dorey F, Brooman Sy Fahey JL. 1980. Comparison of immune derangements in patients with different malignancies. *Cancer* 45:2090-2095.
  - Lowry OH, Rosenbrough NS, Farr AL y Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 183:265-275.
  - Martinet N, Beck G, V, Bernard V, Plenat F, Vaillant P, Vignaud JM y Martinet Y. Mechanisms for the recruitment of macrophages to cancer site. 1992. *Cancer* 70: 854-860.
- 
- Masaki H, Takatsu K, Hamaoka T y Kitagawa M. 1972. Immunosuppressive activity of chromatin fraction derived from nuclei of Ehrlich ascites tumor cells. *Gann* 63:633-635.
  - Mauel J, Pham TV, Kreis B, Corradin-Betz S y Bauer J. 1991. Evaluation of assay procedures measuring macrophage stimulation by immunomodulators *in vitro*. *Develop. Biol. Standard.* 77:71-77.
  - Mc Devitt MT, Todorov TP, Beck AS, Khan HS and Tisdale JM. 1995. Purification and characterization of a lipid-mobilizing factor associated with cachexia-inducing tumors in mice and humans. *Cancer Res.* 55: 1458-1464.
  - Munn DH, McBride M y Cheung NK. 1991. Role of low-affinity Fc receptors in antibody-dependent tumor cell phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. *Cancer Res.* 51:1117-1123.

- Nelson M y Nelson DS. 1990. Inhibition of interleukin-2 production by tumor cell products and by CKS-17, a synthetic retroviral envelope peptide. *Cancer Immunol Immunother* 30:331-341.
- Nimberg , RB, Glasgow AH, Menzoian JO, Constantian MB, Cooperband SR, Mannick JA, Schmid K. 1975. Isolation of an immunosuppressive peptide fraction from serum of cancer patients. *Cancer Res.* 35:1489-1494
- Nong Y, Titus RG, Ribeiro JMC y Remold HG. 1989. Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J. Immunol.* 143:45-49.
- North RJ, Kirstein DP y Tuttle RL. 1976(a). Subversion of host defense mechanisms by murine tumors. I. A circulating factor that suppresses macrophage-mediated resistance to infection. *J. Exp. Med.* 143:559-573.
- North RJ, Kirstein DP y Tuttle RL. 1976(b). Subversion of host defense mechanisms by murine tumors. II. Counter-Influence of Cocomitant Antitumor Immunity. *J. Exp. Med* 143:574-584.
- Nyoun SK, Stuehr DJ y Nathan CF. 1991. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.* 174:761-767.
- Pak CC y Fidler IJ. 1991. Molecular mechanisms for activated macrophage recognition of tumor cells. *Semin. Cancer Biol.* 2:189-195.
- Pike M y Snyderman R. 1976. Depression of macrophage function by a factor produced by neoplasms: a mechanism for abrogation of immune surveillance. *J Immunol.* 117:1243-1249.
- Rhodes J, Bishop M y Benefield J. 1979. Tumor surveillance how tumors may resist macrophage-mediated host defense. *Science* 203:179-189.
- Roitt I, Brostoff J y Male D. 1993. *Immunology.* 3a. Ed. Consultant, Mosby, London, England pp 8.8.
- Saul RL y Archer MC. 1984. Oxidation of ammonia and hydroxylamine to nitrate in the rat and in vitro. *Carcinogenesis (Lond)* 5:77-82.

- Siziopikou KP, Harris JE, Casey L, Nawas Y y Braun DP. 1991. Impaired tumoricidal function of alveolar macrophages from patients with non-small cell lung cancer. *Cancer* 68: 1035-1042.
- Snyderman R, Pike MC, Blaylock BL y Weinstein P. 1976. Effects of neoplasms on inflammation; depression of macrophage accumulation after tumor implantation. *J Immunol.* 116:585-589.
- Srimal S and Nathan C. 1990. Purification of macrophage deactivating factor. *J. Exp. Med.* 171: 1347-1355.
- Spitalny GL. 1980. Suppression of bactericidal activity of macrophages in ascites tumors. *J. Reticuloendothel. Soc.* 28: 223-228.
- Stuehr DJ y Nathan CF. 1989. Nitric Oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169:1543-1555.
- Stuehr DJ. y Marletta MA. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7738-7745.
- Stuehr DJ. y Marletta MA. 1987. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, Lymphokines, or interferon-gamma. *J. Immunol.* 139:518-526.
- Stuehr DJ. y Marletta MA. 1988. Further studies on murine macrophage synthesis of nitrite and nitrate. In Ninth International Symposium on N-Nitroso Compounds: Relevance to Human Cancer. H Bartsch, and I. K. O'Neill, eds. International Agency for Research on Cancer, Lyon. France in press.
- Szuro-Sudol A y Nathan CF. 1982. Suppression of macrophage oxidative metabolism by products of malignant and nonmalignant cells. *J Exp Med.* 156:945-961.
- Szuro-Sudol A, Murray HW, Nathan CF. 1983. Suppression of macrophage antimicrobial activity by a tumor cell product. *J. Immunol.* 131:384-387.

- Tamura K, Shibata Y, Matsuda Y and Ishida N. 1981 Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. *Cancer Res.* 41: 3244-3251.
- Tang ZP. 1991. Observation on the activity of superoxide dismutase and catalase of alveolar macrophage in patients with lung cancer. *Chung-Hua-Chieh-Ho-Ho-Hu-Hsi-Tsa-Chih* 14:213-220.
- Tsunawaki S y Nathan C. 1986. Macrophage deactivation. Altered kinetic properties of superoxide-producing enzyme after exposure to tumor cell-conditioned medium. *J. Exp. Med.* 164:1319-1331.
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A and Nathan C. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- $\beta$ . *Nature* 334: 260-270.
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A and Nathan C. 1989. Comparison of Transforming growth factor- $\beta$  and a macrophage-deactivating polypeptide from tumor cells. *J Immunol.* 142: 3462-3468.
- Van Ravenswaay HH, Kluin PM, Fleuren GJ. 1992. Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. *Lab Invest.* 67:166-174.
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie Q and Nathan C. 1993. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.* 178: 605-613.
- Wagner DA, Young VR y Tannenbaum SR. 1983. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of  $^{13}\text{NH}_3$  into nitrite is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:4518-4528.
- Walker TM, Burger CJ y Elgert KD. 1994. Tumor growth alters T cell and macrophage production of and responsiveness to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Partial Dysregulation through interleukin-10. *Cel. Immunol.* 154:342-357.
- Walker TM, Yurochko AD, Burger CJ y Elgert KD. 1992. Macrophage stimulated by receptor-ligand interactions exhibit differences in cell-cycle

kinetics during tumor growth stimulation at Mac-1 and Mac-3 receptors alters DNA synthesis. *Immunobiology* 185:427-435.

- Wiltrout RH, Brunda MJ and Holden HT. 1982. Variation in selectivity of tumor cell cytotoxicity by murine macrophages, macrophage-like cell lines and NK cells. *Int. J. Cancer*. 30: 335-341.
- Xiaoke Z and Morrison DC. 1993. Lipopolysaccharide-induced Selective Priming Effects on Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Nitric Oxide Production in Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Exp. Med.* 177: 511-516.
- Yamanaka N, Harabuchi Y, Himi T y Katatura A 1988. Immunossuppressive substance in the sera of head and neck cancer patients. *Cancer* 62:1293-1298.
- Yamashita K, Hayashi H, Mure K, Ishikawa M. y Shimizu T. 1986. Serum Immunosuppressive substance in patients with gynecologic malignancies and in pregnant women. *Cancer* 57:69-74.
- Yim CY, Bastian NR, Smith JC, Hibbs JB and Samlowski WE. 1993. Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light-induced murine skin cancers. *Cancer Res.* 53:5507-5516.
- Yurochko AD, Burger CJ y Elgert KD. 1990(a). Tumor modulation of autoreactivity: decreased macrophage and autoreactive T cell interactions. *Cell. Immunol.* 127:105-112.
- Yurochko AD, Burger CJ y Elgert KD. 1990(b). Normal and tumor-bearing host splenic macrophage responses to lipopolysaccharide. *Immunol. Invest.* 19:41-47.
- Zar JH. 1974. "Biostatistical Analysis". Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, pp 228-235.
- Zolla S. 1972. The effect of plasmacytomas on the immune response of mice. *J Immunol* 108:1039-1048.

