

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA-II (DERMATOLOGIA)  
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL MELANOMA B<sub>16</sub> TRASPLANTADO EN SU PORTADOR  
SINGENICO EL RATON C57BL/6J. INMUNOTERAPIA ESPECIFICA  
ACTIVA POLIVALENTE EN DICHO TUMOR.

DIRECTOR : D. ALFREDO ROBLEDO AGUILAR  
CATEDRATICO DE DERMATOLOGIA

EDUARDO LOPEZ BRAN

AÑO 1991



MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO  
INSTITUTO NACIONAL DE LA SALUD  
Hospital Universitario San Carlos  
Ciudad Universitaria  
28040-MADRID

**PROF. Dr. D. ALFREDO ROBLEDO AGUILAR. CATEDRATICO DE DERMATOLOGIA Y VENEREOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA II (DERMATOLOGIA).**

**CERTIFICA :** Que D. **EDUARDO LOPEZ BRAN**, ha realizado su Tesis Doctoral, titulada :  
"ESTUDIO DEL MELANOMA B<sub>16</sub> (LINEAS TUMORALES F<sub>1</sub> y F<sub>10</sub>) TRANSPLANTADO EN SU PORTADOR SINGENICO EL RATON C57BL/6J. INMUNOTERAPIA ESPECIFICA ACTIVA POLIVALENTE EN DICHO TUMOR", bajo mi Dirección.

Y como Director del Departamento de Medicina II (Dermatología), una vez revisada la misma, considero que reúne las condiciones necesarias para ser presentada para su exposición y defensa ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Madrid a veintisiete de Marzo de mil novecientos noventa y uno.

Prof. A. Robledo Aguilar



MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO  
INSTITUTO NACIONAL DE LA SALUD  
Hospital Universitario San Carlos  
Ciudad Universitaria  
28040-MADRID

**PROF. Dr. ALFREDO ROBLEDO AGUILAR. CATEDRATICO DE DERMATOLOGIA  
Y VENEREOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID  
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE DERMATOLOGIA**

**CERTIFICA :** Que la Tesis Doctoral del Licenciado en Medicina y Cirugía, D. **EDUARDO LOPEZ BRAN**, titulada :  
"ESTUDIO DEL MELANOMA B<sub>16</sub> (LINEAS TUMORALES F<sub>1</sub> y F<sub>10</sub>) TRANSPLANTADO EN SU PORTADOR SINGENICO EL RATON C57BL/6J. INMUNOTERAPIA ESPECIFICA ACTIVA POLIVALENTE EN DICHO TUMOR", ha sido realizada bajo mi Dirección y una vez terminada, se encuentra en condiciones de ser presentada para su exposición y defensa ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente en Madrid a veintisiete de Marzo de mil novecientos noventa y uno.

Prof. A. Robledo Aguilar

- I -

I- INDICE GENERAL

<b>I - INDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>II - INDICE DE FIGURAS</b>	<b>XII</b>
<b>III - INDICE DE TABLAS</b>	<b>XVII</b>
<b>IV - DEDICATORIA</b>	<b>XIX</b>
<b>V - AGRADECIMIENTOS</b>	<b>XXI</b>
<b>VI - REVISIONES BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>1</b>
<b>A. REVISION GENERAL</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>2. CAUSAS DE BASE INMUNOLOGICA EN LA APARICION DE TUMORES</b>	<b>4</b>
<b>3. INMUNOBIOLOGIA DEL MELANOMA MALIGNO HUMANO</b>	<b>4</b>
<b>3.1. INTRODUCCION</b>	<b>4</b>
<b>3.2. OBSERVACIONES CLINICO-HISTOLOGICAS</b>	<b>6</b>
<b>3.3. PRUEBAS CUTANEAS IN VIVO CON EXTRACTOS TUMORALES.</b>	<b>8</b>
<b>3.4. REACCIONES IN VITRO POR ANTICUERPOS HUMORALES ANTIMELANOMA.</b>	<b>9</b>

3.5. REACCIONES IN VITRO POR LINFOCITOS CIRCULANTES ANTIMELANOMA.	11
3.5.1. INHIBICION DE LA EMIGRACION LEUCOCITARIA.	11
3.5.2. TRANSFORMACION LINFOBLASTICA POR ANTIGENOS DE MELANOMA.	12
3.5.3. CITOTOXICIDAD DE LOS LEUCOCITOS MONONUCLEARES.	13
3.6. OTRAS OBSERVACIONES	17
3.7. MECANISMOS DE ESCAPE DE LAS CELULAS TUMORALES A LA DESTRUCCION INMUNOLOGICA.	20
3.8. ANTIGENOS TUMORALES ESPECIFICOS DEL MELANOMA.	30
3.9. MECANISMOS INMUNOLOGICOS DE DESTRUCCION TUMORAL.	37
3.9.1. MECANISMOS INMUNES CELULARES DE DESTRUCCION TUMORAL.	38
3.9.2. MECANISMOS INMUNES HUMORALES DE DESTRUCCION TUMORAL.	42

<b>B. REVISION ESPECIFICA.</b>	<b>45</b>
<b>1. INMUNOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO DEL MELANOMA MALIGNO HUMANO.</b>	<b>46</b>
1.1. INMUNOTERAPIA ACTIVA NO ESPECIFICA.	49
1.1.1. INMUNOTERAPIA INTRALESIONAL DEL MELANOMA CON BCG	62
1.1.1.a. TECNICA DE LA INYECCION DE LA BCG.	62
1.1.1.b. RESULTADOS TERAPEUTICOS.	63
1.1.1.c. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL INDICE DE MEJORIA.	65
1.1.1.d. SECUENCIA MORFOLOGICA DE LOS FENOMENOS.	66
1.1.1.e. COMPLICACIONES IMPORTANTES.	67
1.2. INMUNOTERAPIA ACTIVA ESPECIFICA.	70
1.2.1. MODIFICACIONES FISICAS DE LAS CELULAS TUMORALES.	75
1.2.2. ACOPLAMIENTO DE INMUNOGENOS A LAS CELULAS TUMORALES.	76

1.3. INMUNOTERAPIA PASIVA.	80
1.4. INMUNOTERAPIA ADOPTIVA.	83
1.5. INMUNOTERAPIA POR MEDIADORES INMUNOLOGICOS.	87
<b>2. MODELOS CLINICOS DE AUTOSENSIBILIZACION. CUTANEA.</b>	92
2.1. ERUPCIONES SEGUNDAS O IDES.	92
2.1.1. CUADRO CLINICO DE LAS MICROBIDES.	94
2.1.2. LOCALIZACION DE LAS MICROBIDES.	
2.1.3. HISTOPATOLOGIA DE LAS MICROBIDES.	96
2.2. EXPERIENCIAS CLINICAS DE HOPKINS Y BURKY.	97
2.3. EXPERIENCIA DE RÖCKL EN RELACION CON LA PATOGENIA DE LAS MICROBIDES.	100
<b>3. MODELOS EXPERIMENTALES DE AUTOSENSIBILIZACION.</b>	107
3.1. ENDOFTALMITIS FACO-ANAFILACTICA EXPERIMENTAL EN CONEJOS.	107
3.1.1. INTRODUCCION.	107
3.1.2. MATERIAL Y METODOS.	108
3.1.2.a. TOXINAS EN CALDO DE CRISTALINO.	109

3.1.2.b.	FILTRADOS ESTAFILOCO- CICOS TOXICOS Y NO TOXICOS.	112
3.1.2.c.	EXPERIENCIAS EN CONE- JOS.	113
3.1.3.	RESULTADOS.	115
3.1.3.a.	REACCIONES CUTANEAS A LA TOXINA-CALDO DE CRISTALINO.	115
3.1.3.b.	REACCIONES CUTANEAS A EXTRACTOS DE CRISTALI- NO.	116
3.1.3.c.	REACCIONES OCULARES.	118
	* CONEJOS NORMALES.	119
	* CONEJOS INSENSIBLES AL CRISTALINO Y CON FORMACION DE PRECI- PITINAS.	120
	* CONEJOS SENSIBLES AL CRISTALINO Y CON PRECIPITINAS.	121
	* REPORT HISTOPATOLO- GICO DE LOS OJOS.	123
3.1.3.d.	PRECIPITINAS.	124

- VII -

3.1.4. COMENTARIO	132
3.2. REACCIONES CUTANEAS A LA TOXINA-CALDO DE MUSCULO.	133
3.2.1. MATERIAL Y METODOS.	133
3.2.2. RESULTADOS Y COMENTARIO.	134
4. PAPEL DE LOS HAPTENOS Y CARRIERS EN LA ALERGIA RETARDADA.	136
5. ELECCION DE UN MODELO ANIMAL Y TUMORAL EXPERIMENTAL.	148
5.1. INTRODUCCION.	148
5.2. EL RATON C57BL/6J.	149
5.2.1. ORIGEN.	149
5.2.2. CARACTERISTICAS.	150
5.2.3. EVOLUCION PONDERAL.	150
5.2.4. TIEMPO MEDIO DE VIDA.	150
5.2.5. PATOLOGIA ESPONTANEA NO TUMORAL	152
5.2.6. CAMPOS DE UTILIZACION.	152
5.2.6.1. CANCEROLOGIA.	152
* TUMORES ESPONTANEOS E INDUCIDOS.	152
* TUMORES TRANSPLANTABLES.	154
5.3. EL MELANOMA B <sub>16</sub>	155
5.3.1. INTRODUCCION	155
5.3.2. CARACTERISTICAS.	158

<b>VII - TRABAJO EXPERIMENTAL.</b>	159
<b>A. ESTUDIO CLINICO-HISTOLOGICO, EVOLUCION Y ESTUDIO NECROPISCO EN DIFERENTES ETAPAS DEL MELANOMA B<sub>16</sub> (LINEAS TUMORALES F<sub>1</sub> Y F<sub>10</sub> ) INOCULADO EN EL RATON C57BL/6J.</b>	160
<b>1. INTRODUCCION.</b>	161
<b>2. ESTUDIO CLINICO DEL MELANOMA B<sub>16</sub> .</b>	161
<b>2.1. MATERIAL Y METODOS.</b>	161
2.1.1. ANIMALES.	161
2.1.2. TUMORES.	164
2.1.3. CULTIVOS DE CELULAS TUMORALES IN VITRO.	165
2.1.3.a. CRECIMIENTO DEL TUMOR IN VITRO.	165
2.1.3.b. CONGELACION.	166
2.1.3.c. PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES DE CELULAS TUMORALES.	167
2.1.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.	167
2.2. RESULTADOS.	170
2.3. COMENTARIOS.	176

<b>3. ESTUDIO HISTOLOGICO DEL MELANOMA B<sub>16</sub> Y DE SUS METASTASIS EN DIFERENTES ETAPAS.</b>	<b>180</b>
3.1. INTRODUCCION.	180
3.2. PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS EMPLEADOS.	180
3.3. PROCEDIMIENTOS HISTOLOGICOS RUTINARIOS.	181
3.4. ESTUDIO HISTOLOGICO DEL MELANOMA B <sub>16</sub>	181
3.5. ESTUDIO HISTOLOGICO DE LAS METASTASIS DEL MELANOMA B <sub>16</sub> .	186
3.6. COMENTARIO.	187
<b>4. ESTUDIO NECROPSICO DEL RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA B<sub>16</sub> .</b>	<b>193</b>
4.1. INTRODUCCION.	193
4.2. PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS.	193
4.3. RESULTADOS.	194
4.4. COMENTARIO.	205



2.2. OBTENCION DEL PREPARADO PARA LA LA INMUNOTERAPIA.	232
2.2.1. MATERIAL Y METODOS.	232
3. INMUNOTERAPIA ESPECIFICA ACTIVA POLIVALENTE	234
3.1. INTRODUCCION.	234
3.2. MATERIAL Y METODOS.	234
3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.	234
3.4. COMENTARIO.	237
VIII. CONCLUSIONES GENERALES.	239
IX. BIBLIOGRAFIA.	245
X. ABREVIATURAS UTILIZADAS.	263

II - INDICE DE FIGURAS

FIGURA -	I - HIPOTESIS DE RÖCKL SOBRE AUTOSENSIBILIZACION CUTANEA.	106
FIGURA -	II - EVOLUCION PONDERAL DEL RATON C57BL/6J.	151
FIGURA -	III - COMPARACION ENTRE EL RATON Y EL HOMBRE EN CUANTO A LAS DIFERENCIAS ENTRE LA DURACION DEL TUMOR Y EL TIEMPO ENTRE LA INDUCCION Y LA MUERTE POR EL TUMOR.	157
FIGURA -	IV - RATON C57BL/6J DE 5 SEMANAS DE EDAD EN APARENTE BUEN ESTADO DE SALUD ("ADORMILADO" CON ETHER).	162
FIGURA -	V - PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR LOS PARAMETROS CUANTITATIVOS (CRECI- MIENTO Y MORTALIDAD) DEL MELANOMA B <sub>16</sub> /F <sub>1</sub> EN SU PORTADOR SINGENICO : EL RATON C57BL/6J.	168
FIGURA -	VI - IDEM A FIGURA - V - , EN MELANOMAS B <sub>16</sub> /F <sub>10</sub> .	169
FIGURA -	VII - MORTALIDAD ENTRE RATONES C57BL/6J INOCULADOS EL DIA CERO CON, 5 X 10 <sup>4</sup> , 50 X 10 <sup>4</sup> Y 2 X10 <sup>6</sup> CELULAS DE B <sub>16</sub> /F <sub>1</sub> .	171
FIGURA -	VIII - MORTALIDAD ENTRE RATONES C57BL/6J INOCULADOS EL DIA CERO CON 30 X 10 <sup>4</sup> Y 50 X 10 <sup>4</sup> CELULAS DE B <sub>16</sub> /F <sub>10</sub> .	172

- FIGURA - IX - RATON C57BL/6J (♂, 10<sup>6</sup> SEMANAS DE EDAD)  
INOCULADO EL DIA CERO CON 2 X 10<sup>6</sup>  
CELULAS DE MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> .30 DIAS DE  
EVOLUCION. 174
- FIGURA - X - MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> EXTIRPADO DE UN  
RATON C57BL/6J A LOS 30 DIAS DE SER  
INOCULADO CON 2 X 10<sup>6</sup> CELULAS TUMORA-  
LES. 174
- FIGURA - XI - RATON C57BL/6J (♂, 9 SEMANAS DE EDAD)  
INOCULADO EL DIA CERO CON 2 X 10<sup>6</sup>  
CELULAS DE MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>10</sub> . 25 DIAS  
DE EVOLUCION. 177
- FIGURA - XII - MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>10</sub> EXTIRPADO DE UN  
RATON C57BL/6J A LOS 25 DIAS DE SER  
INOCULADO CON 50 X 10<sup>6</sup> CELULAS  
TUMORALES. 177
- FIGURA - XIII - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DE UN  
MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> . 182
- FIGURA - XIV - IDEM A - XIII - DE UN MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> 182
- FIGURA - XV - DETALLE HISTOLOGICO DEL MELANOMA  
B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> . 184

FIGURA -	XVI - IDEM A XIV DEL MELANOMA B <sub>16</sub> /F <sub>10</sub> .	184
FIGURA -	XVII - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DE UN GANGLIO LINFATICO, METASTATIZADO POR MELANOMA B <sub>16</sub> /F <sub>1</sub> .	188
FIGURA -	XVIII - LA FIGURA - XVII - A MAS DETALLE.	188
FIGURA -	XIX - IMAGEN HISTOLOGICA DEL CORAZON DE UN RATON C57BL/6J Y DEL PULMON METASTA- TIZADO POR MELANOMA B <sub>16</sub> /F <sub>1</sub> .	190
FIGURA -	XX - DETALLE DE LA METASTASIS PULMONAR, DE LA FIGURA - XIX - .	190
FIGURA -	XXI - IMAGEN HISTOLOGICA DE UN GANGLIO LIN- FATICO NORMAL, EN UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA B <sub>16</sub> /F <sub>10</sub> .	195
FIGURA -	XXII - LA FIGURA - XXI - A MAS DETALLE.	195
FIGURA -	XXIII - IMNAGEN HISTOLOGICA DEL CORAZON Y PULMON DE UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA B <sub>16</sub> /F <sub>10</sub> .	197
FIGURA -	XXIV - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DEL TIMO, DE UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA B <sub>16</sub> . TOMA NECROPSICA.	199
FIGURA -	XXV - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DEL BAZO DE UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA B <sub>16</sub> . ESTUDIO NECROPSICO.	199

- XVI -

FIGURA - XXVI - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DEL RIÑON DE UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA B <sub>16</sub> . ESTUDIO NECROPSICO.	201
FIGURA - XXVII - IDEM A FIGURA - XXVI - A MAS DETALLE.	201
FIGURA - XXVIII - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DEL HIGADO DE UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA B <sub>16</sub> . TOMA NECROPSICA.	203
FIGURA - XXIX - RATON C57BL/6J, CON DORSO RAPADO, Y CON PLACA RESULTANTE DE LA INOCULACION PREVIA CON ESTAFILOCOCO AUREUS TOXINA +.	214
FIGURA - XXX - IMAGEN HISTOLOGICA DE LA BIOPSIA PRACTICADA EN LA ZONA INOCULADA CON ESTAFILOCOCO AUREUS TOXINA + 7. DIAS DESPUES DE LA INOCULACION.	217
FIGURA - XXXI - IDEN A LA FIGURA- XXX -A MAS DETALLE.	217
FIGURA - XXXII - IDEN A LA FIGURA-XXXI- A MAS DETALLE.	219
FIGURA - XXXIII - IDEN A LA FIGURA - XXX -,PERO 12 DIAS DESPUES DE LA INOCULACION.	219
FIGURA - XXXIV - IMAGEN HISTOLOGICA DE LA BIOPSIA PRACTICADA A UN RATON C57BL/6J, EN EL LUGAR EN EL QUE SE LE HABIA INOCULADO PREVIAMENTE CON CORYNEBACTERIUM PARVUM. 10 DIAS DE EVOLUCION.	230
FIGURA - XXXV - PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INMUNOTERAPIA ACTIVA EN EL MELANOMA B <sub>16</sub> .	235

III - INDICE DE TABLAS

TABLA - I - TIEMPO MEDIO DE VIDA DE LOS RATONES C57BL/6J.	153
TABLA - II - PARAMETROS DE CRECIMIENTO TUMORAL Y MORTALIDAD EN RATONES C57BL/6J INOCULADOS EL DIA 0 CON $2 \times 10^6$ CELULAS DE MELANOMA B <sub>16</sub> .	173
TABLA - III - INMUNOESTIMULANTES NO ESPECIFICOS EMPLEADOS EN INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL.	208
TABLA - IV - USOS DEL CORYNEBACTERIUM PARVUM EN INMUNOTERAPIA EN DISTINTOS MODELOS ANIMALES Y TUMORALES.	224

- XIX -

IV - DEDICATORIA

- XX -

A MIS SOBRINOS CON MUCHO CARIÑO

V - AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento :

En primer lugar, a los PROFESORES ALFREDO ROBLEDO AGUILAR, por su brillante Dirección y decidida colaboración en la realización de este trabajo y PEDRO LORENZO VELAZQUEZ por su constante e inestimable estímulo para que este trabajo viese la luz. Gracias amigos.

En segundo lugar, a ese gran número de personas, con las que de una manera u otra he compartido esta tesis. No quisiera olvidar a ninguna de ellas :

- \* PROF. EVARISTO SANCHEZ YUS. Departamento de Dermatología. Universidad Complutense de Madrid.
- \* DR. FRANCISCO LEYVA Y COBIAN. Servicio de Inmunología. Centro de Especialidades Ramón y Cajal. Madrid.
- \* DRA. REYES FLORES HERRANZ. Departamento de Histología. Universidad Complutense de Madrid.
- \* DRA. CARMEN PUCH. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario San Carlos. Madrid.
- \* DRAS. MARIA LUISA PALAU, SILVIA GONZALEZ CUADRADO, CRISTINA GONZALEZ GOMEZ. Unidad de Microbiología. Hospital Universitario San Carlos. Madrid.

- \* DR. VIDAL VANACLOCHA. Departamento de Histología. Universidad del País Vasco.
- \* SERVICIO DE MEDICINA Y CIRUGIA EXPERIMENTAL. Hospital Universitario San Carlos. Madrid.
- \* PROF. FEDERICO URUBURU. Colección Española de Cultivos Tipo. Departamento de Microbiología. Universidad de Valencia.
- \* DR. TERRY BOWLIN. Senior Research Biologist. Merrel Dow Research Institute. Cincinnati, Ohio. USA.
- \* DRA. EVA-BEATE JORZIG-TINDALL. Information Centre for European Culture Collections. Braunschweig. Alemania.
- \* DR. JULIAN PROCTOR. Jameson Memorial Hospital. New Castle. USA.
- \* DR. RICHARD TUTTLE. Head. Department of Cancer Therapy. Burroughs Wellcome. Research Triangle Park. Rotterdam. Holanda.
- \* DR. ROBERT BOMFORD. Department of Experimental Immunobiology. Wellcome Biotech. Beckenham Kent. Inglaterra.
- \* DR. HIDEAKI SUGAWARA. World Data Center on Microorganisms. Riken. Japón.
- \* DR. FLÜCKIGER. Wbag Resources. Wolf Brandenberger AG. Zurich. Suiza.
- \* DRA. KAREN EMORZ. American Type Culture Collection. Maryland. USA.

- \* DRS. CERISIER Y DE LACHARRIERE. Institut Pasteur. Paris. Francia.
- \* DR. KOCUR. Czechoslovak Collection of Microorganisms. J.E. Purkyne University. Checoslovaquia.
- \* DR. DAREKAR. Institut Universitaire de Microbiologie. Lausanne. Suiza.
- \* DR. FALSEN. Department of clinical Bacteriology. University of Göteborg. Suecia.
- \* COMPAÑEROS DEL DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA y de la ESCUELA UNIVERSITARIA DE ENFERMERIA, FISIOTERAPIA Y PODOLOGIA. Universidad Complutense. Madrid.
- \* CARMINA, MARIA DEL CARMEN GALLEGO, CARMEN CRESPO, ANTONIO BENEIT.

Mi cariño y gratitud para todos ellos que con su apoyo y colaboración, me han permitido llevar a buen puerto esta Tesis.

Por último, este trabajo no hubiese sido posible sin las siguientes ayudas :

- \* Ayuda de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario San Carlos. Madrid.
- \* Ayuda de la Universidad Complutense para estancia en el extranjero.

**VI - REVISIONES BIBLIOGRAFICAS**

**A. REVISION GENERAL**

## 1. INTRODUCCION

El desarrollo y progresión de un tumor implica dos cambios fundamentales :la transformación de las células normales en otras de conducta maligna y el fallo de las defensas del huésped para controlar el desarrollo de estas células. A pesar de los numerosos estudios realizados, no está claro el papel desempeñado por el sistema inmune en el desarrollo de un tumor. Numerosos autores han documentado que algunas respuestas inmunes pueden destruir células tumorales (ALEXANDER, 1972; BEAN, 1981; CASTRO 1978; HERBERMAN 1980).

Por otro lado, sabemos que otras reacciones inmunes - específicas o no - pueden favorecer el crecimiento y diseminación de los tumores, por la producción por parte del huésped y/o del tumor de factores inmunosupresores.

La ignorancia existente todavía sobre las complejas interacciones de todos estos elementos se traduce en los escasos resultados obtenidos con los diversos procedimientos empleados en inmunoterapia. Sin embargo, a pesar de las lagunas todavía existentes está demostrado que el deterioro

de las defensas inmunológicas, favorece el desarrollo de ciertos tumores (LEYVA, 1983).

## 2. CAUSAS DE BASE INMUNOLOGICA EN LA APARICION DE TUMORES

Las causas fundamentales de tipo inmune relacionadas con la aparición de tumores son : desórdenes de la inmunidad, papel de virus oncogénicos, oncogenicidad de inmunosupresores y agentes quimioterapéuticos, la utilización de otros tratamientos potencialmente oncogénicos y las variaciones individuales en la susceptibilidad al cáncer ( CASTRO, 1978; citado anteriormente; LAMOUREUX & al, 1976).

## 3. INMUNOBIOLOGIA DEL MELANOMA MALIGNO HUMANO

### 3.1. INTRODUCCION

Desde hace ya bastantes años existe un gran interés en el estudio de la inmunobiología del cáncer porque se espera que una manipulación apropiada del sistema inmune pueda permitir, a la persona, librarse de las células malignas (BYSTRIN, 1980).

### 3.2. OBSERVACIONES CLINICO-HISTOLOGICAS.

Un gran número de observaciones, indican que el crecimiento del melanoma no solamente depende de las propiedades intrínsecas del tumor sino que también está profundamente influenciado por los factores del huésped.

Estas observaciones han sido recientemente revisadas (SOBER 1976). De ellas, la más sorprendente es la regresión espontánea del melanoma diseminado. Mientras que éste es un hecho raro que ocurre en menos del 0,5% de todos los melanomas, parece ser mucho más común en el melanoma que en otros cánceres (EVERSON, 1966; BODENHAN, 1968).

Es mucho más frecuente la observación de regresiones parciales de melanomas primarios, lo que se comprueba histopatológicamente en aproximadamente el 15% de los mismos.

Clinicamente estas regresiones localizadas se evidencian por áreas de despigmentación dentro del tumor.

También sugieren la existencia de factores del huésped que pueden contener el crecimiento tumoral, los períodos de latencia prolongada, que pueden llegar en algunos casos hasta los 20 años, entre la aparición de la lesión primaria y las metástasis y entre la extirpación quirúrgica y las recidivas.

La frecuente aparición de despigmentación dentro y alrededor de melanomas primarios y la despigmentación espontánea y completa regresión de nevus intradérmicos pigmentarios benignos, indican que los factores del huésped pueden selectivamente destruir los melanocitos y posiblemente las células malignas pigmentarias.

Algunos autores (SUMMER, 1960; TEIMONSION, 1963) han observado como, a veces, se producen estas regresiones cuando los pacientes en estadios avanzados de melanoma reciben transfusiones sanguíneas de otros pacientes que también habían tenido regresiones espontáneas de este mismo tumor.

BODURTH & MCGOVERN (BODURTH, 1975 & MCGOVERN, 1975) estudian histopatológicamente tumores en regresión espontánea y demuestran : la

Se piensa que la capacidad de reconocimiento del sistema inmune pueda ser utilizada para detectar y destruir las células cancerosas sin dañar las células normales del cuerpo. El melanoma maligno provee un buen ejemplo para ilustrar, tanto las razones para creer en el potencial inmunogénico del cuerpo contra el cáncer, como en la dificultad para manipular esa capacidad.

Este tumor ha sido estudiado con gran amplitud desde el punto de vista inmunológico y una gran cantidad de ensayos inmunoterápicos han sido realizados en el mismo.

Por los trabajos de MORTON Y HELLSTROM (MORTON, 1968; HELLSTROM, 1969), se conoce que la mayoría de los tumores animales y humanos poseen antígenos de transplante en su superficie específicos de tumores, que son capaces de inducir una respuesta inmunológica en sus huéspedes.

Hoy no cabe ninguna duda de que el melanoma maligno es un tumor en el que los mecanismos de defensa del huésped desempeñan un papel importante, ya que se han visto diversas manifestaciones, tanto de tipo clínico como histológico, que apoyan estos supuestos.

presencia de infiltrados linfo-histiocitarios que rodean al tumor y que penetran en él en forma de bandas, macrófagos cargados de melanina, células malignas degeneradas, edema, proliferación vascular y fibrosis; todo lo cual sugiere un mecanismo de inmunidad celular como responsable de las regresiones espontáneas.

Todas estas observaciones nos confieren esperanza de que si podemos conocer como estos factores del huésped afectan el crecimiento tumoral, podría ser posible influenciarlos para aumentar la resistencia al cáncer.

Durante estos últimos 20 años, un gran número de observaciones sugieren que los factores del huésped responsables del control del crecimiento tumoral están, por lo menos en parte, basados en mecanismos inmunes.

### **3.3. PRUEBAS CUTANEAS IN VIVO CON EXTRACTOS TUMORALES**

Empleando extractos de tumor no purificados, diversos autores (STEWART, 1969; FASS 1970; BLUMING 1972) obtuvieron respuestas positivas en gran número de pacientes con melanoma, pero

mantuvieron discrepancias en cuanto a su significación pronóstica. HOLLINGSHEAD empleando extractos purificados por medio de antígenos de membranas celulares de melanomas consiguió reacciones en la mayoría de los pacientes con melanoma incipiente (17/22) y en 7 de 19 con melanoma diseminado (HOLLINGSHEAD, 1974). ARIEL ha podido obtener por cromatografía un antígeno que da reacciones positivas en el propio sujeto con melanoma y no en personas normales o afectas con otro tipo de tumor (ARIEL, 1975).

#### 3.4 REACCIONES IN VITRO POR ANTICUERPOS HUMORALES ANTIMELANOMA

MORTON comprobó por inmunofluorescencia, la existencia en los sueros de pacientes con melanoma maligno, de anticuerpos que reaccionan con antígenos asociados con la membrana de células tumorales autólogas y homólogas.

También demostró la presencia de un antígeno intracitoplásmico. Ambos eran comunes para todos los melanomas y la incidencia de anticuerpos en pacientes con melanoma localizado fue mayor que la de los pacientes con enfermedad avanzada (MORTON, 1968 citado anteriormente).

LEWIS, & al demostraron la presencia de anticuerpos citotóxicos circulantes contra el melanoma maligno humano en el 35% de los pacientes.

El anticuerpo era específico para el propio tumor y contra la membrana celular. Este anticuerpo iba desapareciendo conforme el tumor se diseminaba (LEWIS & al, 1962). NAIRN también encontró anticuerpos citotóxicos contra antígenos de membrana, de especificidad individual (NAIRN, 1972). Por el contrario, en sus pacientes no pudo correlacionar su presencia con el estadio clínico.

Habría pues según estos autores dos tipos de anticuerpos : los orientados contra los antígenos de la membrana celular que son específicos del individuo, y componentes del citoplasma que son comunes con otros melanomas. Otros autores niegan, sin embargo, que ninguno de ellos tenga especificidad individual (MORTON, 1968; citado anteriormente). Incluso WOOD & BARTH encuentran, en sueros de pacientes con otros tumores no melánicos y en sujetos normales, anticuerpos contra antígenos intracitoplasmáticos de células del melanoma, aunque en menor cantidad que en el suero de pacientes con melanoma (WOOD & BARTH, 1974).

LEWIS & al , sugieren que un anti-anticuerpo de la clase IgG sería el responsable de la pérdida de anticuerpos detectables contra las células del melanoma, en pacientes con enfermedad avanzada (LEWIS & al, 1971). GUPTA & MORTON creen que esta pérdida de anticuerpos antimelanoma no es debida a una pérdida de antigenicidad del tumor, sino a la fijación de los mismos en los antígenos superficiales de las células tumorales (GUPTA & MORTON, 1975)

### **3.5. REACCIONES IN VITRO POR LINFOCITOS CIRCULANTES** **ANTIMELANOMA**

#### **3.5.1. INHIBICION DE LA EMIGRACION LEUCOCITARIA** **(MIF)**

COCHRAN & al obtuvieron una inhibición positiva en el 65% de los pacientes con melanoma localizado y en 7 de 15 pacientes con metástasis ganglionares regionales y en ningún paciente con metástasis generalizadas. Sólo en 1 de 15 controles con tumores no melánicos se obtuvo un resultado positivo (COCHRAN & al. 1972, 1973).

SEGAL & al obtuvieron resultados positivos en 2 de 4 pacientes con melanoma generalizado (SEGAL & al, 1972). FALK & al, obtuvieron resultados similares (FALK & al, 1973).

### **3.5.2. TRANSFORMACION LINFOBLASTICA POR ANTIGENOS DE MELANOMA**

NAGEL & al, relatan el caso de dos hermanos homocigóticos con melanoma. A los cuatro años de extirpación del tumor uno de los hermanos tenía una recidiva y el otro estaba sano. Los linfocitos del hermano sano dieron una respuesta positiva blastogénica frente a los extractos del melanoma del otro (NAGEL & al, 1970).

MAVLIGIT & GUTTERMAN estudiaron esta prueba en 29 pacientes con tumores de los cuales once eran melanomas. Los pacientes con enfermedad localizada tendieron a exhibir una respuesta blastogéna más vigorosa frente a sus propias células tumorales que los

pacientes con enfermedad diseminada, a pesar de que la respuesta a la fitohemaglutinina fue idéntica.

Los pacientes con enfermedad localizada y reacción positiva vivieron más tiempo que los pacientes con enfermedad localizada y reacción negativa. Los pacientes con enfermedad diseminada que reaccionaron positivamente vivieron tanto como los últimos. Los pacientes con enfermedad diseminada y reacción negativa fueron los que menos vivieron (MAVLIGIT & GUTTERMAN, 1974).

Estos mismos autores, utilizando extractos tumorales demostraron la falta de correlación entre las pruebas cutáneas y la estimulación linfocítica, dando una idea de la complejidad de la reacción mediada por células frente a los antígenos tumorales (MAVLIGIT & GUTTERMAN, 1973).

Estos mismos autores demostraron que tiende a existir una relación inversa entre la reactividad de los linfocitos sanguíneos y los linfocitos de los ganglios, con estas técnicas (MAVLIGIT & GUTTERMAN, 1974).

Esto podría tener relación con la energía de las células linfoides que infiltran el tumor, tal como sugiere NAIRN. (NAIRN, 1972, citado anteriormente).

AVIS & al han descrito antígenos fetales en las células del melanoma (AVIS & al, 1973) y FOSSATI & al han demostrado en los pacientes con melanoma, sensibilización frente a estos antígenos embrionarios. No se sabe si los antígenos fetales bloquean o no la inmunidad tumoral efectiva (FOSSATI & al, 1973).

### 3.5.3. CITOTOXICIDAD DE LOS LEUCOCITOS

#### MONONUCLEARES.

Los HELLSTROM fueron los primeros que demostraron que los linfocitos de la mayoría de los pacientes con melanoma matan a las células del tumor (HELLSTROM, 1971).

Posteriormente FOSSATI, DE VRIES, NAIRN Y HEPPNER confirmaron este hecho. En general los pacientes con enfermedad localizada tienden a tener más capacidad citotóxica que los que la tienen diseminada, aunque

esta reactividad puede sufrir grandes fluctuaciones. Los HELLSTROM sugerían la existencia de un antígeno común a todos los melanomas, pero CURRIE comprobó antígenos específicos de cada uno de ellos. Este autor apenas encontró linfocitos citotóxicos específicos en sus microensayos con una técnica diferente de la usada por los HELLSTROM, y sin ninguna relación con el estado clínico (CURRIE, 1971).

A esta misma conclusión llegó NAIRN, en sus experiencias, aunque el número de pacientes con linfocitos citotóxicos era mayor (16 entre 46 pacientes) usando un método descrito anteriormente por LEWIS. (LEWIS, 1974).

Los HELLSTROM Y NAIRN demostraron también que el suero de los pacientes con melanoma de crecimiento progresivo presenta factores que bloquean la citotoxicidad. (HELLSTROM, 1971 & NAIRN, 1972 citados anteriormente).

En un principio, los factores bloqueadores se atribuyeron a anticuerpos bloqueantes, pero SJÖGREM demostró que estos factores bloqueantes son complejos antígeno-anticuerpo susceptibles de eliminarse de la superficie de las células tumorales (SJÖGREM 1971, 1972).

CURRIE arrojó más luz sobre este tema mediante experiencias de lavado de linfocitos. Un lavado intenso de estos, en sujetos con melanoma, aumenta su capacidad citotóxica. Al volver a incubarlos con suero del paciente se inhibe su citotoxicidad lo cual sugiere que los antígenos tumorales circulantes se fijan sobre ellos (CURRIE, 1972)

Hoy se cree, como dice BALDWIN, que la citotoxicidad celular linfocitaria se puede frustrar a dos niveles, bien a nivel de la célula tumoral en donde se fijan los anti-cuerpos o complejos antígeno-anticuerpo o a nivel de la célula efectora linfocitaria en donde se fijan

los antígenos tumorales solubles y hasta los complejos antígeno-anticuerpo. Los HELLSTROM demostraron también como los sueros de sujetos sanos e incluso de pacientes libres de tumor tienen efectos desbloqueadores.

La aparente acción citotóxica inespecífica de los linfocitos normales encontrada en ciertos ensayos, la importancia crítica del método para preparar las células efectoras y también la importancia de la fuente de células atacadas, hacen que sea difícil interpretar los datos de citotoxicidad con miras a valorar la inmunoterapia.

### 3.6. OTRAS OBSERVACIONES

Tanto el melanoma humano como el de ratones tienen antígenos característicos que son cualitativa y cuantitativamente diferentes de los expresados por las células normales adultas.

Ya hemos comprobado como en los individuos con melanoma se producen respuestas inmunitarias a estos antígenos tanto de tipo humoral como celular. Tales respuestas, como veremos más tarde, pueden ser también inducidas o aumentadas por una inmunización activa contra las células tumorales o sus extractos.

Algunos investigadores creen que hay una correlación entre la presencia o magnitud de la respuesta inmune al melanoma y la extensión del tumor, aunque esto no es aceptado universalmente. Sin embargo, parece haber una correlación positiva entre la densidad del infiltrado linfocitario alrededor de las lesiones cutáneas del melanoma y el pronóstico.

Conforme el tumor penetra más profundamente en el dermis y empeora el pronóstico, el número de células linfoides alrededor del tumor disminuyen. Una evidencia más directa de que los factores inmunes pueden ser útiles es que tanto los anticuerpos antitumorales como los linfocitos específicamente sensibilizados pueden matar a las células tumorales in vitro.

Pero la evidencia más convincente de que los mecanismos inmunes pueden influenciar el crecimiento tumoral es que la resistencia de los ratones al melanoma puede ser aumentada por una inmunización activa de los animales con células tumorales o antígenos del melanoma purificados (BYSTRYN, BART, LIVINGSTON & al, 1974; BYSTRYN, 1978).

Esta inmunidad es específica. El hecho de que no pueda ser inducida por células tumorales no relacionadas y que no sea efectiva frente a otro tipo de tumores indica que lo más probable es que esté mediada por mecanismos inmunes.

Todas estas observaciones sugieren que los factores inmunes juegan un papel importante en la resistencia a los melanomas y que con manipulaciones apropiadas del sistema inmune puede aumentarse la resistencia al cáncer. Podría ser que el cáncer fuese el resultado de un mal funcionamiento del sistema inmune que permite a las células tumorales escapar a su destrucción.

### 3.7. MECANISMOS DE ESCAPE DE LAS CELULAS TUMORALES A LA DESTRUCCION INMUNOLOGICA

Se creía inicialmente que los tumores escapaban a la destrucción inmunológica a causa de que el sistema inmunológico era defectuoso, tal como ocurre en los pacientes con inmunodeficiencias congénitas o en los que reciben drogas inmunosupresoras o en los sujetos de edad avanzada.

Sin embargo, se sabe hoy que el cáncer generalmente se desarrolla en individuos que tienen un sistema inmunológico intacto por lo que se han buscado otra serie de explicaciones : aquellas que se basan en la idea de la existencia de respuestas inapropiadas del sistema inmunológico y las que se basan en que las propiedades de las células tumorales aumentan su resistencia a la destrucción inmunológica.

Una respuesta inapropiada del sistema inmune es aquella que favorece y no retrasa el crecimiento tumoral.

¿Cómo puede ocurrir esto?. Los anticuerpos circulantes se cree que son capaces de destruir a las células tumorales por medio de dos mecanismos . Algunos anticuerpos , particularmente del tipo IGM, que fijan el complemento, pueden ligarse a las células tumorales y destruirlas a través de la activación de aquel.

Alternativamente otros anticuerpos pueden ligarse a las células linfoides a través de su porción, Fc. Tales células linfoides unidas al anticuerpo pueden ahora reaccionar con las células tumorales a través de la terminación Fab que reconoce al antígeno y destruirlas.

Sin embargo, los anticuerpos circulantes pueden impedir la destrucción celular tumoral. Este fenómeno ha sido observado en cultivos celulares y se cree que se produce por la existencia de anticuerpos que se unen a las células tumorales pero no las destruyen.

Esto puede ocurrir bien porque los anticuerpos son de una clase que fija pobremente el complemento IGG o porque los anticuerpos están

presentes en insuficiente cantidad sobre la célula tumoral y el complemento no se fija. En ambos casos, los antígenos sobre las células tumorales están cubiertos por anticuerpos que previenen el reconocimiento de aquellos por otros mecanismos inmunes como pueden ser la células linfoides, e impiden su destrucción.

Las células linfoides tienen también un efecto bifásico sobre el crecimiento tumoral. Por una parte los linfocitos T pueden destruir las células tumorales por contacto directo (CEROTTINI & BRUNNER, 1974) o por la liberación de mediadores químicos solubles llamados linfoquinas (LANDOLF , HERBERMANN, HOLDEN, 1977).

De hecho, la inmunidad por células T se cree que es el principal mecanismo efector para producir la inhibición inmune del crecimiento tumoral (BURNET, 1970). Sin embargo la habilidad de las células T para destruir las células tumorales está bajo un control regulatorio complejo.

La estimulación antigénica conduce a la activación de varios subtipos de células T. Un subtipo, las células T colaboradoras, facilita el desarrollo de respuestas inmunitarias humorales y celulares. La estimulación de este subtipo puede aumentar la resistencia inmune al cáncer. Por el contrario, la estimulación de otros subtipos de células T, llamadas células T supresoras puede inhibir tanto la inmunidad humoral como la celular, con lo cual el tumor se evade del control del sistema inmune (BRODER & WALDMANN, 1978).

En modelos experimentales se ha demostrado que células T supresoras aparecen inmediatamente en el portador del tumor en respuesta al antígeno tumoral (GREENE, PERRY, BROMBERG, 1981). Trabajos experimentales sobre los mecanismos de supresión de la respuesta celular en portadores de tumores (FERNANDEZ CRUZ, GILMAN, FELDMAN, 1982) mostraron que el crecimiento de un tumor se acompaña de una deplección en sangre periférica y en órganos linfoides de la subpoblación de células T colaboradoras con un incremento de la subpoblación de T supresoras.

Esta alteración incapacita al receptor del tumor para generar células T citotóxicas y para que las células T colaboradoras segreguen linfoquinas solubles con función colaboradora, acentuando de esta forma el estado de inmunosupresión del huésped. A esta inmunosupresión específica mediada por células T que se produce precozmente tras la aparición del tumor, se suma en los estadios avanzados del crecimiento tumoral una inmunosupresión de tipo generalizado, producida por la liberación por el tumor de factores supresores tales como metabolitos del ácido araquidónico, prostaglandina E y posiblemente otras sustancias peptídicas, que tienen la capacidad de inhibir respuestas inmunes de tipo humoral y celular (PLESCIA, SMITH, GRINWICK, 1975); (BERENDT, NORTH, 1980)

El resultado final puede ser una supresión de la inmunidad antitumoral y un aumento en el crecimiento tumoral.

Posiblemente la forma en que los antígenos tumorales son procesados por las células accesorias (macrófagos y células dendríticas) y presentados a las células T colaboradoras, es

fundamental para el desarrollo de una respuesta de inmunidad celular frente al tumor. Una inadecuada presentación del antígeno tumoral a la célula colaboradora produciría una deficiente estimulación y activación de dichas células, con una deficiente producción por el macrófago de IL1, con el consiguiente déficit en cascada de producción de IL2, interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) etc. Los macrófagos obtenidos de portadores de tumores presentan una marcada inhibición funcional in vitro e in vivo y necesitan ser reactivados con IFN- $\gamma$  para que recuperen la función tumoricida (FERNANDEZ CRUZ, ULICH, SCHREIBER, 1985).

Otro mecanismo de escape del tumor al sistema inmune sería a través de una reacción inmune anti-idiotípica frente a los linfocitos T específicos efectores, que conduciría a una disminución de la inmunidad específica anti-tumor. Esta inmunidad anti-idiotípica probablemente debida a la estimulación antigénica crónica que implica el proceso lento del crecimiento tumoral, parece correlacionarse con el grado de inmunosupresión y con la progresión metastásica (FLOOD, KRIPKE, ROWLEY, SCHREIBER, 1980).

La ausencia selectiva de moléculas de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la célula tumoral, se ha asociado en algunos modelos experimentales a un aumento del crecimiento tumoral. Las células T citotóxicas únicamente reconocen al antígeno cuanto está presentado en la superficie de la célula diana en asociación con moléculas de clase I, codificadas por genes del MHC (MARRACK, KAPPLER, 1986).

Estudios recientes en tumores experimentales y humanos sugieren que cambios en la expresión de antígenos del MHC en la membrana del tumor pueden jugar un papel importante en las interacciones huésped-tumor (FESTENSTEIN, GARRIDO, 1986).

Por otro lado parece hoy evidente que las células tumorales tienen ciertas propiedades que facilitan su habilidad para resistir la destrucción inmune. Dos mecanismos que han recibido recientemente alguna atención, son : la "modulación antigénica" y la "eliminación rápida antigénica". El primero de ellos es un proceso que conduce a cambios en el tipo de

antígenos expresados por las células tumorales. Acabamos de indicar que la expresión de moléculas de la clase I es baja en los distintos clones derivados de un tumor primitivo.

Pero posiblemente, existe también en las variantes o subpoblaciones derivadas de un tumor primitivo una deficiente o alterada expresión de los antígenos asociados al tumor (TSA)

En tumores humanos se ha demostrado heterogeneidad en la expresión de dichos antígenos (NATALI, BIGOTTI, CAVALIERE, LIAO, TANIGUCHI, MATSUI, FERRONE, 1985)

Como consecuencia de ellos las células tumorales pueden desarrollar antígenos contra los cuales el huésped no puede montar una respuesta inmune o incluso pueden parar su expresión antigénica enteramente. En cualquier caso, las células tumorales no pueden ser reconocidas como extrañas y pueden crecer libremente, escapar de las defensas inmunes del huésped y resistir a la inmunoterapia.

Así mismo, el sistema inmune puede ayudar a este proceso destruyendo a las células que expresan antígenos tumorales fuertes lo cual conduce a la selección de clones de células con deficiencia antigénica.

Esto parece que ocurre en el melanoma. El Dr. CLARK ha notificado que el cambio en el desarrollo del melanoma primitivo desde la fase de crecimiento radial a la fase de crecimiento en profundidad se asocia con la aparición de nuevas poblaciones de células melanoma que son morfológicamente diferentes de las células preexistentes.

A menudo hay muchos menos infiltrado linfocitario alrededor de las nuevas células, lo cual sugiere que son menos antigénicas y no son tan fácilmente reconocidas como extrañas por el huésped. Las metástasis no resultarían, pues, de las células que sobreviven al azar del tumor primario y que serían liberadas a los linfáticos y vasos sanguíneos, sino que constituyen una subpoblación especializada de células altamente seleccionadas a través de los estadios del crecimiento tumoral y con propiedades específicas para completar cada estadio del proceso metastásico.

Actualmente, se tiene evidencia de que las neoplasias humanas están constituidas por subpoblaciones celulares heterogéneas en cuanto : a su inmunogenicidad, propiedades antigénicas, capacidad metastática, receptores hormonales, características metabólicas, sensibilidad a las radiaciones y susceptibilidad a drogas citotóxicas.

Otro proceso que puede permitir a los tumores escapar de la destrucción inmune es su habilidad para "desprenderse" rápidamente de sus macromoléculas de superficie, incluyendo los antígenos tumorales. BYSTRYN ha demostrado que las células melanoma humanas en cultivo pueden eliminar en un tiempo de 3 horas, aproximadamente el 50% de sus antígenos tumorales de superficie (BYSTRYN, SMALLEY, 1979).

Esta rápida eliminación de antígenos tumorales lleva a su acumulación en los líquidos corporales de animales y humanos y allí pueden actuar como factores "bloqueantes" que pueden prevenir que las células inmunes y los anticuerpos maten a las células tumorales. Esto ocurre porque reaccionan con los anticuerpos o las células, antes de que lleguen al tumor.

### 3.8. ANTIGENOS TUMORALES ESPECIFICOS DEL MELANOMA

El credo fundamental de la inmunología tumoral ha sido el de que las células cancerosas se distinguen de las normales por la presencia de antígenos distintos en su superficie y estos antígenos son el blanco del sistema inmune. Este supuesto se basa en los experimentos de transplantes de tumores, aunque se han descrito tumores que parecen no ser inmunogénicos, lo cual cuestiona el hecho de si la inmunovigilancia tumoral puede ser un principio general.

A pesar de la enorme literatura que trata la cuestión de los antígenos superficiales específicos del tumor, la existencia de tales antígenos debe ser considerada como una especulación. La mayoría de nuestros conocimientos sobre los antígenos de superficie de los cánceres humanos se derivan de experiencias in vitro usando suero heteroinmune o alogénico y células linfoides.

Un problema crítico en la interpretación de estudios utilizando suero y células linfoides de un individuo y células tumorales de otro es la frecuente participación de aloantígenos en las reacciones entre ellos, lo cual no ha aportado la evidencia que permita la distinción entre reacciones específicas contra el tumor y reacciones dirigidas contra otro tipo de antígenos. HOUGHTON & al valiéndose de técnicas serológicas de tipaje autólogo han tratado de demostrar que los cambios en la antigenicidad de la superficie celular son una consecuencia invariable de la transición al estado maligno, tanto conduzcan o no a su rechazo inmunológico y las han aplicado a varios tipos de tumores, entre ellos al melanoma. (HOUGHTON, OCTTGEN 1981).

En resumen, los aspectos fundamentales de su investigación son los siguientes : los autores emplearon cultivos de células tumorales, suero y células tumorales del mismo individuo, técnicas de absorción y varias técnicas serológicas en cada caso.

Estudiaron 65 melanomas recidivantes o metastásicos y fibroblastos de los mismos individuos.

En todos ellos usaron cuatro técnicas serológicas y la unión del anticuerpo con el antígeno de superficie se hizo visible por medio de un indicador (hematíes). Dichos anticuerpos eran de la clase IGM e IGG, fijadores o no de complemento. No se detectaron anticuerpos contra antígenos de superficie de fibroblastos autólogos aunque el mismo suero los tuviese contra los antígenos tumorales autólogos.

Los sueros positivos fueron absorbidos por gran cantidad de células autólogas, alogénicas y xenogénicas para determinar la especificidad de la reacción contra las células melánicas autólogas.

Como resultado de la aplicación de estas técnicas se encontraron los siguientes antígenos tumorales : Antígenos de la clase 1, propios del melanoma autólogo. De la clase 2, compartidos sólo por otros melanomas. De la clase 3, compartidos por células normales o patológicas, melánicas o no. Los antígenos de la clase 1 y 2 pueden ser considerados antígenos propios del melanoma capaces de

producir una respuesta inmunitaria en el huésped(De 21 pacientes 3 fueron de la clase 1, 2 de la clase 2, y 17 de la clase 3).

El suero de una gran proporción de individuos normales reacciona contra las células del melanoma ¿Por qué?. Otra cosa sorprendente es que sólo en 5 de 21 casos de melanoma se encontraron antígenos específicos del melanoma ¿falta de antígenos verdadera?, ¿falta de sensibilidad del método?, ¿existencia sólo de inmunidad celular?, ¿podría el antígeno estar ligado ya con el anticuerpo?, ¿podría el anticuerpo estar ligado con un anti-anticuerpo?.

Por las experiencias en humanos se puede decir que la reactividad inmunológica clase 1 sufre profundos cambios en la evolución de la enfermedad, en este caso bajando después de las intervenciones quirúrgicas. En uno de los pacientes con antígenos clase 1 se pudo deducir que este antígeno era una glicoproteína. En un paciente con antígenos clase 1 y 2, después de la vacunación autóloga se desarrolló reactividad clase 2.

En otro con sólo antígenos clase 3, la vacunación aumentó este mismo tipo de anticuerpos.

El significado y la utilidad clínica e investigadora de este trabajo no está claro, por lo siguiente :

- a) La mayoría de los antígenos encontrados eran de la clase 3 que se encuentran también en otros tumores y células normales.
- b) Los de la clase 2 se encuentran también en el 100% de los astrocitomas.
- c) Diferentes lesiones de un mismo melanoma expresan un fenotipo antigénico diferente, como si cada una derivase de un clono celular diferente.
- d) Las características de los AAM dependen de factores técnicos. Así, los antígenos de superficie obtenidos de células intactas tienen un peso molecular mayor que los obtenidos de proteínas "liberadas" o células desnaturalizadas. Estas diferencias pueden afectar a su especificidad serológica.

e) Posiblemente la similitud estructural de los antígenos del melanoma con los antígenos no melanomatosos puede impedir la identificación de aquellos.

f) Posiblemente la baja inmunogenicidad puede ser responsable de la dificultad en aislar un antígeno específico del melanoma.

La existencia de antígenos asociados al tumor, localizados por un lado en la superficie celular y por otro lado en el interior de la célula ha podido ser comprobada indirectamente con un gran número de test inmunológicos, tanto in vitro como in vivo y ya hemos hecho mención de ello anteriormente.

Parece deducirse que sólo los antígenos asociados a las membranas celulares pueden desempeñar un papel determinante en una respuesta inmune importante clínicamente (KOKOSCHKA, 1979).

En la actualidad hay muchos equipos de investigadores empeñados en lograr aislar los

antígenos tumorales específicos del melanoma. Con ayuda de los más diversos métodos de preparación enzimáticos y bioquímicos han podido detectarse principalmente determinantes antigénicos ligados a la membrana de las células melanoma.

Investigaciones personales de KOKOSCHKA para la caracterización de antígenos tumorales asociados a la membrana lograron aislar una banda albuminoide específica en la zona prealbuminar que puede ser considerada como un componente antigénico tumorespecífico (KOKOSCHKA, 1979).

Ya más modernamente la tecnología del hibridoma aplicada al análisis de los componentes superficiales de las células malignas ha permitido producir anticuerpos monoclonales contra un número de antígenos que, aunque no son absolutamente específicos del tumor, si se expresan a niveles más altos en tejidos malignos que en los normales (BALDWIN, BYERS, 1985).

En este sentido la técnica de los anticuerpos monoclonales ha identificado una gran variedad

de antígenos expresados por las células del melanoma que no pueden ser detectados en los melanocitos normales (NATALI, AGUZZI, VEGLIA, IMAI, BURLAGE, GIACOMINI, FERRONE, 1983), aunque tienen que ser aclarados todavía la estructura detallada y las funciones biológicas de la mayoría de estos antígenos.

Recientemente KANTOR & al han investigado las características de cuatro antígenos asociados a melanomas que difieren en su distribución celular y tisular así como en su estructura (KANTOR, ALBINO, FERRONE, 1986).

### **3.9. MECANISMOS INMUNOLOGICOS DE DESTRUCCION TUMORAL** **(GOMEZ DE LA CONCHA & al, 1987).**

La demostración en la década de los 50 de que tumores murinos eran capaces de ser inmunogénicos para el propio huésped (FOLEY, 1953), dió un gran impulso al estudio del papel de este sistema en el desarrollo de los tumores y sentó las bases de la teoría de la vigilancia inmunológica de BURNET (BURNET, 1970).

Hoy sabemos que la respuesta inmune frente a cualquier antígeno es muy compleja, participando diversos tipos de células que interaccionan entre sí y dan lugar a mecanismos efectores, mecanismos reguladores y en el caso

de células tumorales a otros mecanismos que dependen sobre todo de las características presentes en la superficie de las células neoplásicas.

Hoy se acepta que en la respuesta inmunológica frente a neoplasias participan mecanismos humorales, mecanismos celulares y complejos sistemas de regulación, además de mecanismos citotóxicos no antígeno-específicos.

### **3.9.1. MECANISMOS CELULARES DE DESTRUCCION TUMORAL**

La teoría de la vigilancia inmunológica consideraba a los linfocitos T responsables de la destrucción de las células neoplásicas que pudieran aparecer en el organismo. Hoy sabemos que hay al menos dos tipos de linfocitos con capacidad citotóxica : los linfocitos T citotóxicos(CTL) y los linfocitos grandes granulares (LGL).

Estos últimos pueden mediar dos mecanismos citotóxicos de gran

importancia en la destrucción tumoral: la citotoxicidad natural y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Una vez que los linfocitos citotóxicos se hallan unidos a la célula que van a destruir, siempre mediante el reconocimiento de un antígeno por su receptor específico, tiene lugar un proceso lítico, que según todos los indicios, pasa por la secreción de moléculas citotóxicas (citolisinas o perforinas, factor citotóxico NK, factor de necrosis tumoral, la  $\alpha$ -linfotoxina, interferones, etc.) previamente almacenadas en gránulos citoplásmicos (HENKART, 1985).

Estos linfocitos T citotóxicos que necesitan reconocer un antígeno como extraño a través de su receptor y tienen restricción HLA, se han mostrado útiles en la destrucción tumoral en diversos sistemas experimentales. Sin embargo en tumores espontáneos que no muestran capacidad inmunogénica, no se ha podido demostrar su papel protector.

De hecho en ratones desnudos que carecen de estas células, no hay aumento de incidencia de tumores espontáneos (RYGAARD, POULSEN, 1976).

Otro tipo de célula que interviene en la defensa tumoral son las células NK (citotóxicas naturales). Son células con actividad citotóxica no específica para un determinado tumor sin restricción HLA. En su mayoría poseen unas características morfológicas que las hacen reconocibles y encuadrables dentro de los linfocitos grandes granulares (LGL). Sin embargo existen células con sus características funcionales, que expresan antígenos de diferenciación de linfocitos T.

En el ratón se han descrito células con capacidad citotóxica natural pero que se diferencian de las células NK por su capacidad para lisar otras células diana, por sus marcadores de membrana y su respuesta a factores reguladores.

Recientemente se ha demostrado que la actividad de las células citotóxicas naturales (NC) está mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF), lo que hace pensar que pertenezcan a la estirpe mielomonocítica (HERBERMANN, REYNOLS, ORTALDO, 1986).

Las células del sistema mononuclear fagocítico participan de forma muy importante en diversos aspectos de la respuesta inmune. En primer lugar como células presentadoras de antígeno a los linfocitos T4 cooperadores. Además, actúan a muchos otros niveles y en la defensa antitumoral son capaces de destruir células neoplásicas al menos por dos mecanismos distintos.

El primero es un mecanismo directo, la citotoxicidad tumoral mediada por macrófagos, que es selectiva para células tumorales y sólo tiene lugar si el macrófago ha sido previamente activado (interferón-gamma).

El segundo es un mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) en el cual el macrófago actúa sobre cualquier célula recubierta de anticuerpos IGG.

### 3.9.2. MECANISMOS INMUNES HUMORALES DE DESTRUCCION TUMORAL.

Toda respuesta antitumoral activa mecanismos inmunológicos celulares y humorales. Con frecuencia se ha observado como estos últimos pueden proteger a las células tumorales y facilitar su crecimiento (FOLEY, 1953, citado anteriormente).

Sin embargo, los anticuerpos pueden contribuir a la destrucción de células tumorales al menos por dos mecanismos : lisis directa por activación del complemento o facilitando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

En 1982 se celebró una Conferencia Internacional sobre anticuerpos monoclonales y antígenos del melanoma

en Bethesda, confirmando que hasta ese momento se habían descrito 24 anticuerpos que definían a 11 antígenos. Estos once antígenos se expresaban sobre las células del melanoma en mayor cantidad que sobre las células normales o de otras neoplasias.

Las aplicaciones clínicas de los anticuerpos monoclonales han sido fundamentalmente hasta el presente.

a) La identificación de AAM en nuestras tisulares (THOMPSON,1982).

b) Utilizando anticuerpos monoclonales marcados se ha podido dibujar la imagen de melanomas humanos transplantedos en ratones (GHOSE,1982).

Esta técnica puede permitir la detección precoz de la lesión y una terapéutica más satisfactoria.

c) Los anticuerpos monoclonales contra los AAM han permitido la supresión del crecimiento tumoral en el ratón (BUMOL, 1982), la inhibición de las células del melanoma humano in vitro (DIPPOL & al, 1982) y la destrucción de células de

melanomas B<sub>16</sub> en el ratón, tal como hemos indicado anteriormente, todo lo cual sugiere su posible papel terapéutico.

d) La determinación de un AAM particular puede ser también útil para medir la masa tumoral en respuesta a la terapéutica.

e) Otros autores han producido un anticuerpo monoclonal humano contra un antígeno oncofetal OFA-1 que se encuentra en algunas células del melanoma (IRIE & al, 1982) y posteriormente in vitro se ha demostrado su carácter citotóxico cuando se le añadía el complemento.

**B. REVISION ESPECIFICA**

## 1. INMUNOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO DEL MELANOMA MALIGNO HUMANO

Sin duda la inmunoterapia desempeña un papel importante en la prolongación de los intervalos libres de enfermedad en pacientes con melanoma residual mínimo. Además existen pruebas de que la inmunoterapia mejora la duración de las remisiones en pacientes con cáncer diseminado.

De los estudios con modelos animales se deduce con claridad que los procedimientos inmunoterápicos poseen una buena eficacia en las etapas iniciales de la neoplasia maligna, antes de que esta se generalize.

Al considerar MATHE, los fenómenos inmunológicos del coriocarcinoma placentario (MATHE, 1964) y al opinar que la quimioterapia nunca podrá actuar sobre la última célula tumoral (MATHE, 1966), este autor orienta sus trabajos hacia la inmunoterapia.

Trabajos posteriores del mismo MATHE permiten aceptar dos hechos fundamentales : Que la inmunoterapia es capaz de destruir hasta la última célula y que solamente sería efectiva cuando el número de células tumorales no exceda de  $10^6$ .

Como señala DIAZ RUBIO aunque exista una respuesta inmunológica correcta, ésta puede ser ignorada o abolida por la existencia de factores bloqueantes que producen la "facilitación inmunológica" (Enhacement), (DIAZ-RUBIO, 1975).

A este respecto es interesante conocer que cualquier tipo de inmunoterapia puede estimular la inmunidad humoral y aumentar la producción de anticuerpos bloqueantes. Con el paso del tiempo se ha podido comprobar que la inmunoterapia, utilizada en los últimos años, ha dado resultados muy poco brillantes.

Bien es cierto, que la estimulación inmunológica específica con células tumorales y la no específica (con adyuvantes bacterianos, víricos y químicos) se mostró eficaz para ampliar la respuesta inmunitaria del animal y para retardar o prevenir el crecimiento de los tumores transplantados, pero no es menos verdad que rara vez fue capaz de regresar los tumores palpables del animal.

Ello contribuyó de una manera firme a la creación de un dogma que admitía que la inmunoterapia sólo era

eficaz cuando el tumor era pequeño, lo que orientó los trabajos hacia la erradicación de la enfermedad residual tras cirugía. Estos estudios demostraron la eficacia de la inmunoterapia en el animal cuando el número de células era inferior a  $10^6$ , lo que en cambio no se corroboró en el hombre, probablemente debido a que cuando existen micrometástasis el número de células tumorales sea superior a esta cifra.

A pesar de todo, algún estudio clínico resultó positivo, pero desgraciadamente no pudo ser reproducido. El fracaso de este tipo de inmunoterapia debe, sin duda, ser achacado a la mala o defectuosa caracterización de los agentes utilizados y a la variabilidad resultante.

Sin embargo en el momento actual existe un nuevo resurgir en el campo de la inmunoterapia debido al desarrollo en los últimos años de una nueva tecnología. Así la aparición de la nueva biología molecular y de la ingeniería genética ha propiciado el aislamiento de genes y la posibilidad de clonarlos individualmente, pudiendo de ésta manera obtener productos protéicos purificados y de una óptima actividad biológica.

Pero además la nueva técnica de los hibridomas, con la aparición de los anticuerpos monoclonales, ha posibilitado el aislamiento y caracterización de los antígenos asociados a tumores, mientras el campo de las linfoquinas no ha hecho más que comenzar (DIAZ-RUBIO 1987).

Hay diferentes maneras de realizar la inmunoterapia y las más significativas son las siguientes :

- I ) Inmunoterapia activa no específica o inmunocoadyuvante.
- II ) Inmunoterapia activa específica o tumorantegenoterapia.
- III) Inmunoterapia adoptiva.
- IV ) Inmunoterapia pasiva.
- V ) Inmunoterapia por mediadores inmunológicos

A veces se combinan 2 ó 3 de estas técnicas.

#### 1.1. INMUNOTERAPIA            ACTIVA            NO            ESPECIFICA (Inmunocoadyuvante)

La base experimental para una inmunoterapia de este tipo ha sido la comprobación de que un estimulante de la respuesta inmunizante frente a antígenos microbianos podría también aumentar la respuesta inmunizante frente

a un tumor con antígenos específicos asociados al tumor. Se realiza por medio de adyuvantes, que aumentan de una forma inespecífica todas las reacciones de inmunidad. Su acción se realiza tanto sobre la inmunidad humoral como sobre la celular, induciendo altos niveles de anticuerpos y mayor capacidad de resistencia frente a los antígenos infecciosos. Por lo tanto, es posible conferir al receptor cierta capacidad de reacción frente a antígenos tumorales y en consecuencia la destrucción del tumor, sobre todo si éste antes ha sido previamente extirpado mediante cirugía o tratado con radioterapia o quimioterapia. Ello es debido a que la inmunoterapia, como lo indicábamos anteriormente, sólo puede actuar sobre una cantidad de células tumorales menor de  $10^6$ .

Como adyuvantes en experimentación animal se han utilizado una gran variedad de toxinas bacterianas, que se han mostrado eficaces en el tratamiento de melanomas malignos avanzados, pero la más utilizada ha sido y es la BCG. Su actividad en los tumores animales depende en parte del sustrato utilizado, estado, dosis, vía de

administración, tiempo transcurrido respecto a la fecha en que el tumor fue transplantado, así como el tipo histopatológico de éste. De tal forma que la BCG administrada antes de la inoculación de las células tumorales singénicas a menudo retrasa el crecimiento tumoral y ocasionalmente lo rechaza si el número de células tumorales inoculadas es pequeño.

Sin embargo, su efecto es despreciable si se administra después de la inoculación de las células tumorales o cuando el tumor es detectable.

AMIEL Y BERDET demostraron en el animal que la administración de inmunoterapia seguida de quimioterapia es totalmente ineficaz para obtener curaciones de leucemias, mientras que si se administra primero la quimioterapia y más tarde la inmunoterapia los resultados son francamente buenos (AMIEL & BERDET, 1960).

Por analogía con los estudios animales se han aplicado al hombre los mismos procedimientos sobre todo en lo que se refiere a las leucemias. Respecto a los tumores sólidos los mejores resultados se han obtenido en el tratamiento del melanoma.

Por lo menos en tres estudios se ha sugerido que la inmunoterapia coadyuvante con BCG prolongaría el intervalo libre de la enfermedad y la supervivencia de pacientes con melanoma con metástasis en ganglios linfáticos regionales que habrían quedado libres de enfermedad mediante cirugía.

BLUMING & al comparan el efecto de la BCG Pasteur liofilizada por escarificación, dos veces por semana durante un mes, después de extirpado el melanoma tipo 1 y las adenopatías regionales aunque no tuvieran afectación clínica, con la BCG Glaxo por vía intradérmica. Todos los pacientes que recibieron esta última modalidad presentaban una recaída hacia las 30 semanas. En cambio sólo uno de cada 6 pacientes escarificados presentaban recidiva al año. Los pacientes que se vacunaron con BCG Pasteur recibieron alrededor de 10 unidades viables más que los del otro grupo y los autores pudieron comprobar la aparición de una potenciación de la inmunidad celular, (BLUMING & al, 1972).

GUTTERMAN & al pudieron también comprobar la importancia del número de microorganismos viables, la cepa, la relación entre microorganismos viables y no viables y las localizaciones de la escarificación (GUTTERMAN & al, 1973; GUTTERMAN & MAVLIGIT, 1973).

Los estudios de IKONOPISOV y los de MORTON llegan a las mismas conclusiones. En estos trabajos parecen demostrar como la BCG por escarificación aumenta la respuesta linfocítica in vitro a mitógenos y a diversos antígenos, así como, la hipersensibilidad cutánea retardada (IKONOPISOV, 1974; MORTON, 1974).

El procedimiento ha sido ampliamente utilizado y numerosos autores así lo han hecho en sus enfermos, con resultados contradictorios. Por citar alguno más reciente PATERSON & al utilizan la BCG local y sistémica en estudio doble ciego en 199 pacientes con melanoma maligno estadio 1 sin encontrar ningún beneficio con este tipo de inmunoterapia (PATERSON & al, 1984). En sentido contrario opinarían los ya citados GUTTERMAN & al Y PINSKY & al que vuelven a insistir en

la eficacia en la prolongación del tiempo libre de recidivas, así como en el tiempo de supervivencia en melanomas estadios 1 y 2, después de ser tratados con cirugía (GUTTERMAN & al, 1978; PINSKY & al, 1978).

Por otra parte en pacientes con metástasis a distancia parece lograrse con dosis altas de BCG un efecto paliativo o bien estabilizador del crecimiento tumoral. La eficacia de la BCG en pacientes afectos de un melanoma parece guardar una dependencia de diversas variables: cepa bacteriana (Pasteur, Tice, Behring-Werke, Glaxo, etc.), modo de aplicación (escarificación, inyección intradérmica, intratumoral) y cifra de gérmenes vivos virulentos que han de ser puestos en contacto lo más cerca posible con el tumor o con la zona ganglionar afecta (KOKOSCHKA, 1979).

Como indican KOKOSCHKA y otros autores, no es posible esperar, en casos de una masa tumoral macroscópica, un efecto curativo de una inmunoterapia practicada aisladamente. Para posibilitar la requerida reducción de las células tumorales se hacía evidente combinar las medidas inmunoterapéuticas con sustancias quimioterápicas.

En tumores experimentales en animales se ha podido demostrar que diversos biostáticos tienen junto a propiedades celulocitotóxicas un efecto sinérgico aditivo sobre los mecanismos inmunitarios. En función de la clase de factor quimioterápico aplicado se han podido observar, hasta el momento, efectos muy diversos sobre las células inmunitarias primitivas y macrofágicas así como sobre el desbloqueo de antígenos tumorales.

Es ISRAEL quién por primera vez llama la atención sobre el hecho, consolidado luego por estudios clínicos, de que dosis adicionales de un inmunoadyuvante pueden mejorar esencialmente el resultado de una terapia citostática en caso de tumores sólidos. (ISRAEL & HALPERN, 1972).

GUTTERMAN & al en un estudio sin randomización en pacientes con melanoma con metástasis regionales ganglionares pudieron lograr un índice de remisiones de un 55% con una inmunoterapia a base de DTIC y BCG Pasteur en escarificación.

Estas remisiones eran significativamente más prolongadas que las obtenidas en pacientes tratados sólo con quimioterapia (GUTTERMAN & al, 1976).

IKONOPISOV también obtuvo supervivencias más prolongadas con la combinación de DTIC y BCG, en comparación con DTIC solamente (IKONOPISOV, 1974, citado anteriormente).

De estos y otros estudios en animales se desprende que se pueden combinar con eficacia la quimioterapia con la inmunoterapia, pues se obtienen efectos aditivos en potencia y quizás sinérgicos. Sin embargo, falta saber más sobre la interacción de los diversos agentes quimioterápicos con la inmunoterapia. En general el efecto de los diversos agentes quimioterápicos sobre la respuesta inmune depende del momento en que se administran en relación con el antígeno.

También es interesante saber como algunos quimioterápicos tienen una acción selectiva sobre determinado tipo de inmunidad. Así el metotrexato más el 5-fluoracilo administrados una hora después del antígeno suprimen la inmunidad humoral y no la celular.

Lo mismo le pasa a la ciclofosfamida, que parece ejercer efectos inmunosupresores mayores sobre las células productoras de anticuerpos en comparación con la inmunidad celular.

LAGRANGE Y MACKANESS comunicaron unos interesantes estudios sobre el empleo de quimioterápicos para aumentar la inmunidad celular. Inmunizaron a ratones con eritrocitos de carnero y a medida que la respuesta inmune de anticuerpos fue en aumento, la hipersensibilidad tardía frente a estos disminuyó. Comprobaron también que el tratamiento con ciclofosfamida libera a las células T de la influencia inhibidora de la respuesta humoral y hace que se potencie la hipersensibilidad tardía.

La magnitud de este efecto potenciador dependió del momento en que se hizo el tratamiento en relación con el momento de la inmunización. Los autores sugieren que la ciclofosfamida, administrada antes de la estimulación antigénica, ejerce un efecto duradero sobre la formación de anticuerpos pero parece que no

posee ninguna influencia nociva sobre los precursores de las células T activadas.

En cambio, después de la estimulación antigénica, las células T también se pueden tornar susceptibles a la acción de la ciclofosfamida (LAGRANGE & MACKANESS, 1974). MACKANESS comprobó que la inhibición de las células T activadas, queda abolida casi por completo con la BCG. La aplicación de la BCG en los ratones hizo que adquirieran una extraordinaria hipersensibilidad tardía frente a los hematíes de carnero.

De enorme importancia para comprender la interacción de la quimioterapia con la inmunoterapia fue la demostración de que los niveles de anticuerpos aumentaron con la BCG, lo cual sugiere que la hipersensibilidad tardía se exageró por la acción de la BCG al eliminar los complejos antígeno-anticuerpo. La ciclofosfamida administrada junto con la BCG produjo un efecto sinérgico sobre la hipersensibilidad tardía.

En la actualidad la mayoría de los regímenes quimioterápicos son intermitentes para permitir

que se recupere la respuesta inmune.

El concepto de que la inmunoterapia regional puede acrecentar el efecto quimioterápico de las drogas es de una extraordinaria importancia. Así, la aplicación regional de la BCG junto a la administración de DTIC en el melanoma maligno potenció el efecto quimioterápico sobre los ganglios regionales en esta enfermedad (GUTTERMAN, MAVLIGIT, GOTTLIEB, 1974).

En un estudio terapéutico randomizado, KOKOSCHKA & al comparan el efecto del Metil-CCNU sólo y la combinación del mismo con el *corynebacterium parvum* aplicado intravenosamente. Sus resultados parecen demostrar que con la terapéutica combinada se influyen mucho más favorablemente, tanto la remisión tumoral como los parámetros inmunológicos y los efectos secundarios hematotóxicos de la quimioterapia (KOKOSCHKA, LUGER, MICKSCHE, 1978).

A pesar de los estudios mencionados en los que se valoran positivamente los buenos resultados

de la inmunoterapia con BCG en los melanomas, existen otros grupos de trabajo que no pudieron reproducirlos. E incluso otros autores no encontraron superior la asociación de DTIC con BCG (CONSTANZI, 1976).

Un trabajo importante que puede ser representativo de la eficacia de la BCG, del *Corynebacterium parvum* (que mencionaremos más tarde) y del DTIC solos o asociados en el tratamiento del melanoma avanzado inoperable es el patrocinado por la W.H.O. con la colaboración de 17 centros para la evaluación de los métodos de diagnóstico y tratamiento del melanoma (VERONESI, 1984). El resultado final es que la eficacia es similar con los tres regímenes de tratamiento. En conjunto se produjo una regresión total del tumor en el 12% de los casos (25/196) y esta regresión duró por término medio menos de un año.

A medida que se fue adquiriendo experiencia con los coadyuvantes en ensayos con cáncer humano se ha puesto en evidencia que para obtener los máximos beneficios se deben tener en cuenta muchas variables.

Para emplear la BCG en estudios humanos y animales se debe considerar : la cepa de BCG, la cantidad de microorganismos viables y muertos, la presencia de antígeno libre y la frecuencia y vía de administración. Parece ser que el preparado óptimo para la inmunoterapia del melanoma sería una cepa de BCG virulenta y viable, libre de microorganismo agregados. Sin embargo, las grandes esperanzas que se tenían en ella en el tratamiento del melanoma humano no han podido ser confirmadas y ha caído en desgracia como proceder adyuvante en el tratamiento del mismo.

El melanoma maligno es el tumor ideal para estudiar los efectos inmunológicos de la inmunoterapia local. Esta técnica nació prácticamente con COLEY comprobando que la inoculación directa de extractos de estreptococos y serratia en diversos sarcomas humanos provocaba la regresión local de tumores sólidos metastásicos (COLEY, 1911).

**1.1.1. INMUNOTERAPIA INTRALESIONAL DEL MELANOMA  
CON BCG**

El método más generalizado ha sido la inyección intralesional del melanoma con BCG que sólo se ha mostrado efectiva cuando el tumor es pequeño. La experiencia resumida es la siguiente (ROSENBERG & HERBERT, 1976).

**1.1.1.a. Técnica de la inyección de la BCG :** Existen diversos preparados de BCG que se han empleado para la administración intralesional en tumores humanos y animales. Las especies de BCG utilizadas han incluido cepas de Philips, Tice, Glaxo, Pasteur y Montreal, al igual que fracciones acelulares de estas bacterias. No hay pruebas convincentes, en el hombre, de que algunas especies de BCG sean mejores que otras para tratamiento intralesional.

Los preparados de BCG, diluidos adecuadamente, se inyectan por vía intradérmica en la base de la lesión del melanoma con una aguja del calibre 26. Algunos investigadores limitan el número de nódulos inyectados en cada sesión a menos de 10, en tanto que otros inyectan hasta 40. Pueden ocurrir reacciones potencialmente mortales de hipersensibilidad y por esta razón, la BCG debe usarse con enorme cuidado en sujetos que han recibido múltiples inyecciones previas. Según el tamaño del nódulo se inyectan 0,1 a 1cc. Los diversos investigadores que han usado esta técnica han empleado desde  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  microorganismos viables por nódulo.

**1.1.1.b. Resultados terapéuticos:** Muchos autores han empleado la BCG intralesional en las recidivas

cutáneas de MM y en resumen podemos decir :

a) La inyección intralesional de BCG en los nódulos del melanoma puede producir regresión en el 90% de los casos.

b) Aproximadamente un 20% de los pacientes muestran regresión de nódulos no inyectados con BCG. Prácticamente en todos los casos, los nódulos no inyectados con BCG que mostraban regresión, estaban muy cerca de las lesiones inyectadas y dentro de la zona de drenaje linfático de la BCG inyectada.

c) Los nódulos subcutáneos, a diferencia de los superficiales y los viscerales son mucho más resistentes al tratamiento con BCG.

d) Por lo general no ha habido un efecto beneficioso concomitante en la enfermedad metastásica visceral. En muchos pacientes pueden aparecer nuevos nódulos metastásicos cutáneos, mientras desaparecen otros nódulos inyectados.

e) La supervivencia a largo plazo de personas que han recibido BCG intralesional parece que tiene lugar únicamente en pacientes que solamente tenían nódulos recidivantes cutáneos.

**1.1.1.c. Factores que influyen en el índice de mejoría :**

a) El estado de inmunocompetencia del individuo (DNCB positivos).

b) No es importante que un sujeto muestre positividad a la prueba cutánea con PPD antes del tratamiento para sospechar si responderá a la aplicación intralesional de BCG.

c) Los sujetos con enfermedad diseminada tienen una mayor frecuencia de inmunodeficiencia a juzgar por las cutirreacciones y la sensibilización al DNCB, que los individuos con enfermedad cutánea localizada.

d) No se cuenta con estudios suficientes, en el ser humano, que comparen el índice de respuesta con el número de microorganismos viables inyectados. En general los nódulos cutáneos han mostrado regresión después de inyectar  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  microorganismos viables.

**1.1.1.d. Secuencia de fenómenos :**

Respuesta inflamatoria local a las 4 horas. Fiebre hasta de  $40^0$  C. Síntomas gripales. Necrosis local a los 7 días.

Entre 3 semanas a 2 meses se inicia la cicatrización. Los síntomas inflamatorios aumentan con las inyecciones sucesivas.

**1.1.1.e. Complicaciones importantes :**

Hipersensibilidad grave, incluso mortal. Es más probable cuanto más exposiciones haya habido a la BCG. Son más frecuentes por vía intralesional o intradérmica que por escarificación. Es posible también que se intensifique el crecimiento tumoral.

Dicen GUTTERMAN & al que para evitar la toxicidad de la administración intralesional de BCG, se debe emplear en escarificación alrededor de la lesión, con iguales resultados. Las dificultades inherentes al empleo de productos bacterianos vivos estimuló el interés en

coadyuvantes no viables, tales como productos de la pared celular de la BCG y otras fracciones, productos químicos como el Levamisole o incluso otros agentes microbianos como el *Corynebacterium parvum*, *bordetella pertussis*, endotoxinas bacterianas y agentes virales e incluso la BCG tratada con formol o metanol. Ninguno de ellos se ha mostrado superior a la BCG. También han dado algún resultado los adyuvantes no bacterianos como los ácidos nucleínicos y derivados químicos de ácidos nucleínicos complejos y otras sustancias como la vitamina A, ácidos grasos y lípidos e igualmente moléculas inorgánicas del tipo del aluminio, bentonita, etc.

El modo de acción de todos estos adyuvantes parece ser muy

complejo y no poseen un tipo de acción unidireccional. No obstante es muy probable que la mayoría posean una acción estimuladora del SRE y más específicamente de los macrófagos (UNANUE, 1972).

Activan la inmunidad celular y humoral antitumoral, pero alguno de estos anticuerpos pueden favorecer el crecimiento tumoral (facilitación inmunológica) e incluso también pueden hacerlo los antígenos solubles y los complejos antígeno-anticuerpo.

Esta inmunoterapia por adyuvantes, activa, debe ser realizada siempre con cuidado, incluso en los melanomas, en los cuales se ha mostrado beneficiosa. Debemos disponer siempre de una batería de test inmunológicos, mediante los cuales podamos valorar en todo momento el estado inmunológico del paciente.

## 1.2. INMUNOTERAPIA ACTIVA ESPECIFICA

Una contribución excepcional para la inmunoterapia es la inmunización activa mediante una vacuna preparada a partir de células tumorales antigénicas. Durante los últimos años muchos pacientes con diversas enfermedades neoplásicas y en este caso concreto los melanomas, han sido inmunizados con preparaciones de su propio tumor, mediante células irradiadas, homogeneizadas o bien mediante extractos o células de tumores de otros enfermos con la misma histología tumoral.

En experimentación animal se ha podido demostrar que la preaplicación de una inmunización con células tumorales o con antígenos tumoroespecíficos puede impedir que prenda un tumor transplantado.

En estos experimentos la administración de células tumorales vivas, no radiadas, resultó ser la forma más efectiva de inmunoprevención (KOKOSCHKA, citado anteriormente).

Por otro lado son muchos los autores que han observado como este tipo de tratamiento aumenta

la respuesta inmunitaria tanto de linfocitos T como B y también como estos linfocitos y los macrófagos de estos pacientes se hacen generalmente citotóxicos frente a las células del melanoma maligno (IKONOPISOV, LEWIS, HUNTER-CRAIG, 1970);(CURRIE, LEJEUNE, FAIRLEY, 1973).

Sin embargo CURRIE en su trabajo, sólo encuentra linfocitos citotóxicos in vitro frente a cultivos de melanoma autólogo en una pequeña proporción de pacientes (3/12). Este porcentaje se elevó cuando a un grupo de pacientes se les vacunó con células tumorales irradiadas (5/12), pero estos linfocitos desaparecieron a la tercera semana de evolución de la enfermedad.

Su aparición no se relacionó en nada con la presencia de anticuerpos antitumor o la presencia de factores bloqueantes y no se produjo ningún beneficio para el paciente por su presencia. Dice CURRIE : "En la revisión de la literatura en lo concerniente al tratamiento de pacientes con cáncer avanzado, con células tumorales autólogas, no hay ninguna evidencia de que se consiga un beneficio clínico por tal procedimiento" (GRAHAM, J. & GRAHAM, R., 1962);

(CUNNINGHAM, OLSON, LAFFIN, SULLIVAN, 1969).

Parecería pues por estos trabajos que la vacunación autóloga específica no produce una mejoría clínica clara del proceso tumoral aunque se puedan conseguir algunos cambios inmunológicos favorables.

Los primeros efectos desagradables de esta forma de inmunoterapia fueron señalados en 1967 por MCCOY, FEFER Y GLYNN al comprobar que se podían producir fenómenos de facilitación inmunológica (MCCOY, FEFER Y GLYNN, 1967). Pero quizás el mayor problema radique en que los antígenos tumorales son generalmente poco inmunogénicos y por tanto la inmunidad que desarrollen será incompleta o totalmente ineficaz.

A pesar de la poca eficacia clínica de las vacunaciones activas autólogas en casos de melanoma, tal como hemos indicado, diversos autores en diferentes partes del mundo han seguido intentando encontrar una vacuna específica eficaz contra el melanoma. Así, por ejemplo, KOKOSCHKA Y MICKSCHE en Viena, en

estudios randomizados en pacientes en estadio II parecen demostrar una mayor supervivencia y un mayor intervalo libre de enfermedad después de 50 meses, mediante una vacunación con extractos de membrana de células de melanoma en comparación con un grupo control tratado con monoquimioterapia (MeCCNU) (KOKOSCHKA & MICKSCHE, 1978,1979).HUMPHREY & al en melanomas estadio I y II obtienen supervivencias mejores de las esperadas en sujetos no tratados. En dicho trabajo, desafortunadamente, no hacen un estudio randomizado (HUMPHREY & al, 1984).

En general en esta última década la mayoría de los trabajos publicados sobre vacunas específicas preparadas con homogeneizados de células tumorales o con células tumorales irradiadas, tratando de aumentar la inmunidad contra el melanoma o la supervivencia, en humanos, no han podido reproducir los buenos resultados obtenidos en las experiencias en animales (CALKINS,SONDAK,NIZZE & al,1984; MASTRANGELO,BERO,MAGUIRE,1984;LIVINGSTON, KAELIN, PINSKY, OETTGEN, OLD, 1985 ; SIEGLER, COX, MITZNER, SHEPPER, NICHOLSON, SHINGLETON, 1985; BYSTRYN,1985).

Recientemente JEAN-CLAUDE BYSTRYN & al han descrito la preparación de una vacuna polivalente humana contra antígenos del melanoma preparada a partir del material "liberado" por las células tumorales cultivadas en un medio libre de suero.

Los aspectos más importantes de esta vacuna son : que es de composición antigénica heterogénica y que está libre de las proteínas séricas fetales de la vaca que son muy inmunogénicas. Los resultados obtenidos en melanomas avanzados y en estadio II indican que no es tóxica ni peligrosa y al mismo tiempo aumenta los fenómenos inmunitarios en muchos de los pacientes con melanoma.

Aunque los resultados clínicos no pueden ser evaluados por faltar una randomización hay que indicar que tres enfermos con lesiones metastásicas sufrieron una regresión de sus lesiones y permanecen libres de lesiones 25 meses después de iniciar la vacunoterapia (BYSTRYN, VALENTINE, 1985; BYSTRYN, BERSTEIN, HARRIS, ROSES, SPEYER, 1985; BYSTRIN, JACOBSEN, HARRIS, ROSES, SPEYER, LEVIN, 1986; BYSTRYN, RUTH, ORATZ, HARRIS, 1988).

Como consecuencia de la dificultad de encontrar una vacuna específica activa contra el melanoma se ha intentado por los más diversos métodos aumentar la antigenicidad de las células tumorales.

#### **1.2.1. MODIFICACIONES FISICAS DE LAS CELULAS TUMORALES.**

En parte ya las hemos mencionado. El principio en que se basan es que si a un animal se le inoculan células tumorales y éstas no proliferan, el animal queda inmunizado frente a este tipo de tumor. Por lo tanto, si inyectamos células tumorales incapaces de dividirse al ser bloqueadas mediante los rayos X, las radiaciones gamma o rayos ultravioleta, el animal podría quedar inmunizado.

Sin embargo su utilización en tumores avanzados fue totalmente ineficaz. Tampoco se obtuvieron mejores resultados con la utilización de la congelación, liofilización, presión, homogeneización, etc., de las células tumorales.

### 1.2.2. ACOPLAMIENTO DE INMUNOGENOS A LAS CELULAS TUMORALES.

Es un hecho conocido que si a un hapteno no inmunógeno, se le acopla una proteína altamente inmunógena, se llegan a formar anticuerpos anti-hapténicos específicos. De acuerdo con ello, CZAJKOWSKI realizó un acoplamiento de gammaglobulina de conejo a las células tumorales y posteriormente las inoculó a animales con adenocarcinomas mamarios espontáneos (CZAJKOWSKI, ROSENBLAT, WOLF, VAZQUEZ, 1972).

De esta manera, se pudo conseguir un retraso muy significativo en el crecimiento del tumor pero nunca la regresión. El estudio realizado por CUNNINGHAM & al en pacientes con neoplasias muy avanzadas ha sido completamente negativo (CUNNINGHAM & al, 1969). HOUGHTON & al investigaron la posibilidad de aumentar la inmunogenicidad de los antígenos tumorales con ciertos virus, particularmente mixovirus, con resultados prometedores (HOUGHTON & al, 1981).

BOONE & al (citado por HOUGHTON) han demostrado que extractos de membranas de células de melanoma infectados con virus de la estomatitis vesiculosa provocaron reacciones de hipersensibilidad retardada en pacientes con melanoma pero no en pacientes con otros tipos de tumor. Los extractos membranosos no infectados fueron inactivos.

Otros intentos en el mismo sentido han sido los de (SHARPLES, DAVIES, COX, 1950; KOPROWSKI, LOVE, DOPROWSKA, 1957; LINDENMANN, KLEIN, 1967) y más recientemente los de MURRAY & al (MURRAY, CASSEL, TORBIN, OLKOWSKI, MOOREY, 1977) y los de WALLACK y su grupo que han usado el método de la oncolisis viral, ya mencionado, en el cual la yuxtaposición de un fuerte antígeno viral a un antígeno tumoral débil induce una respuesta inmune intensa a este último.

Como los virus usados hasta este momento eran patógenos para el hombre, utilizaron el virus vacunal.

Las experiencias han englobado melanomas en estadios I, II y III y en todos los casos los sujetos no empeoraron; apenas se encontraron reacciones adversas y serológicamente valiéndose de la técnica SPA, la cual detecta la mayor parte de las IGGS humanas, encontraron que la reactividad inmunológica estaba dirigida hacia antígenos originados en las cepas de melanoma humano. Aunque hubo pacientes con supervivencias prolongadas no quieren sacar conclusiones por no ser estudios randomizados (WALLACK, STEPLEWSKI, KOPROWSKI, 1977; WALLACK, 1979; WALLACK, 1981; WALLACK, MEYER, BOURGOIN, 1983; WALLACK & MICHAELIDES, 1984).

Otros métodos utilizados para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales ha sido la utilización de enzimas como la tripsina, pepsina, colagenasa, quimiotripsina, etc., pero sólo la neurominidasa del vibrium colérico ha tenido éxito en

experiencias animales (PROGER & BAECHEL, 1973; PRAGER, 1973). CURRIE & BAGSHAWE han sugerido que el ácido siálico contenido en la superficie celular puede actuar, en algunas ocasiones, como una barrera infranqueable para la detección de antígenos por el organismo (CURRIE & BAGSHAWE, 1969).

Sobre la base de esta hipótesis SANFORD & COINGTON han demostrado que el tratamiento de las células tumorales con neuraminidasa hace mucho más difícil el transplante de tumores en animales alogénicos (SANFORD & COINGTON, 1971)

Por otro lado, SIMMONS & al han puesto de manifiesto que la neuraminidasa es capaz de aumentar la inmunogenicidad de una gran variedad de tumores, tanto en vitro como in vivo (SIMMONS, RIOS & RAY, 1971).

El mecanismo por el cual la neuraminidasa aumenta la inmunogenicidad

es desconocido y muy complejo, pero quizás, como señala WEIS, la acción principal se desarrolle sobre el ácido siálico.

### 1.3. INMUNOTERAPIA PASIVA

Consiste en la administración de suero con anticuerpos antimelanoma bien de donantes con inmunidad natural contra el melanóma maligno, o bien procedentes de pacientes afectos de melanoma con remisión de larga duración. Sin embargo, aunque esta técnica puede tener resultados brillantes en la experimentación animal (GORER & AMOS, 1956) no ha dado hasta el momento un resultado eficaz en su aplicación a la clínica humana.

Por una parte los mecanismos humorales parecen ser responsables sólo en un plano secundario de la eliminación de la masa tumoral; por otra parte siempre está el peligro de la facilitación inmunológica (NAGEL, 1970).

Un nuevo aspecto de la inmunoterapia pasiva lo constituye la unión de anticuerpos específicos

con sustancias citotóxicas (DULLENS, WEGERDE, VENNEGOOR, DENOTTER, 1979; GHISEM, NORVELL, GUCLU, CAMERON, BODURTHA, MacDONALD, 1972)

En este último caso los autores unieron anticuerpos contra el linfoma EL<sub>4</sub> del ratón y un melanoma humano, con clorambucil, sin alterar las propiedades de ambos. La inyección de este complejo en un paciente con un melanoma maligno diseminado llevó a la regresión de todos los nódulos metastásicos.

El logro de los anticuerpos monoclonales mediante la técnica de los hibridomas, por KHÖLER y MILSTEIN en 1975 ha supuesto un extraordinario avance en el campo del diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Su poder terapéutico empleados de una manera aislada o unidos con isótopos, fármacos y toxinas, está siendo ensayado en linfomas, leucemias, melanomas, cáncer de pulmón y gastrointestinal, con resultados que aunque alentadores son claramente inferiores a los esperados, en razón de los problemas técnicos surgidos.

Esto determina que por el momento se continúe trabajando en modelos animales y en ensayos fase I en el hombre, estando los ensayos Fase II limitados, en tanto no se solucionen los problemas mencionados (HELLSTROM J, BROWN & HELLSTROM, K. 1981; HELLSTROM. J, BRANKOVAN & HELLSTROM, K., 1985; DIAZ-RUBIO, 1987, citado anteriormente).

Hasta el momento la aplicación más simple de esta técnica es la administración del anticuerpo sólo, sin modificación. Los anticuerpos pueden reaccionar con las células diana y producen la destrucción tumoral por medio de la activación del complemento o por un mecanismo ADCC, tal como lo mencionamos anteriormente.

Recientemente ROSENBERG y su grupo administran anticuerpos monoclonales anti-melanoma B16 de la clase IgG2b a ratones con metástasis hepáticas de melanoma B<sub>16</sub> y logran una reducción de las metástasis hasta en un 90%.

Este efecto antitumoral podía ser aumentado por la administración concomitante de interleuquina-2.

Sus resultados les hacen sugerir su aplicación en metastasis hepáticas humanas de tumores (ROSENBERG & al, 1987).

#### 1.4. INMUNOTERAPIA ADOPTIVA

Se trata en esencia de la transferencia adoptiva de la inmunidad celular frente al tumor, mediante la administración de "linfocitos sensibilizados" al paciente. Está basada en los trabajos experimentales de ALEXANDER (ALEXANDER, 1974), así como en las experiencias clínicas de NADLER & MOORE. Estos autores, en 80 pacientes con melanoma, hacen un transplante cruzado de tumor, y al cabo de algunas semanas hicieron transfusiones sanguíneas cruzadas de linfocitos entre ellos; obtuvieron en el 20% de los casos una regresión de la masa tumoral (NADLER & MOORE, 1968).

Problemas de histocompatibilidad así como la limitada cifra de linfocitos que pueden ser transfundidos, dan a esta forma de terapia un carácter más teórico.

Los experimentos en animales son más sencillos que en el hombre, en el cual hay que emplear células alogénicas, que van a ser eliminadas sino son compatibles. De momento el modelo con el cual se han obtenido mejores resultados, es el que emplea linfocitos autólogos. En este sentido se encuentran los obtenidos por FRIDMAN Y KOURILSKY, en las leucemias agudas mediante la sensibilización in vitro de los linfocitos frente a las células leucémicas autólogas y reinyectadas posteriormente en el paciente (FRIDMAN & KOURILSKY, 1969). El objeto es realizar la sensibilización in vitro para intentar evitar la acción de los "anticuerpos bloqueantes" que se producen in vivo.

Los mejores resultados se obtienen tras una quimioterapia intensa con objeto de reducir el volumen tumoral. Se han comunicado buenos resultados en humanos, cuando un paciente con un tumor pequeño es tratado con quimioterapia junto con células linfoides de individuos con un HLA similar.

Así se han comunicado buenos resultados en neuroblastomas y osteosarcoms (MORTON & MALGREN, 1968).

Más recientemente, en la misma línea de investigación BALSARI & al demuestran como los linfocitos de pacientes con melanoma activados in vitro por linfocitos alogénicos e inyectados en ratones atímicos, esplecnetomizados e irradiados, a los cuales se les implanta previamente y por vía subcutánea células de melanoma humano, impiden el crecimiento de estos (BALSARI & al, 1986).

La utilización de linfocitos del paciente, sin estimular previamente, no fue efectiva. ROSENBERG & al utilizando células Killer activadas por inteleuquina 2, han obtenido resultados prometedores en el melanoma y cáncer renal, si bien con una toxicidad e incluso mortalidad a tener en cuenta (ROSENBERG & al, 1986; ROSENBERG & al, 1987).

Varios investigadores han generado células T estimuladas in vitro con tumores humanos. BALSARI & al estimulan linfocitos sanguíneos con melanomas alogénicos, y generan células capaces de lisar melanomas autólogos (BALSARI, FOSSATI, TARMELLI & al, 1985).

HERESY & al cultivan linfocitos sanguíneos con

células autólogas de melanoma y generan células que lisan hasta un 31% de células de melanoma autólogo y también células de melanoma alogénico K562 y cáncer de pecho (HERESY, MacDONALD, SCHEBECI & al, 1986).

En un trabajo reciente MUUL & al utilizando los linfocitos que infiltran el tumor llegan a la consecución de tres líneas celulares que de una manera no específica lisan varios tipos de células diana y otras tres líneas celulares que específicamente lisan células tumorales (MULL, SPIESS, DIRECTOR, 1987). SLINGLUFF & al han podido producir linfocitos T estimulados específicamente con células de melanoma autólogo y los han mantenido estimulados con IL-2 durante un cierto tiempo. Estudiaron 10 pacientes. En seis los linfocitos lisaban las células tumorales autólogas y en dos de ellos, lo hacían de una manera específica (SLINGLUFF & al, 1987). Algo parecido han obtenido MULL & al.

Estos autores han cultivado los linfocitos que infiltraban los melanomas de 6 pacientes y los han estimulado con IL-2. Después han comprobado

como estos linfocitos eran citotóxicos frente a su propias células tumorales y no frente a células normales autólogas u otros tumores alogénicos. Había, sin embargo, algunos linfocitos que también tenían una capacidad citotóxica frente a células tumorales alogénicas, aunque más pequeña.

Una forma de inmunoterapia adoptiva de enorme interés y realidad es el trasplante de médula ósea. Por el momento está reservado a ciertos casos de leucemias y linfomas. En los tumores sólidos su aplicación no ha hecho más que comenzar.

#### 1.5. INMUNOTERAPIA POR MEDIADORES INMUNOLOGICOS

Dados los inconvenientes encontrados en todas las formas de inmunoterapia, algunos autores se lanzaron hacia la utilización de componentes subcelulares. En 1968 ALEXANDER & al sugieren que el efecto inmunoterápico de los linfocitos transferidos pasivamente no se debe a sus propiedades citotóxicas, sino a componentes

subcelulares que aumentan en las células linfoides del receptor, la actividad inmunológica antitumoral (ALEXANDER, DELORME, HAMILTON, HALL, 1968)

Un año antes, el mismo ALEXANDER había demostrado que el RNA extraído de carneros inmunizados frente a células tumorales del sarcoma de la rata inducido por benzopireno era efectivo para disminuir la proliferación tumoral y capaz de producir regresiones significativas en esos animales (ALEXANDER & al, 1967).

Esta inmunoterapia puede ser igualmente utilizada en el hombre, bien utilizando un RNA inmune obtenido de órganos linfoides de animales inmunizados con el tumor humano, o sensibilizando in vitro linfocitos normales con las células neoplásicas.

Al lado del RNA se pueden utilizar algunas de las linfoquinas segregadas por los linfocitos y de entre ellas la primera utilizada fue el "factor transfer".

Se trata de una sustancia, ácido inmunoribonucleico, capaz de conferir una inmunidad celular antígeno específica. La administración del factor transfer debe de ser realizada de una forma reiterativa y su gran ventaja radica en que no estimula a los linfocitos B con lo que no existe el problema de la facilitación inmunológica.

Ya hemos mencionado anteriormente al hablar de la inmunoterapia adoptiva como hoy se están empleando las interleuquinas, especialmente la IL-2, sola o asociada a otros inmunomodulares o sustancias que potencien su acción, como los interferones (RANJIT, PARHAR & LALA, 1987; SILAGI, DUTDOWSK, & SCHAEFER; THATCHER, DAZZI & al, 1989)

Con los interferones, alfa, beta y gamma, se han observado respuestas en tumores de mama, tumores cerebrales, linfomas y leucemias. También es efectivo en el Sarcoma de Kaposi. (LOPEZ-BRAN, ROBLEDO & al, 1989).

Diversos ensayos clínicos han demostrado que el interferón, tiene una eficacia semejante a la

DTIC en los casos avanzados de melanoma. La frecuencia de respuestas favorables, incluyendo remisiones completas o parciales obtenidas ha oscilado entre el 12 y el 22%. La respuesta se observa en la regresión de las metástasis y en la prolongación del tiempo de supervivencia.

La inyección directa del interferón sobre las lesiones cutáneas, puede producir una dramática regresión de estas lesiones, pero el proceso maligno en su conjunto no es afectado y las lesiones pueden progresar en otro sentido (CREAGAN, FRYTAK & al, 1989; OSANTO, JANSEN & al, 1989; SERTOLI, BERNENGO & al, 1989)

En la tricoleucemia el interferón es el tratamiento de elección con remisiones superiores al 90% de los pacientes.

Otras linfoquinas como el factor estimulante de colonia granulocítico-macrófago, el factor de necrosis tumoral y los factores de crecimiento se encuentran en fase experimental. Las timosinas u hormonas tímicas son polipéptidos producidos por las células epiteliales del timo.

De entre ellas la fracción 5, la timosina alfa-1, y la 4 ó TP-I, han sido las más estudiadas. Dada su escasa toxicidad han sido ampliamente investigadas en humanos, habiéndose mostrado eficaces para restaurar la inmunidad en ciertas inmunodeficiencias pero siendo su papel en el cáncer discutido. (E.Díaz Rubio, 1987, citado anteriormente.)

## 2. MODELOS CLINICOS DE AUTOSENSIBILIAACION CUTANEA

### 2.1. ERUPCIONES SEGUNDAS O IDES (RÖCKL, 1956)

Un fenómeno de difícil interpretación, es la brusca diseminación de una erupción cutánea eczematosa a toda la piel del cuerpo que coincide con una exacerbación de un foco primario ya existente y que no se debe a un fenómeno de aposición o continuidad. Esta es la concepción de las "ides". RAVAUT las llamó "erupciones segundas" y aunque han sido aplicadas también por DARIER a la tuberculosis (tubérculides) (DARIER, 1896) y por AUDRY a las leucemias (leucémides) (AUDRY, 1902), y por otros autores a algún otro tipo de afección dermatológica, en general su utilización más específica, se refiere a las infecciones microbianas y micósicas, denominándolas según el posible agente productor : levurides (RAVAUT & RABEAU, 1925) estrepto o estafilocócidas (KICHERAT, LANSIEN, DERAUX, 1930), enterocócidas (MONTLAUR, 1949); cócidas (RADJA, 1951); bacterides o micróbides (JADASSONH, 1939); dermatofítides (GUTH, 1933); etc.

La sílaba "ide" señalaría erupciones de naturaleza alérgica, generalmente simétricas y generalizadas, con una morfología variable. Se supone que se forman por el transporte de antígenos vivos o muertos por vía sanguínea o linfática hacia la piel fuertemente sensibilizada.

La patogenia cierta de este fenómeno de diseminación no está enteramente aclarada, pero su conexión con un foco de partida es indiscutible porque con la curación del foco desaparecen las ides.

En la mayoría de los casos toman las "ides" su punto de partida en los eczemas microbianos de las piernas que coinciden con la presencia del complejo varicoso. Otras veces, las micróbides pueden estar en conexión con un foco microbiano interno. RAVAUT, PILLSBURY & LIWINGOOD encuentran dos veces más frecuente el foco en la piel, que en los órganos internos.

Un origen interno parece verosímil cuando no se encuentra sobre la piel ningún proceso primario piógeno, punto de partida, y cuando la extirpación del foco produce la curación

### 2.1.1. CUADRO CLINICO DE LAS MICROBIDES

Otra particularidad importante de las micróbides es su cuadro clínico, que no coincide con el del foco primario y corresponde en esencia a dos tipos.

Tipo I: Máculas eritematoescamosas del tamaño de una moneda, bien limitadas, parecidas a la pitiriasis rosada o a las dermatitis seborreicas. Se localizan principalmente en cara, cuello y sobre todo en el escote.

Tipo II: Son más frecuentes y corresponden en su morfología a los eczemas pápulo-vesiculosos de Brock. La disposición de las pápulo-vesículas es primeramente folicular y más tarde interfolicular.

Pueden agruparse y formar placas más o menos limitadas, redondeadas y sobresalientes. A veces, por el contrario las lesiones no se delimitan y se esparcen difusamente sobre la piel tomando el aspecto de sífilides.

Las placas corresponden a un eczema nummular o a un eczema diseminado en

placas, que denotan una fase de estabilización con mayor resistencia al tratamiento. Además parece ser más frecuente su relación con un foco primario interno. No rara vez el rascado produce lesiones isomórficas.

Además de estas eflorescencias preponderantes hay otras más raras; en ocasiones las pápulas son más urticariformes, otras veces son máculo-pustulosas amicrobianas e incluso purpúricas. Estas últimas se extienden por brazos y piernas y rara vez por todo el cuerpo.

Las eflorescencias pueden ser planas, sin infiltración o tener una infiltración clara simulando un eritema exudativo multiforme. A veces pueden transformarse en nódulos granulomatosos hemorrágicos.

#### **2.1.2. LOCALIZACION DE LAS MICROBIDES**

En cuanto a su localización se pueden distinguir tres apartados :

A) Las micróbides localizadas alrededor de un foco cutáneo.

B) Las micróbides simétricas que tienen predilección por zonas intertriginosas, cara y escote.

B) Micróbides simétricas sin predilección por ninguna zona.

### 2.1.3. HISTOPATOLOGIA DE LAS MICROBIDES

Histopatológicamente se encuentran alteraciones diferentes en una misma lesión : Focos de espongirosis de linfocitos, que pueden observarse subcorneales, mediales o en la parte inferior de la epidermis. Los de localización subcórnea, a menudo, se acompañan de picnosis.

En la mayor parte de los casos se encuentran en las vesículas, polinucleares que corresponden a las lesiones pustulosas. En algún caso hay eosinófilos en dermis y epidermis. Generalmente hay un ligera acantosis y en el corión un infiltrado más o menos intenso de linfocitos y polinucleares.

Todos estos aspectos pueden observarse en una misma lesión, por lo que pueden aparecer imágenes alérgicas (inferiores) y tóxicas (superiores) simultáneamente.

2.2. EXPERIENCIAS CLINICAS DE HOPKINS Y BURKY  
(HOPKINS & BURKY, 1944)

Por lo dicho anteriormente hemos supuesto que las reacciones segundas se producían por la sensibilización de la piel por sustancias circulantes antigénicas o tóxicas elaboradas en un foco infeccioso distante, pero estos autores piensan en la posibilidad de una sensibilización de la piel por un antígeno o toxina elaborada in situ, lo cual podría explicar ciertos eczemas.

Basándose en experiencias del propio BURKY, en 1934 trabajando con conejos, que más tarde comentaremos, y en otras experiencias, como las de LANDSTEINER & JACOBS, en las que indican que los animales pueden hacerse sensibles a proteínas de su propio cuerpo, (LANDSTEINER & JACOBS, 1936); HOPKINS Y BURKY, esbozan una teoría para explicar, en el hombre, ciertas dermatosis

de causa desconocida. Les parece a ellos posible que una toxina estafilocócica podía ser liberada en la piel por el crecimiento indolente de organismos que forman toxinas no muy activas pero que se combinan con la queratina, produciéndose una sensibilización local y la aparición de una dermatitis.

Si esto es cierto, los pacientes deberían ser reactivos a la toxina estafilocócica y también a la queratina. Debería también ser posible recoger estafilococos de las lesiones cutáneas.

Los autores han estudiado y tratado más de 50 pacientes con dermatitis de las manos mediante toxina estafilocócica. En 40 de ellos pudo demostrarse la presencia de estafilococos aureus. En 2 se demostró además la presencia de E.albus y en 4 se demostraron también, estreptococos beta-hemolíticos; 15 de las 40 cepas de estafilococos aislados, formaban exotoxinas, 7 pacientes fueron probados con extratos de caspa ( queratina ) y 6 dieron positivo, 20 pacientes fueron tratados con toxina estafilocócica de la

siguiente manera : Las inyecciones se administraban dos veces por semana durante un mínimo de 3 meses. Se comenzaba con diluciones de I/I0.000 ó I/I000.

Se elevaba la dosis gradualmente hasta que había una exacerbación focal o hasta que la reacción local en el sitio de la inyección era de 4 por 4 cm. La curación se consiguió en 10 pacientes en un período de semanas a un año.

Los autores concluyen diciendo que la evidencia clínica y experimental indica que ciertos eczemas intratables de las manos y probablemente en otras partes del cuerpo son debidos a una hipersensibilidad local a la queratina del propio paciente inducida por la liberación de toxinas estafilocócicas, unido al trauma en el sitio de la lesión. Ellos proponen para este tipo de manifestación cutánea el término de "Kerátide".

2.3. EXPERIENCIAS DE RÖCKL EN RELACION CON LA PATOGENIA DE LAS MICROBIDES

Se ha supuesto que las micróbides se producen por diseminación hematógica de las bacterias y sus toxinas originadas en un foco primitivo externo o interno. El hecho de no encontrar histológicamente una afectación primitiva de los vasos y sobre todo el hecho de que nunca se hayan podido demostrar bacterias en las pápulo-vesículas ni en las lesiones pustulosas, hace esta hipótesis muy poco probable.

En cuanto a las toxinas tampoco su papel es muy claro pues la inyección de las mismas nunca produce reacción focal ni una desensibilización. Es muy probable que sean autoantígenos formados en el foco primitivo y reabsorbidos bruscamente, que pasan a la sangre, y que encontrando a la piel ya sensibilizada específicamente determinan una reacción antígeno-anticuerpo.

En este sentido debería pasar un cierto tiempo hasta que todo el tegumento esté sensibilizado y deberían sobrevenir determinados factores,

todavía en su mayoría desconocidos, que permitiesen una reabsorción masiva súbita de autoantígenos en el foco eczematoso.

Estas consideraciones hipotéticas encuentran, en cierto sentido, una confirmación clínica. Así, las micróbides brotan, en general, después de un cierto tiempo de la existencia de un foco primario y generalmente de una manera repentina cuando el foco primario ha experimentado, a través de diferentes clases de estímulos, una exacerbación.

La anamnesis de la mayoría de los pacientes con diseminaciones exantemáticas muestra que la aparición de los síntomas está precedida bien de una exacerbación local del foco primario o bien del uso local de medicamentos o medidas de tipo físico (radioterapia).

Naturalmente que cuando han precedido medidas locales medicamentosas debe descartarse una reacción alérgica exógena frente a los medicamentos usados, mediante pruebas de contacto.

No hay duda de que por el influjo de las bacterias sobre las proteínas celulares, se forman productos y sustancias metabólicas que no tenían existencia primariamente. Podría suceder en la piel, un hecho parecido al que SARRE Y ROTHER aceptaron para el riñón; es decir, que exista una desnaturalización de las albúminas epidérmicas por acción de las bacterias o sus productos, haciéndose autoantigénicas tal como demostró UWAZUMIS en los animales.

Es decir que por medio de las bacterias se lleguen a formar autoanticuerpos contra las albuminas epidérmicas. Esta posibilidad parece lógica si tenemos en cuenta el hecho de que como los autoantígenos se forman después de un cierto tiempo, el foco eczematoso primitivo debe de ser crónico.

La posible existencia de un autoantígeno en el foco eczematoso la investigaron RÖCKL & al, haciendo pruebas epicutáneas, eliminando previamente la capa córnea, en el propio paciente y en el control sano, utilizando extractos de piel sana y detritus del foco

eczematoso, eliminando previamente las bacterias sin utilizar calor y haciendo también una concentración previa del mismo.

Para potenciar "in vitro" la formación de autoantígenos incubaron los extractos de piel sana durante 2 a 4 días a 37<sup>0</sup>, añadiéndoles dextrosa, glucosamina, suero y extractos epidérmicos.

Los resultados fueron los siguientes : Con los detritus eczemáticos probados en los propios pacientes se lograron sobre piel sin capa córnea, reacciones eczematosas. De 70 pacientes el 66% dieron resultado positivo. Las pruebas con raspaduras de piel sana dieron resultado negativo.

Simultáneamente las pruebas en personas sanas control con los detritus eczematosos sólo dieron un 6% de reacciones positivas. Estos resultados contrastan con las experiencias de STORK que con estafilococos aureus encontró un 80% de positividades en controles sanos y un 57% utilizando filtrados de caldos de cultivo.

Todo ello hace suponer que las reacciones eczematosas con detritus eczematosos se realizan a través de la formación de un autoantígeno más o menos específico. Este efecto se aumenta por medio de la incubación de los detritus a 37<sup>0</sup> durante pocos días.

La hipótesis de RÖCKL es la siguiente : Bajo el influjo de las bacterias sobre las albúminas celulares, escleroproteínas, aminoácidos, etc., se forman autoantígenos complejos en el foco eczematoso, específicos contra la epidermis. La reabsorción latente de pequeñas cantidades antigénicas conduce a la producción continuada de anticuerpos específicos epidérmicos que humoralmente o por linfocitos se fijan en la epidermis sésilmente.

Mientras el foco primario permanece apagado, solamente se reabsorben pequeñas cantidades antigénicas y no se produce la reacción antígeno-anticuerpo en la piel porque las pequeñas cantidades de antígeno son eliminadas por los anticuerpos circulantes. Pero cuando se produce una irritación del foco primario hay una gran reabsorción de antígenos y entonces se

dá la posibilidad de que estos reaccionen con los anticuerpos existentes en la piel sana produciendo las manifestaciones eczematosas.  
(FIGURA- I)

EPIDERMIS

FOCO PRIMARIO

FOCO SECUNDARIO

Bacterias + epidermis

+ anticuerpos sesiles

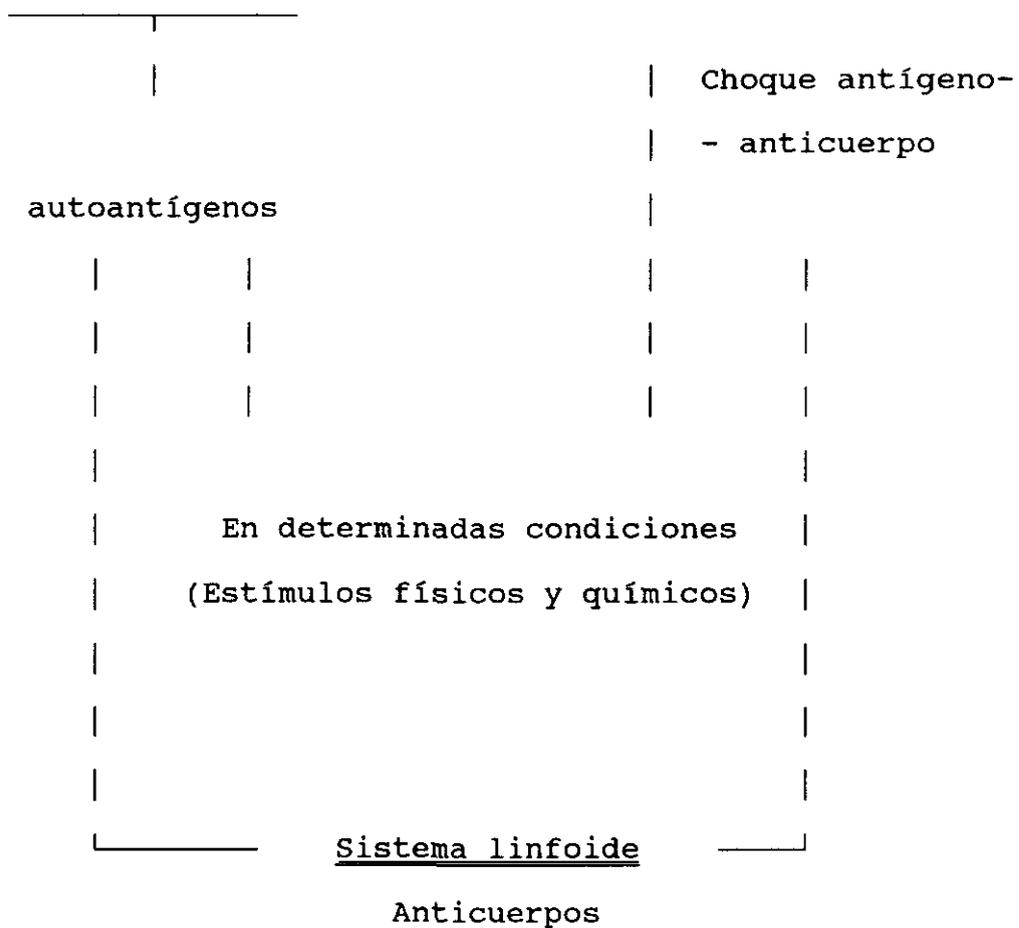


FIGURA - I - HIPOTESIS DE RÖCKL SOBRE  
AUTOSENSIBILIZACION CUTANEA

### 3. MODELOS EXPERIMENTALES DE AUTOSENSIBILIZACION

#### 3.1. ENDOFTALMITIS FACO-ANAFILACTICA EXPERIMENTAL EN CONEJOS (BURKY, 1933, 1934).

##### 3.1.1. INTRODUCCION

En 1922 VERHOEFF Y LEMOINE sugirieron que un cierto tipo de inflamación intraocular postoperatoria consecutiva a la extracción de cataratas podía ser debida a una reacción entre partes de cristalino retenidas después de la intervención y una hipersensibilidad al tejido ocular del cristalino. Sin embargo, no pudieron probarlo en la experimentación animal en conejos.

Según BURKY hasta el año 34 nadie había podido desencadenar en el conejo una reacción alérgica al tejido del cristalino, aunque los pacientes señalados anteriormente, presentaban una prueba cutánea positiva a extractos de cristalino.

En un trabajo anterior BURKY, demostró que conejos a los que se les administran inyecciones intracutáneas de toxina estafilocócica desarrollan no solamente

una antitoxina contra la toxina, sino también, un estado hipersensible al caldo de vaca en el cual se produce la toxina. Normalmente dicho caldo de vaca no produce tal efecto antigénico.

Entonces se le ocurre a BURKY que dicha toxina estafilocócica podía tener tal afecto "activante" del tejido del cristalino. En este sentido ideó el siguiente experimento.

### 3.1.2. MATERIAL Y METODOS

Los cristalinos de vaca fueron introducidos en hidróxido de aluminio 100 normal, conteniendo 0,5% de cresol. Para cada cristalino se emplearon 20 cc de esta solución. Después se agitó la solución durante 12 horas con vidrio roto con lo cual se formó una emulsión, que fue centrifugada y filtrada a través de un filtro V de Berkefeld.

Los sólidos totales fueron determinados por deshidratación a  $104^{\circ}$  C. La solución, se ajustó para que contuviese

un 2% de proteínas y 0,85% de Cl NA, añadiendo agua destilada estéril y solución de cloruro sódico al 8,5%. Se prepararon extractos de cristalino de otras especies de una manera similar.

Tales soluciones de cristalino no fueron tóxicas cuando se inyectaron intravenosamente en conejos, en cantidades tan grandes como 10 cc. Las inyecciones intravenosas repetidas produjeron precipitinas contra las soluciones de cristalino de todas las especies. Inyectadas intradérmicamente no produjeron ni reacciones cutáneas, ni precipitinas en humanos o conejos.

#### **3.1.2.a. Toxinas en Caldo de Cristalino**

Ojos de vaca frescos, después de la eliminación de todo el tejido extraocular se introdujeron en agua hirviendo durante 30 segundos. Mediante unas tijeras estériles se les

extrajo el cristalino, introduciendo a continuación cada cristalino en un tubo conteniendo 30 cc de caldo de cultivo. Se prepararon 50 tubos y se incubaron durante una semana con una temperatura que variaba desde la de la habitación hasta 37<sup>0</sup> C.

La mitad de los tubos se contaminaron y fueron eliminados, inoculando el resto, con una cepa de estafilococo aureus, formadora de toxina (Ha). Después de 10 días de incubación a 37<sup>0</sup> C el contenido de los tubos se juntó, se les añadió cresol al 0,5%, filtrando la solución resultante a través de un filtro Berkefeld V.

Los estafilococos habían ido desintegrando lentamente los cristalinios de forma que estos, relativamente indemnes inicialmente llegaron a ser

una masa amorfa de sedimento a los 10 días de incubación. El filtrado era capaz de matar conejos adultos en 24 horas o menos, después de la inyección intravenosa de 0,1cc/kilo de peso corporal. Este filtrado precipitaba con suero antiestafilocócico en dilución hasta del 1/16 y con suero conteniendo precipitinas contra el cristalino hasta una dilución del 1/50.000.

Se prepararon de la misma manera filtrados de cepas de estafilococo F<sub>5</sub> y D<sub>1</sub> . (no formadoras de toxina)

Estos filtrados no eran tóxicos para los conejos.

**3.1.2.b. Filtrados Estafilocócicos,  
tóxicos y no tóxicos.**

Cepas Ha, F<sub>3</sub> y D<sub>1</sub> se incubaron en caldo de cultivo, sin cristalinidad y se procedió de la misma manera., Los cultivos y filtrados de la cepa Ha mataron a conejos en 24 horas o menos después de la inyección intravenosa de pequeñas cantidades (0,1 cc/Kg de peso corporal). La muerte es aparentemente debida a la acción de una verdadera exotoxina.

Cepas similares han matado a humanos después de la inyección de pequeñas cantidades de cultivo y han causado trastornos gastrointestinales graves después de la ingestión oral.

Los cultivos totales de cepas Fs mataron conejos con la formación de abscesos después de 24 horas o de 48 horas si la inyección era intravenosa. Sin embargo los filtrados no tuvieron ninguna actividad patogénica. La cepa D<sub>1</sub> no tubo ninguna acción patogénica sobre los conejos.

#### 3.1.2.c. **Experiencias en conejos**

Nueve conejos se prepararon para inyección intracutánea mediante depilación con sulfuro de bario. A intervalos de una semana, cada conejo recibió en una área cutánea, 0,1cc de toxina-caldo cristalino, y en otra área 0,1cc de extracto de cristalino.

Las reacciones que se produjeron se midieron en el grado de eritema e hinchazón y

necrosis en centímetros. A dos conejos se les inyectó intravenosamente extractos de cristalino (5 cc) cada semana.

Precediendo a la primera inyección y a intervalos irregulares, se sangró a los conejos a través de las venas del margen de las orejas y se guardó la sangre para la realización de los test de precipitinas. Los test se realizaron bien inmediatamente después de la recogida del suero, o bien, los sueros fueron conservados con cloroformo para uso posterior. Diluciones de los extractos de cristalino tan altas como al 1/100.000 fueron colocadas sobre el suero y la reacción en anillo se leyó después de una hora. Los tubos se agitaron posteriormente y se incubaron a 37° C durante una hora y al día siguiente se leyeron los resultados finales.

### 3.1.3. RESULTADOS

#### 3.1.3.a. **Reacciones cutáneas a la toxina-caldo de cristalino**

Este filtrado produjo reacciones como las producidas por la toxina en caldo de cultivo. La primera inyección fue seguida de eritema e hinchazón, 24 a 48 horas después de la misma. La necrosis ocurrió en la mayoría de los animales y las costras necróticas duraron alrededor de tres semanas.

Las inyecciones posteriores causaron reacciones menores hasta que se alcanzó un mínimo (1 x 1 cm a las 24 horas). Posteriormente a este estado de relativa no reactividad, nuevas inyecciones causaron un aumento considerable en el tamaño de la reacción.

El tiempo de reacción se acortó a cuatro horas y la hinchazón y el eritema persistieron durante 48 horas. No hubo necrosis o fué mínima.

**3.1.3.b. Reacciones cutáneas a extractos de cristalino**

La inyección inicial de esta sustancia en conejos normales causó una hinchazón temporal y poco o ningún eritema. Las reacciones nunca excedieron los 2 cm y desaparecieron en 24 horas. Las inyecciones repetidas en animales normales o en conejos inyectados intravenosamente con extractos de cristalino, produjeron reacciones similares o menores.

En el grupo de conejos inyectados con toxina en caldo de cristalino y extractos de cristalino, la última sustancia

causó reacciones cutáneas normales hasta que ocurrió un aumento súbito en la reactividad de la piel, que ya hemos descrito. En este momento, las reacciones causadas por la toxina caldo de cristalino y los extractos de cristalino no se podían distinguir, la una de la otra.

Se sacó la conclusión de que ambas reacciones eran debidas a los extractos de cristalino más que a la toxina. Los conejos fueron entonces probados con extractos de cristalino humano, swine y de conejo y se encontró que eran igualmente reactivos.

La primera aparición y la duración de la sensibilidad a los extractos de cristalino variaba en los diferentes animales pero la mayoría alcanzó la máxima reactividad después de la cuarta inyección

y la sensibilidad persistió durante varias inyecciones más. Un conejo en este grupo no reaccionó hasta después de la sexta inyección. Dos conejos, sensibles después de la tercera o cuarta inyección, se volvieron relativamente no reactivos después de la quinta inyección.

#### 3.1.3.c. **Reacciones Oculares**

Para determinar si la sensibilidad al cristalino era amplia y no específica, se ideó el siguiente experimento : Se hicieron 3 grupos : Un primer grupo de conejos a los que se les había inyectado intradérmicamente extractos de cristalino y la toxina-caldo de cristalino; un segundo grupo de conejos a los que el extracto de cristalino se había

inyectado intravenosamente y un tercer grupo control de 4 conejos normales. En los 3 grupos, previa anestesia con cocaína, se inyectó una aguja en la cámara anterior del ojo y se extrajeron 0,2 cc de humor acuoso. A continuación la aguja se inyectó en el cristalino y el humor acuoso fue inyectado allí. Se obtuvieron los siguientes resultados :

**\* Conejos normales :**

a) Los conejos 12 y 15 mostraron una respuesta traumática a la aguja. Había inflamación conjuntival y pericorneal, exudado plasmático en la cámara anterior y catarata traumática. Estos ojos, excepto por las opacidades del cristalino recuperaron la normalidad en 3 a 4 días. El examen histológico dió resultados negativos.

b) Los conejos 13 y 14 se infectaron secundariamente. Además de los cambios mencionados había una descarga purulenta de la conjuntiva. Estos ojos, excepto por las opacidades del cristalino y la inflamación externa, se normalizaron en siete días. El estudio histológico del ojo del conejo 14 no demostró nada notable. El conejo 13 mostró un cuadro típico de endoftalmitis faco-anafiláctica. Se pudo aislar un estafilococo aureus.

**\* Conejos insensibles al cristalino y con formación de precipitinas**

Este grupo incluye los conejos 10 y 11, en los cuales se había inyectado intravenosamente extracto de cristalino, y el conejo 9 en el que se había

inyectado intradérmicamente toxina-caldo de cristalino y extracto de cristalino, sin observarse reacción cutánea en el momento de la aplicación de la aguja. Este grupo se comportó como el grupo de control normal, excepto en un caso en el que las opacidades del cristalino desaparecieron más rápidamente que en los controles normales. En el momento de la aplicación de la aguja, el título de precipitinas no sobrepasaba el 1/5000.

**\* Conejos sensibles al cristalino y con precipitinas**

La inyección de la aguja en el cristalino causó un tipo de reacción hipersensitiva semejante a la que ocurrió después de la inyección de suero de vaca en el ojo de un

conejo sensible a este suero. A las 24 horas había una marcada inflamación conjuntival y edema. Las córneas estaban opacas y en algunos casos una iritis oscureció el estado del cristalino. Después de varios días la córnea fué invadida por anillos vasculares. Los conejos 5, 6 y 7 tenían bandas necróticas de 2 mm de ancho en el limbo. En el conejo 6 la necrosis fué tan marcada que parecía que el ojo se había roto. Las reacciones del resto de los ojos persistieron durante 7 días o más y las inyecciones intracutáneas de toxina-caldo de cristalino y extracto de cristalino causaron un aumento en los síntomas oculares si el animal todavía era reactivo cutáneamente a los extractos de cristalino.

infiltrado de monocitos y macrófagos. En los animales control, no infectados la infiltración fué insignificante. A las dos semanas el cuadro era similar. Es conveniente señalar que aunque había esta diferencia entre los controles normales y los conejos alérgicos el cuadro de estos tampoco era similar al que se ve en la endoftalmitis facoanafiláctica.

#### 3.1.3.d. **Precipitinas**

Todos los sueros de los animales no tenían precipitinas antes del experimento. El título de precipitinas en el grupo al que se le administró inyecciones intravenosas no pasaba de 1/5000 después de la administración de 20 cc de extracto de cristalino. Los animales sensibles tenían unos

títulos de precipitinas de al menos 1/50.000 después de la cuarta inyección y de la administración de no más de 1 cc de extracto de cristalino.

El autor no cree que el gran título de precipitinas sea el responsable de las reacciones oculares de hipersensibilidad, pero si cree que la actividad antigénica de los extractos de cristalino había sido aumentada por la acción de la toxina. Normalmente, la cantidad de extractos de cristalino usados en el grupo C no produce efectos demostrables. Por ejemplo : los extractos de cristalino inyectados intradérmicamente, solos o mezclados con suero de vaca en cuatro conejos no produjeron precipitinas o sensibilidad al cristalino después de 8 inyecciones.

El suero de vaca, sin embargo, produjo una típica reacción tipo Arthus y precipitinas contra el suero de vaca.

Estos resultados muestran que la sensibilidad al cristalino se desarrolla combinándolo con toxina estafilocócica. El siguiente experimento fué ideado para contestar algunas de estas cuestiones : Los conejos 16, 17 y 18 fueron inyectados intradérmicamente, en un área empleando una mezcla de extracto de cristalino al 2% y toxina crecida en caldo de vaca y en otra área diferente con extracto de cristalino. A los conejos 19, 20 y 21 se les inyectó en una área extractos de cristalino al 2% y en otra área toxina-caldo de vaca.

Una sensibilidad cutánea y ocular al cristalino se desarrolló en un conejo de cada

grupo (17 y 20). El cuadro histológico fué similar en los ojos de estos dos conejos y el título de precipitinas osciló entre 1/5000 y 1/50.000. Los otros cuatro conejos no reaccionaron cutáneamente, y las reacciones oculares fueron dudosas, sin observar el cuadro de la endoftalmitis facoanafiláctica. En dos conejos no había precipitinas y otros dos tenían menos de 1/5000.

Estos resultados demuestran que la inyección coincidente de extractos de cristalino y toxina en caldo de vaca puede producir una sensibilidad al cristalino. Sin embargo, este método no es tan efectivo como el descrito primeramente. Los resultados sugieren que la sensibilidad se desarrolla al cristalino inalterado más que a una

proteína derivada del cristalino y producida por la actividad metabólica del estafilococo. También refuerza la sugerencia previa de que la toxina altera o acrecienta el efecto antigénico del cristalino.

A los conejos 22,23 y 24 se les administraron, a la vez, inyecciones de filtrados de caldos de cultivos no tóxicos (cepas estafilocócicas Fs) y extractos de cristalino. A los conejos 25, 26 y 27, se les administró inyecciones de filtrados de caldos de cristalino no tóxicos (cepas D<sub>1</sub>) y extractos de cristalino. Las inyecciones repetidas de estos filtrados produjeron reacciones cutáneas dudosas en los conejos 22 y 27. La insercción de la aguja solamente produjo una reacción

traumática y el estudio histológico no demostró ninguna evidencia de una endoftalmitis facoanafiláctica. No aparecieron precipitinas contra el cristalino en ninguno de los grupos.

Estos resultados sugieren que los estafilococos formadores de toxina son las únicas cepas de esta especie que pueden producir una sensibilidad al cristalino. También demuestran que la inyección intracutánea de cristalino sin toxina no produce precipitinas.

Se mencionó anteriormente en este trabajo que los filtrados de caldo de cristalino F<sub>3</sub> y D<sub>1</sub> no fueron tóxicos para el conejo. Estas dos cepas, sin embargo, redujeron los cristalinios a una masa amorfa similar a la producida por la cepa Ha.

Estos resultados indican una destrucción del cristalino con formación de productos por descomposición. Si tales productos de descomposición se forman, no teniendo ningún efecto letal o sensibilizante, parecería, por tanto, que la toxicidad y la sensibilización del filtrado ha es específica, inherente solamente a las cepas formadoras de toxinas.

Los cristalinos de los conejos que desarrollaron una reacción ocular específica fueron agujereados cuando la sensibilidad cutánea estaba en su cenit. La reacción ocular fué inmediata y severa.

En un intento de duplicar la aparición retardada, los ojos de los conejos 28 a 33 fueron agujereados el día que se iniciaron las inyecciones

intracutáneas de toxina-caldo de vaca y extracto de cristalino. El agujereamiento causó una reacción "normal" los primeros días, pero estos ojos no volvieron a la normalidad. Las reacciones oculares aumentaron poco a poco y después de cada inyección intracutánea había un aumento. El cuadro clínico en estos ojos se parecía mucho al que se ve en los humanos.

Las reacciones cutáneas a los extractos de cristalino sólo, fueron positivas después de la tercera inyección y el título de precipitinas fué superior a 1/5000. Los ojos fueron extirpados después de la tercera inyección intracutánea y el estudio histológico confirmó el diagnóstico clínico de endoftalmitis facoanafiláctica.

#### 3.1.4. COMENTARIO

Estos resultados demuestran que la hipersensibilidad al cristalino puede ser producida experimentalmente en conejos por la acción intermediaria de toxina estafilócica y que cuando los cristalinos de tales conejos sensibles al mismo son agujereados, aparece una endoftalmitis faco-anafiláctica. Los resultados sugieren, pero no demuestran, como se desarrolla el cuadro clínico en humanos.

Las acciones patogénicas de la toxina estafilocócica en el cuerpo humano y en el conejo son tan semejantes en otros aspectos que parece que podemos afirmar que la sensibilidad a los cristalinos, por lo menos en algunos ejemplos, podía iniciarse por la acción de la toxina desde un foco de infección o por la infección del ojo por bacterias formadoras de toxina en el momento en que los cristalinos son absorbidos después de la intervención. Tal mecanismo podía ser probado en conejos, pero tal experimento requeriría un número muy grande de animales a causa

del gran número de variables inherentes a tal experimento. Probar tal mecanismo de endoftalmitis facoanafiláctica en humanos parece imposible en la hora presente.

Estos resultados muestran claramente que los conejos pueden ser hechos alérgicos y desarrollar precipitinas al cristalino. Este tejido, sin embargo, es específico de órgano y tiene una actividad antigénica que es más grande que la de otros tejidos.

### 3.2. REACCIONES CUTANEAS A LA TOXINA-CALDO DE MUSCULO (BURKY, 1934)

#### 3.2.1. MATERIAL Y METODOS.

Para evitar la complicación que supone la utilización de tejido específico de órgano, señalada anteriormente, se usó músculo de conejo pues no contiene ninguna fracción específica de órgano. El procedimiento fué el mismo; las reacciones cutáneas empleando toxina-caldo de músculo fueron semejantes a las citadas con el cristalino.

### 3.2.2. RESULTADOS Y COMENTARIO.

Estos animales presentaron además otras curiosas reacciones que sugerían que el trauma físico "liberaba" de la piel o de la musculatura vecina sustancias a las cuales los conejillos eran reactivos.

Por ejemplo, cada depilación causó una dermatitis grave que no ocurría en los animales control. El pellizcamiento de la piel con una hemostato produjo un área de eritema e hinchazón que fué idéntica a la producida por la inyección de caldo de músculo.

Tales reacciones no se produjeron en conejos control. Estos resultados indican que algunos conejos pueden hacerse sensibles a sustancias derivadas de sus propios tejidos y que no son específicas de órgano.

Todo ello sugiere que la reactividad de estos animales al trauma físico ha sido alterada y que las reacciones al trauma son debidas a la liberación de sustancias de los propios tejidos del animal a las cuales el animal ha sido previamente sensibilizado.

El autor sugiere que un mecanismo como éste podría ponerse en juego en algunas enfermedades. Una infección de un tejido con estafilococo o posiblemente con otros microorganismos sensibiliza al individuo a algún elemento del tejido infectado.

Más tarde una reinfección u otro trauma del foco libera la sustancia sensibilizante que causó la inflamación ocular.

Debería señalarse que los conejos sensibles al músculo propio no reaccionan positivamente cuando se les prueba con toxina en caldo de vaca y por eso podría pensarse que el estafilococo no juega ningún papel.

En este momento no está claro porqué la toxina estafilocócica altera la antigenicidad de sustancias inertes ordinarias. Aunque parece por la literatura que esta propiedad pueden tenerla también otras toxinas.

#### 4. PAPEL DE LOS HAPTENOS Y CARRIERS EN LA ALERGIA RETARDADA (SALVIN, 1969)

El trabajo clásico de LANDSTEINER de 1954 demostró que la porción hapténica del conjugado hapteno-proteína inducía anticuerpos contra el mismo. De esta manera la especificidad de los anticuerpos circulantes parecía orientada hacia el hapteno aunque la porción carrier de la

molécula era importante en la inducción de la respuesta inmune.

Estudios posteriores indicaron que la especificidad de la hipersensibilidad retardada era diferente de la de los anticuerpos circulantes. Conejillos de Indias que habían sido inmunizados con conjugados hapteno-proteína desarrollaron una hipersensibilidad retardada al carrier proteico en ausencia de anticuerpos detectables contra dicho carrier, aunque posteriormente pudieron ser demostrados anticuerpos contra el grupo hapténico.

En ningún momento pudo ser demostrada una sensibilidad retardada frente al grupo hapténico. Por ejemplo cuando se sensibilizaron conejillos en las patas con 15-microgrs de p-azobenzoato-albúmina de huevo de gallina (paba-Hea) en adyuvante de Freund sin bacilos tuberculosos y 6 días más tarde se probaron en la piel tanto con conjugados homólogos, carrier-homólogos o haptenos homólogos sobre un carrier heterólogo, se pudo demostrar solamente una sensibilidad retardada cuando el agente que se probaba contenía el carrier homólogo, en este caso el Hea.

La inyección intradérmica de Paba sobre un carrier heterólogo sin sensibilidad cruzada, tal como la gamma-globulina de BUCY (BGG) no produjo una reacción retardada. En este momento no pudieron ser detectados anticuerpos circulantes, ni al hapteno, ni al carrier, ni al conjugado completo.

Cuando los conejillos así sensibilizados fueron similarmente probados sobre su piel 14 a 21 días después de la sensibilización, otra vez la sensibilización retardada se desarrolló contra el carrier proteico. En este momento, sin embargo, se pudieron demostrar anticuerpos circulantes al hapteno (Paba).

En este sentido cuando se inyectaron en animales sensibilizados, compuestos que contenían el hapteno homólogo (Paba) sobre un carrier homólogo o heterólogo se apreció una reacción de Arthus.

La conclusión que se obtuvo es que la especificidad de la reacción retardada era diferente de la de los anticuerpos circulantes puesto que la especificidad de la hipersensibilidad retardada estaba

dirigida hacia una parte amplia de la molécula antigénica, principalmente el carrier, mientras que la especificidad de los anticuerpos circulantes y las reacciones de Arthus e inmediatas estaban orientadas hacia los haptenos o partes pequeñas de la molécula antigénica.

Una similar especificidad a la sensibilidad retardada se ha demostrado en las reacciones cutáneas inducidas por haptenos de contacto. Solamente aquellas sustancias simples que forman derivados covalentes con las proteínas in vivo son efectivos. Como tales sustancias sensibilizantes tienden a reaccionar indiscriminadamente con la mayoría de las proteínas, deben ser usadas a bajas concentraciones para desencadenar respuestas cutáneas, evitando la aparición de inflamaciones no específicas.

Varios conejillos fueron sensibilizados al hapteno, dinitrofluorobenceno (DFB) por inyección de 50 microgramos del hapteno en adyuvante incompleto de Freund en las patas.

Cuando, tales animales fueron examinados 6 días después de la sensibilización, se pudo demostrar una sensibilidad de contacto después de la aplicación percutánea del químico específico.

Aunque la proteína del huésped parece una parte esencial de la molécula antigénica, la especificidad o reactividad cruzada entre los diferentes inductores varía según los tipos de haptenos de contacto. Una sensibilidad de contacto no pudo ser demostrada con conjugados de dinitrofenil compuestos de proteínas heterólogas carrier tales como albúmina de huevo de gallina, gammaglobulina de buey o albúmina humana.

A los 14 días, sin embargo, aunque se podía demostrar todavía una sensibilidad de contacto pintando la piel con DFB, se podían demostrar anticuerpos circulantes con un antígeno compuesto del dinitrofenil conjugado a una gran variedad de carriers proteicos heterólogos. De esta manera, la especificidad de contacto parece orientada hacia el grupo dinitrofenil conjugado a una proteína somática del huésped animal mientras que en los

anticuerpos circulantes o en una reacción de tipo inmediato por el hapteno específico conjugado a gran variedad de carriers proteicos, la especificidad está dirigida hacia el hapteno.

Varios animales fueron sensibilizados en las patas con el conjugado de dinitrofenil-albúmina de huevo de gallina (DNP-Hea) en adyuvante incompleto de Freund. Cuando los animales fueron examinados a los 6 días para saber sus respuestas de contacto no pudieron producirse reacciones cutáneas a DNP sólo pero se pudieron demostrar reacciones retardadas cuando se emplearon conjugados homólogos (DNP-Hea) intradérmicamente.

En este caso se desarrollaron típicas reacciones retardadas. En este momento no pudieron detectarse anticuerpos al grupo dinitrofenil por hemaglutinación, anafilaxia local o anafilaxia sistémica. Cuando tales animales fueron examinados a los 14 días todavía podía demostrarse una hipersensibilidad retardada. En este momento podía también demostrarse una reacción Arthus y anticuerpos

circulantes al grupo hapténico conjugado a numerosos carriers proteicos heterólogos.

De esta manera no se pudo demostrar una sensibilidad de contacto al DNP-Hea a causa de que el hapteno dinitrofenil había sido conjugado a la albúmina de huevo de gallina y no a una proteína somática. Cuando el dinitrofenil se conjugó en el tubo de ensayo a una proteína somática tal como piel de conejillo solubilizada y el conjugado fué inyectado en la pata un conejillo se pudo demostrar una sensibilidad de contacto a los 6 días de la aplicación percutánea del hapteno sólo.

Además se pudo también demostrar una hipersensibilidad retardada en este momento al conjugado homólogo (dinitrofenil-piel de conejillo). A los 14 días, la sensibilidad de contacto todavía persistía y podían también demostrarse anticuerpos al grupo dinitrofenil.

Estos experimentos sugieren que las especificidades de contacto y retardada están orientadas hacia el carrier proteico.

En un caso : El de la sensibilidad retardada, el carrier proteico es parte de la molécula inmunizante que ha sido inyectada intradérmicamente. En el otro caso : El de la sensibilidad de contacto, el carrier se combina con el hapteno de contacto después de que éste ha sido aplicado bien percutánea o intracutáneamente. En ambos casos, cuanto más tarde, aparecen los anticuerpos circulantes más orientadas están hacia el hapteno, y no hacia el carrier, la especificidad de los anticuerpos y de las reacciones asociadas.

Las reacciones retardadas sistémicas siguen los patrones de especificidad demostrados en las reacciones intracutáneas o corneales. Los conejillos sensibilizados a un conjugado desarrollan fiebre cuando son probados con el carrier homólogo o el conjugado durante la fase de reactividad retardada.

Cuando más tarde aparecen los anticuerpos circulantes, mayormente la introducción del antígeno intraperitonealmente conduce a los signos característicos del shock sistémico retardado.

Además, la desensibilización de la sensibilidad retardada a un conjugado ocurre solamente cuando el conjugado o el carrier proteico son inyectados. Sin embargo, la desensibilización del tipo Arthus puede ser inducida, tanto con el conjugado homólogo, como con el hapteno.

Posteriormente se encontró que el tipo de unión entre el hapteno y el carrier proteico influye en la especificidad de las reacciones retardadas. De esta manera, cuando varios conejillos fueron sensibilizados con uno o varios conjugados conteniendo el mismo hapteno y carrier pero teniendo diferentes sitios de unión del hapteno no se pudo demostrar ninguna sensibilidad cruzada o muy poca por los test cutáneos.

La especificidad de la sensibilidad retardada es por lo tanto de tal naturaleza que el tipo de unión entre un hapteno y su molécula proteica es determinativo.

Se encontró simultáneamente que los anticuerpos que posteriormente aparecen están influidos también por

el tipo de unión. Cuando la especificidad de la producción de anticuerpos se examinó por gel difusión, la especificidad del anticuerpo se determinó no sólo por el simple hapteno sino también por una porción de la unión a la cual el hapteno estaba ligado.

La conclusión que puede obtenerse de estos experimentos es que existe una diferencia entre la especificidad de las reacciones retardadas y la de los anticuerpos circulantes pero esta diferencia no sólo está determinada por el hapteno y el carrier.

Aunque una reacción se orienta hacia el carrier y la otra hacia el hapteno, ambas, sin embargo se influyen por el tipo de unión. Estudios posteriores sobre la especificidad de las reacciones retardadas se realizaron con animales sensibilizados a albúmina de conejillo conjugada con orto-nitrobenceneazo, metanitrobenceneazo, para-nitrobenceneazo o benceneazo.

La extensión de la reacción cruzada entre los diferentes compuestos fué apreciable. En este sentido la posición del grupo químico en el anillo de benceno influyó en el tamaño de la reacción cutánea resultante y consecuentemente en la especificidad de la reacción. Por lo tanto, no sólo la unión sino también el hapteno pueden influir la especificidad de la reacción retardada o de contacto.

La especificidad al carrier es también importante en la inducción secundaria del anticuerpo. Conejillos sensibilizados a un conjugado específico mostraron una respuesta secundaria más fuerte al hapteno cuando la prueba contenía el hapteno específico unido a la proteína homóloga o a otra con reacción cruzada, más que cuando se trataba de una proteína heteróloga sin reacción cruzada. Además, la especificidad del carrier se ha visto asociada con la inducción de la tolerancia inmunológica en conejillos adultos.

La importancia de la especificidad al carrier proteico ha sido ilustrada en estudios in vitro de alergia retardada.

Recientemente los estudios con antígenos sintéticos han demostrado, todavía más, una especificidad diferente de la sensibilidad retardada y la inmediata.

Las moléculas de bajo peso molecular pueden servir como inductores de respuestas inmunes y como desencadenantes de hipersensibilidad retardada. Aunque los haptenos conjugados a moléculas proteicas pequeñas producen hipersensibilidad retardada contra el carrier, en raros casos, esta sensibilidad retardada se hace contra el hapteno.

La conclusión que puede sacarse de todo este trabajo es que la inducción de una respuesta retardada requiere un diferente tipo de molécula de la que se requiere para la producción de una respuesta inmediata.

## 5. ELECCION DE UN MODELO ANIMAL Y TUMORAL EXPERIMENTAL.

### 5.1. INTRODUCCION

Los animales de laboratorio son un instrumento de trabajo, siempre útil y con frecuencia indispensable, para que los investigadores puedan conseguir con su utilización resultados efectivos. Para que estos resultados gozen de la imprescindible garantía que exige la investigación científica, es necesario que la constitución genética de los mismos se mantenga estable, dentro de cada estirpe y, sobre todo, que se controle su equilibrio biológico, físico-patológico y sanitario. Son por ello necesarios, animalarios, bioterios o estancieros en los que se críen, manejen, utilicen y controlen los animales destinados a servir de instrumentos en la investigación biomédica.

El ratón, como animal de laboratorio, comenzó a ser utilizado, con fines investigadores, a mediados del siglo XIX y es, con toda seguridad, el más preferido en investigaciones biomédicas (SAIZ MORENO, G. DE OSMA, & COMPAIRE, 1983).

En 1965, E.E.U.U. utilizó a estos efectos, más de 35 millones; Francia, en 1973, cerca de tres, y España, en este mismo año, medio millón.

Pertenece al orden "rodentia", familia "muridae", género "mus".

En el ratón, las inoculaciones subcutáneas deben ser hechas bajo la piel de la espalda; las percutáneas, en la parte posterior de la región dorsal; intradérmicas, en la almohadilla plantar; intramusculares, en el músculo postero - externo de la pata, y las intraperitoneales en la mitad posterior del abdomen (SAIZ MORENO & al, 1983, citados anteriormente).

## 5.2. EL RATON C57BL/6J

### 5.2.1. ORIGEN

El ratón C57BL fue desarrollado por Little en 1921, después del cruce de una hembra y un macho provenientes de una ganadería comercial en E.E.U.U.

Fue introducido en los Laboratorios Jackson (BAR HARBOR, MAINE U.S.A.) en

1948, en la generación F-22; posteriormente fue introducido en laboratorios IFFA-CREDO en septiembre de 1981, en la generación F-140.

#### 5.2.2. **CARACTERISTICAS.**

Pelaje y ojos negros. Crecimiento limitado. Talla bastante pequeña. Se reproduce bien. Una alopecia parcial, en placas numulares puede encontrarse en algunos casos (Es reversible). Muy raramente se observan dermatitis.

#### 5.2.3. **EVOLUCION PONDERAL**

Los machos alcanzan de 25 a 30 gramos de peso, a las 12 semanas de vida. En la misma fecha, las hembras no suelen superar los 20 gramos de peso(FIGURA-2).

#### 5.2.4. **TIEMPO MEDIO DE VIDA**

Su vida es larga, siendo utilizado incluso en estudios de gerontología.

DESDE EL NACIMIENTO HASTA 12 SEMANAS

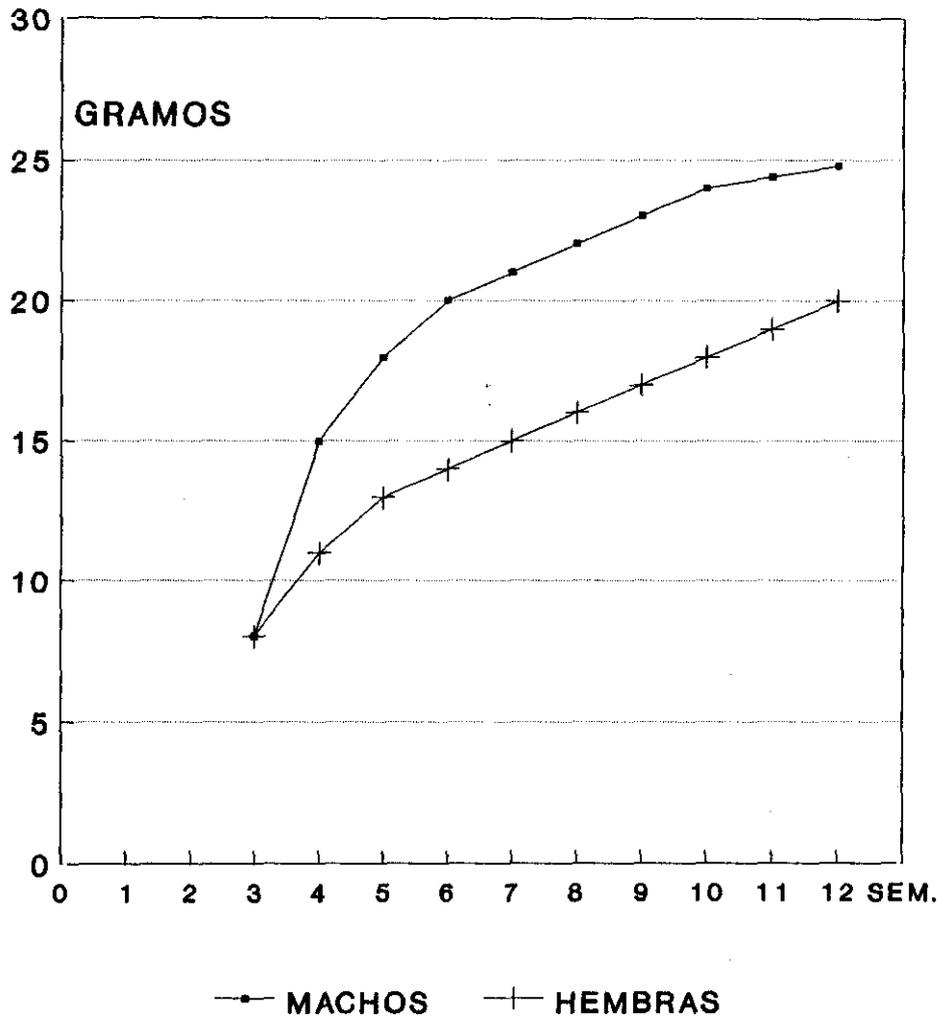


FIGURA II.- EVOLUCION PONDERAL DEL RATON C57BL/6J. (Cedida por Lab. Jackson)

El tiempo medio de vida es de 790 días, para las hembras, y de 840 días para los machos (TABLA -I - ).

#### 5.2.5. **PATOLOGIA ESPONTANEA**

Susceptible de desarrollar lesiones ateromatosas de la aorta después de 20 semanas de alimentación rica en grasas.

#### 5.2.6. **CAMPOS DE UTILIZACION**

Ampliamente utilizado como cepa de referencia en diferentes campos de investigación : cultivos celulares, hematología, quimioterapia del cáncer, radiación, mutación; muy sensible a la inoculación del bacilo tuberculoso (MANUEL TECHNIQUE : ANIMAUX DE LABORATOIRE - LABORATOIRE IFFA CREDO, 1987).

##### 5.2.6.1. **Cancerología**

###### **\* Tumores espontáneos e inducidos :**

Una amplia gama de tumores se desarrolla en las cepas puras de ratones.

	MACHOS	HEMBRAS
GOODRICK	827d. $\pm$ 34	818d. $\pm$ 21
KUNSTYR et LEUENBERGER 1975	878d. $\pm$ 10	794d. $\pm$ 6
CURTIS 1971	VIDA MEDIA: 600 DIAS	

**TABLA I.- TIEMPO MEDIO DE VIDA**  
**(Cedida por Lab. IFFA CREDO)**

En vista del cada vez mayor y más profundo conocimiento del genoma del ratón, las cepas puras de estos animales representan "instrumentos" únicos para estudiar la biología del cáncer y aclarar los papeles de la herencia y el medio ambiente en la génesis de los tipos individuales de tumores.

El ratón C57BL/6J es sensible a la inducción de tumores subcutáneos por 3-metilcolantreno. Existe, así mismo, una incidencia elevada de linfomas después de la administración "per os" de 3-metilcolantreno.

**\* Tumores transplantables :**

El ratón C57BL/6J es el modelo recomendado para el transplante de los siguientes tumores :

- Adenocarcinoma mamario BW 10232, carcinoma pulmonar de Lewis.
- Melanoma B<sub>16</sub> .
- Leucemia mieloide C 1498.

Todos estos tumores están bien establecidos y han sido ampliamente utilizados en investigación oncológica.

GATENBY, en 1980 (citado en Manuel Technique de Iffa Credo), estableció que el ratón C57BL/6J es un buen modelo animal para trabajos de inmunoterapia con coynebacterium parvum, en melanomas B<sub>16</sub> .

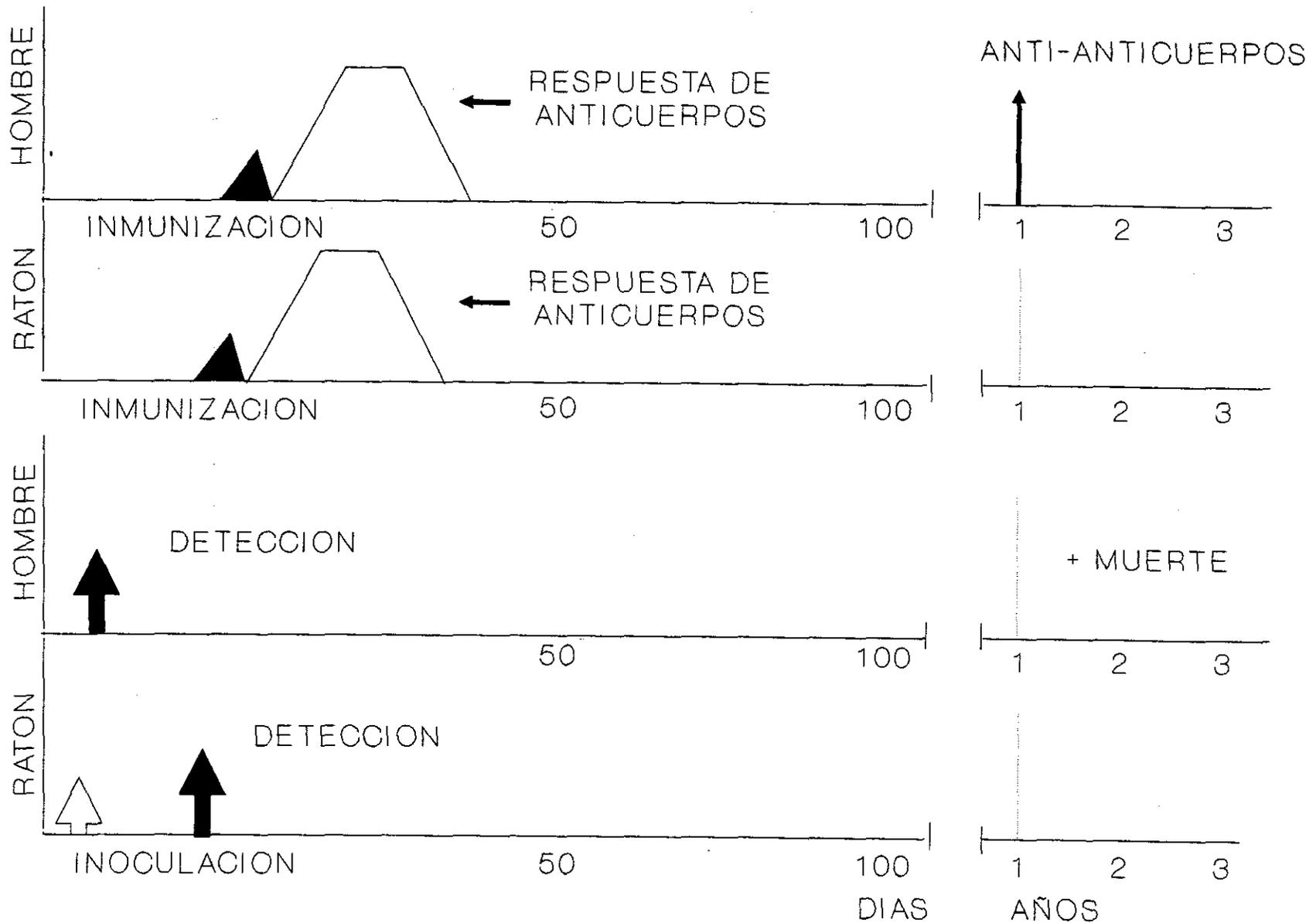
### 5.3. EL MELANOMA B<sub>16</sub>

#### 5.3.1. INTRODUCCION

El concepto de progresión tumoral elaborado por FOULDS (FOULDS, 1954), tiene en cuenta que en muchos tumores humanos y en algunos tumores animales inducidos por carcinógenos, el proceso neoplásico puede haber comenzado mucho tiempo antes y haberse desarrollado por progresiones graduales o en determinados momentos. Durante la etapa pre-maligna o en el período pre-invasivo, suele existir una larga etapa de progresión tumoral. Esto lleva a preguntarse si, en este aspecto, los modelos experimentales son apropiados o no.

Está claro que muchos tumores transplantables del ratón, causan la muerte del animal en un espacio de semanas. Muy pocos tumores humanos matan a su portador en ese período de tiempo (FIGURA - 3). Con todo, la cinética de la respuesta inmune a los antígenos tumorales es similar en el ratón y el hombre (LEYVA, F., 1983, citado anteriormente).

El interés y las controversias desencadenadas sobre la utilidad de uno u otro modelo experimental tumoral, se han reflejado, en los trabajos por separado de HEWIT Y RAPP (HEWIT, 1979; RAPP, 1979). A pesar de las discrepancias, ambos autores coinciden, en señalar, que los tumores transplantados singénicamente y derivados de tumores originariamente espontáneos o desarrollados en cepas de ratones de baja incidencia, serían los modelos más apropiados para proporcionar información útil en la investigación oncológica básica y aplicada.



**FIGURA III.- COMPARACION ENTRE EL RATON Y EL HOMBRE EN CUANTO A LAS DIFERENCIAS ENTRE LA DURACION DEL TUMOR Y EL TIEMPO ENTRE LA INDUCCION Y LA MUERTE POR EL TUMOR. (SEGUN LEWIS & AI)**

El trasplante continuado de un animal a otro, no obstante, casi inevitablemente desembocará en un índice de crecimiento más rápido, pérdida de la diferenciación histológica y funcional y en la disminución de la especificidad de cepa (MURPHY, 1966)

#### 5.3.2. CARACTERISTICAS

El melanoma B<sub>16</sub> es un tumor sólido no linfoide, originario espontáneamente del ratón C57BL/6J, por lo que cumple, al menos desde el punto de vista anteriormente mencionado, los requisitos adecuados para nuestro trabajo.

**VII - TRABAJO EXPERIMENTAL**

A. ESTUDIO CLINICO-HISTOLOGICO, EVOLUCION Y  
ESTUDIO NECROPSICO EN DIFERENTES ETAPAS DEL  
MELANOMA B<sub>16</sub> (LINEAS TUMORALES F<sub>1</sub> Y F<sub>10</sub> )  
INOCULADO EN EL RATON C57BL/6J.

## 1. INTRODUCCION

En este trabajo estudiamos diversos aspectos del melanoma B<sub>16</sub> transplantado en su portador singénico, el ratón C57BL/6J.

En primer lugar estudiamos los parámetros clínicos (crecimiento y mortalidad del melanoma B<sub>16</sub>). En segundo lugar se estudian los parámetros histológicos del tumor y de sus metástasis a lo largo de su evolución. Finalmente se evalúan los cambios generales necrópsicos ocurridos, en diversos órganos de los animales portadores de tumor y en el tumor.

## 2. ESTUDIO CLINICO DEL MELANOMA B<sub>16</sub>

### 2.1. MATERIAL Y METODOS

#### 2.1.1. ANIMALES

Se utilizaron ratones C57BL/6J(FIGURA-4)  
Los animales se obtuvieron inicialmente de los laboratorios IFFA CREDO (L'ARBRESLE FRANCIA) y posteriormente se mantuvieron en el Servicio de Medicina y Cirugía Experimental

FIGURA -IV - RATON C57BL/6J DE 5 SEMANAS DE EDAD EN  
APARENTE BUEN ESTADO DE SALUD  
("ADORMILADO" CON ETHER)



del Hospital Universitario San Carlos.

Los ratones utilizados han sido machos y hembras, entre 4 y 6 semanas de edad, con aparente buen estado de salud cuando se iniciaron los experimentos. Cuando fue necesario sacrificar los animales, se anestesiaron previamente con éter, siendo sometidos a continuación a toracotomía, punción cardíaca y exanguinación.

#### 2.1.2. TUMORES

El melanoma B<sub>16</sub> fue proporcionado por el Dr. Leyva y Cobián (C.E. Ramón y Cajal. MADRID. ESPAÑA) y por el Dr. Vidal Vanaclocha (Universidad del País Vasco. ESPAÑA).

Las inoculaciones tumorales se hicieron subcutáneamente con distintas concentraciones de células tripsinizadas y viables.

### 2.1.3. CULTIVO DE CELULAS TUMORALES IN VITRO.

#### 2.1.3.a. Crecimiento del tumor in vitro.

Se utilizó medio RPMI (FLOW LABORATORIES-REFERENCIA 1260249 Scotland, Reino Unido) suplementado con 5% de suero de ternera fetal (STF) (Flow Laboratories).

Se mantuvo en frascos de cultivo de 50 mililitros, en estufa de CO<sub>2</sub>. Cuando el fondo del frasco presentaba una capa uniforme de células se realizaba un "pase".

Para ello se añadía Edta-Tripsina (Flow Laboratories) en proporción de unos 10 ml por frasco de 50 ml; se dejaba durante 10 minutos en la estufa de CO<sub>2</sub> y a continuación se "golpeaba" para despegar las células tumorales. Tras varios lavados con solución salina balanceada de Hanks (HBBS) o con RPMI-hepes se contaban las células y se ajustaban a la concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en RPMI suplementado con 5% de suero de ternera fetal (STF), pasándolas a continuación a nuevos frascos.

2.1.3.b. **Congelación.** Una parte de las células tumorales se pasaron a STF al que se le añadió previamente Dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA Laboratories) al 5%. Se llevaron a concentraciones de  $20 \times 10^6$  células/ml y se distribuyeron en viales de congelación, 1 ml/vial. A continuación se introdujeron en cajas de poliestireno y estas se llevaron a congelador a  $- 80^{\circ}$  C.

Se mantuvieron así 24 horas y luego los viales se pasaron a congelador de nitrógeno líquido. Para descongelarlos y utilizar de nuevo las células fue suficiente con calentar el vial en baño a  $37^{\circ}$  C.

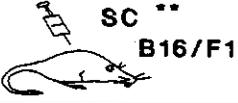
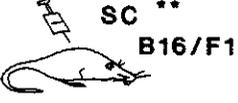
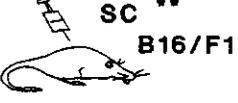
Una vez descongelado, el contenido se lavó rápidamente unas 4-5 veces en HBBS o RPMI-hepes y a continuación se pasaron las células a RPMI suplementado con 5% de STF, ajustándolas a la concentración deseada ( $1 \times 10^6$  células/ml) y pasándolas a frascos de cultivo.

#### **2.1.3.c. Preparación de las suspensiones de células tumorales.**

Para preparar las suspensiones de células tumorales a las distintas concentraciones utilizadas en la experiencia, se despegaron las células, según el método descrito en 2.1.3.a., se lavaron varias veces, para eliminar los restos de tripsina y se ajustaron a las concentraciones deseadas en RPMI-1640.

#### **2.1.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.**

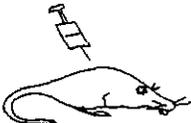
Se hicieron 2 grupos : A y B. El grupo A estaba compuesto de 6 lotes de 10 ratones cada uno y el grupo B lo componían un total de 20 ratones distribuidos en 2 lotes. Los distintos lotes, de ambos grupos, fueron inoculados con distintas concentraciones de células tumorales tripsinizadas y viables, tal como se refleja en las FIGURAS 5 y 6. Para la inoculación de los lotes del grupo A se emplearon células de melanoma B<sub>16</sub> , línea tumoral F<sub>1</sub> (proporcionado por el Dr. LEYVA Y COBIAN) y para la

	N *	DIA		CONCENTRACION DE CELULAS TUMORALES
GRUPO: I	10	0		$5 \times 10^4$
GRUPO: II	10	0		$10 \times 10^4$
GRUPO: III	10	0		$20 \times 10^4$
GRUPO: IV	10	0		$30 \times 10^4$
GRUPO: V	10	0		$50 \times 10^4$
GRUPO: VI	10	0		$2 \times 10^6$

\* N= NUMERO DE RATONES

\*\* SC= SUBCUTANEA

FIGURA V.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR LOS  
PARAMETROS CUANTITATIVOS (CRECIMIENTO Y MORTALIDAD)  
DEL MELANOMA B16/F1 EN SU PORTADOR SINGENICO:  
EL RATON C57BL/6J.

	N *	DIA	SC ** B16/F10	CONCENTRACION DE CELULAS TUMORALES
GRUPO: 1	(10)	CERO		$30 \times 10^4$
GRUPO: 2	(10)	CERO		$50 \times 10^4$

\* N= NUMERO DE RATONES

\*\* SC= SUBCUTANEA

FIGURA VI.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR  
LOS PARAMETROS CUANTITATIVOS (CRECIMIENTO Y MORTALIDAD)  
DEL MELANOMA B16/F10 EN RATONES C57BL/6J.

inoculación del grupo B se emplearon células de melanoma B<sub>16</sub>, línea tumoral F<sub>10</sub> (proporcionado por el DR. VIDAL).

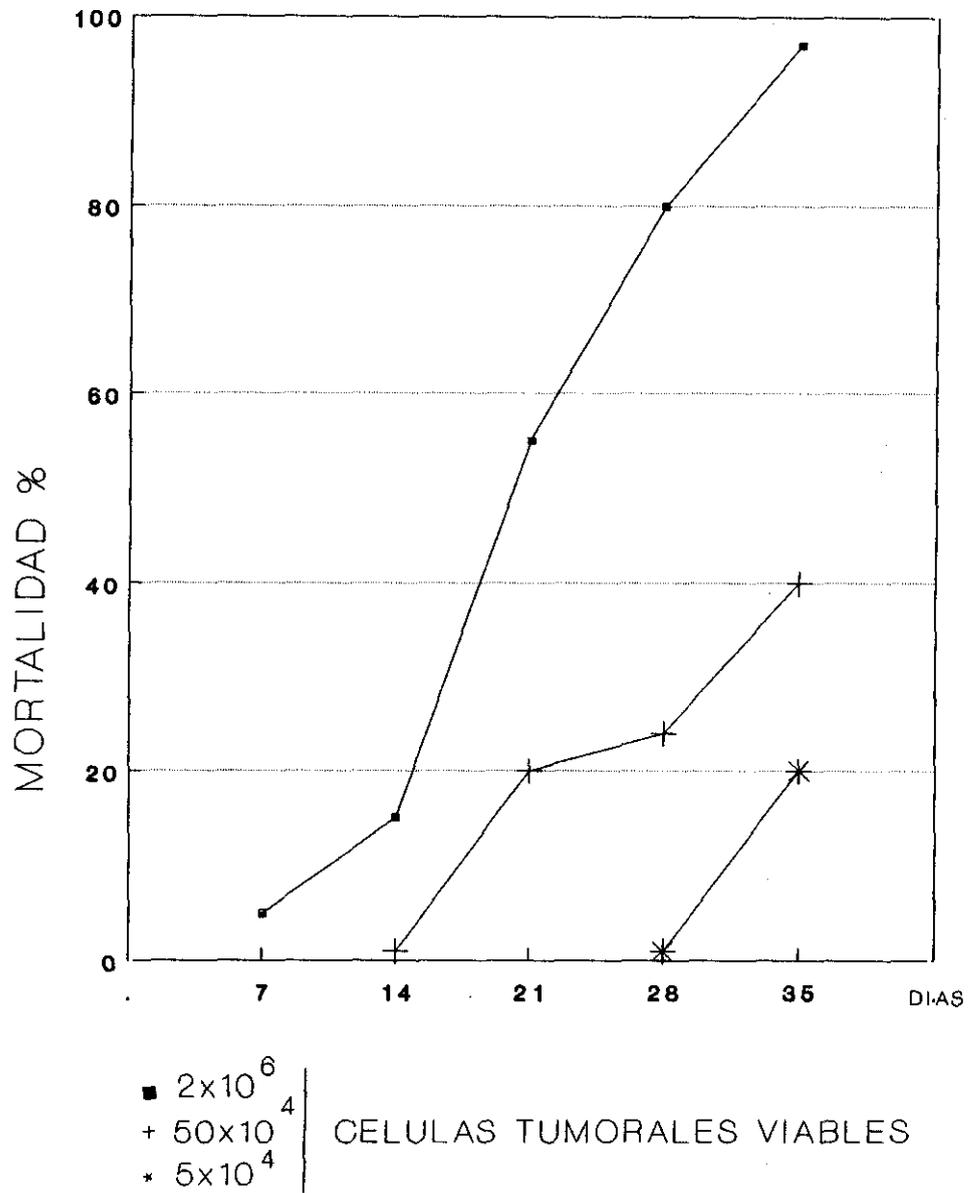
## 2.2. RESULTADOS.

El tumor fue palpable en todos los ratones de ambos grupos, excepto en uno de ellos, perteneciente al lote del grupo A inoculado con  $5 \times 10^4$  células tumorales viables.

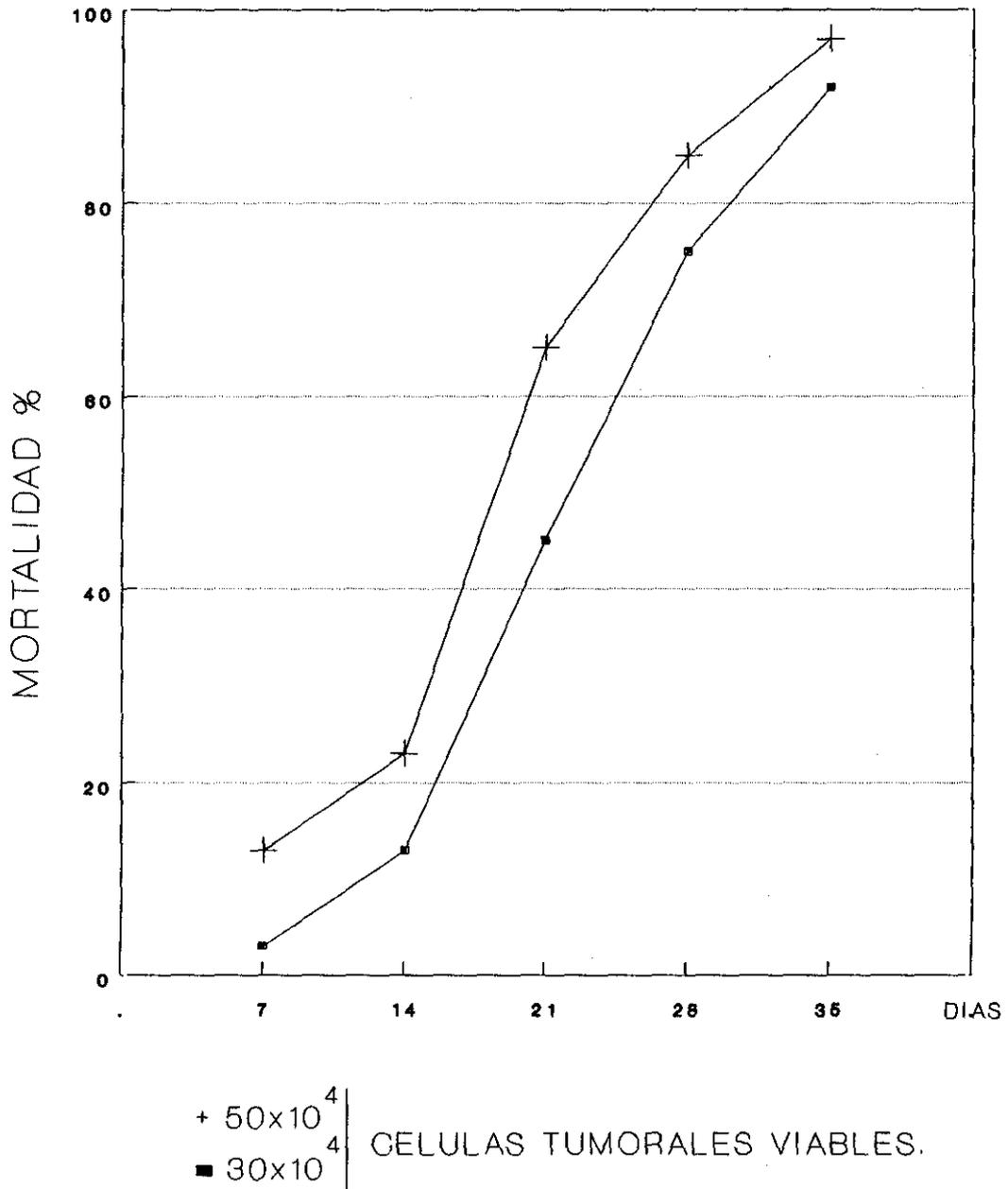
Las FIGURAS 7 y 8 muestran, respectivamente, la mortalidad expresada en porcentajes en función del tiempo en ambos grupos.

En la TABLA II se expresan los parámetros de crecimiento tumoral y mortalidad en los ratones del grupo A, inoculados con  $2 \times 10^6$  células tumorales.

En los ratones del grupo A, inoculados con distintas concentraciones de células de melanoma B<sub>16</sub> / F<sub>1</sub>, los tumores (FIGURA-9) no se ulceraron nunca, alcanzando un tamaño, en la mayoría de los casos, de 4 cms a los 30 días de evolución (FIGURA-10). En el grupo B, los tumores



**FIGURA VII.- MORTALIDAD EN RATONES C57BL/6J INOCULADOS EL DIA CERO CON MELANOMA B16/F1**



**FIGURA VIII.- MORTALIDAD EN RATONES C57BL/6J INOCULADOS EL DIA CERO CON MELANOMA B16/F10**

NUMERO TOTAL DE RATONES UTILIZADOS	10	
EDAD AL INICIO	4-6 SEMANAS	
DISTRIBUCION POR SEXOS	MACHOS 5	HEMBRAS 5
DIAMETRO MEDIO DEL TUMOR EL DIA 14 $\pm$ SD* cm	1'20 $\pm$ 0,25	1'14 $\pm$ 0,28
REGRESION DEL TUMOR	0	0
TUMORES NEGATIVOS	0	0
TUMORES POSITIVOS	5	5
mst ** $\pm$ SD* (días)	26'40 $\pm$ 2'96	30'60 $\pm$ 3'40

\* SD= DESVIACION CUADRATICA MEDIA

\*\* mst= TIEMPO MEDIO DE SUPERVIVENCIA

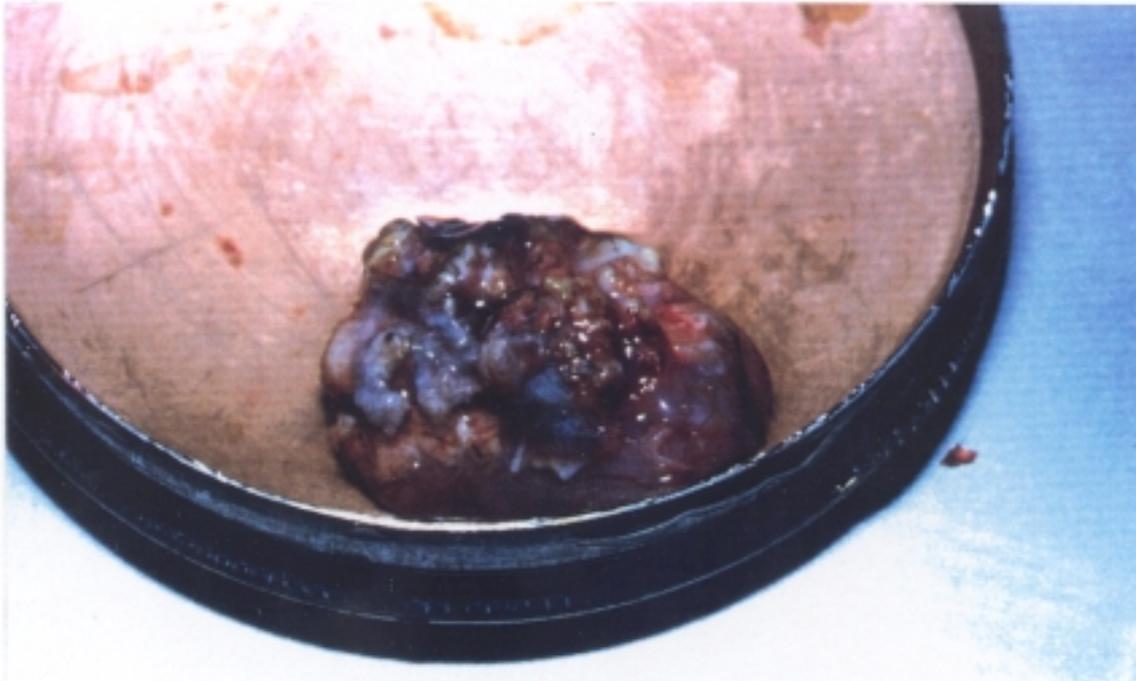
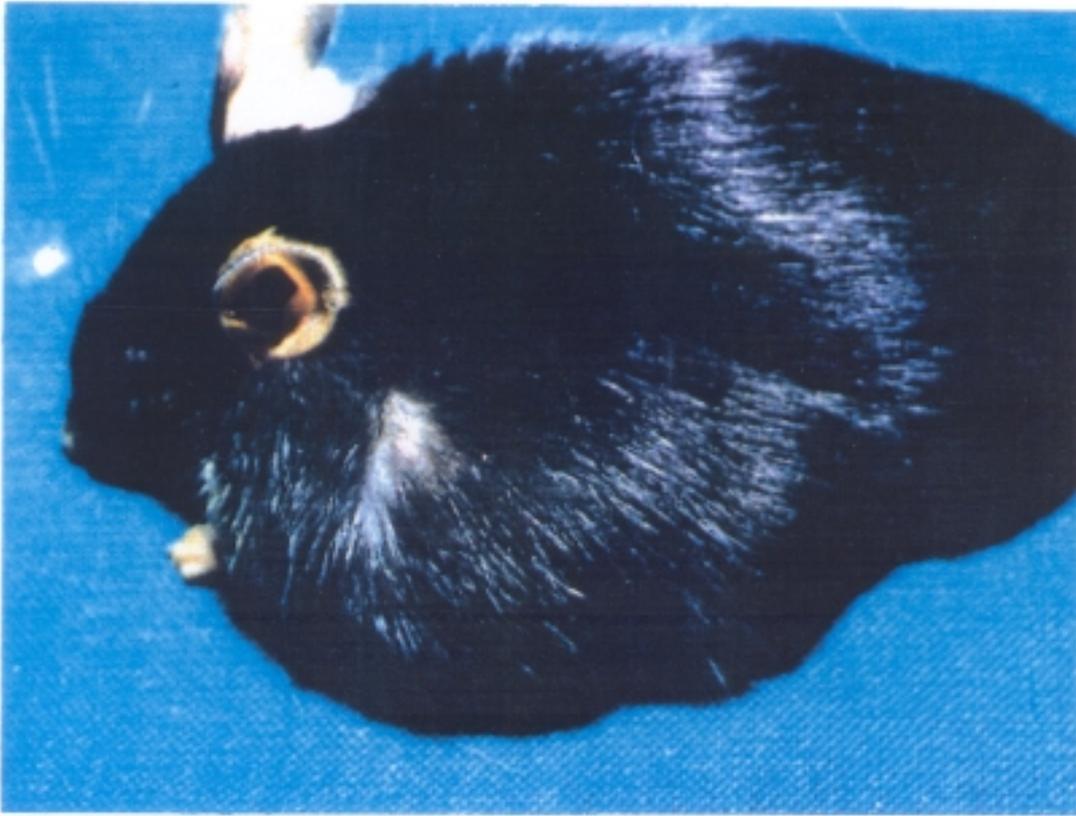
TABLA II.- PARAMETROS DE CRECIMIENTO TUMORAL Y MORTALIDAD EN RATONES C57BL/6J INOCULADOS EL DIA CERO CON  $2 \times 10^6$  CELULAS DE MELANOMA B16.

FIGURA - IX - RATON C57BL/6J (♂, 10 SEMANAS DE EDAD)  
INOCULADO EL DIA CERO CON 2 x 10<sup>6</sup> CELULAS  
DE MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> .

30 días de evolución. Es visible el gran tamaño alcanzado por el tumor.

FIGURA - X - MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> EXTIRPADO DE UN RATON  
C57BL/6J A LOS 30 DIAS DE SER INOCULADO  
CON 2 x 10<sup>6</sup> CELULAS TUMORALES.

Tamaño 4 cms. Peso 13 grs.



se ulceraron en un 30% de los casos (FIGURA 11) y el tumor alcanzó los 3 cms de tamaño, generalmente, antes de los 25 días de evolución (FIGURA-12)

No existió ninguna regresión espontánea de la tumoración. El crecimiento tumoral resultó ser más lento en aquellos ratones inoculados con menor concentración de células tumorales. En cualquier caso, el tumor fue palpable entre los 7 y 18 días de la inoculación.

El tiempo medio de supervivencia varió ligeramente de unos lotes a otros, siendo mayor cuanto menor fue el número de células tumorales viables inoculadas. En ningún caso fue superior a los 35 días.

### 2.3. COMENTARIO.

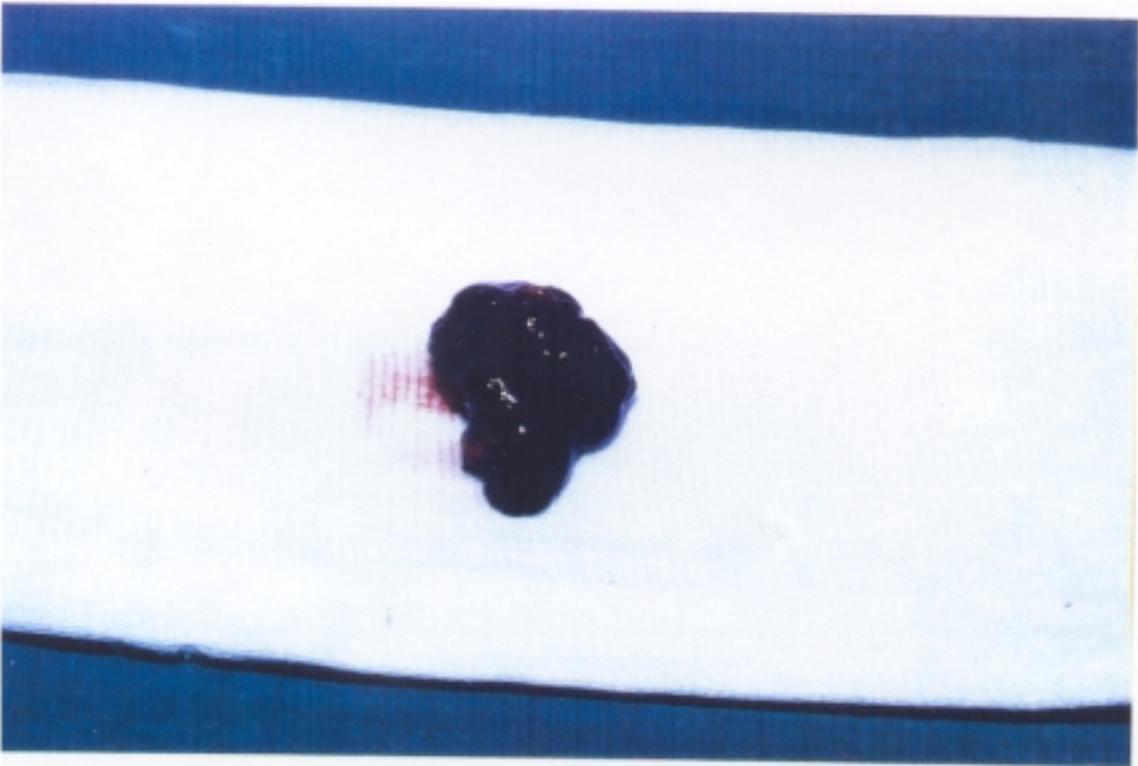
En los estudios realizados, comprobamos que el melanoma B<sub>16</sub> es una neoplasia fácilmente transplantable en su portador singénico. Con la técnica utilizada de implante subcutáneo de una suspensión de células tumorales, hemos conseguido un crecimiento tumoral cercano al 100%. Este porcentaje de crecimiento es similar al obtenido por otros grupos de investigadores, que utilizan la misma técnica.

FIGURA - XI - RATON C57BL/6J (♂, 9 SEMANAS DE EDAD)  
INOCULADO EL DIA CERO CON 2 X10<sup>6</sup> CELULAS  
DE MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>10</sub> . 25 DIAS DE  
EVOLUCION.

Obsérvese la ulceración del tumor

FIGURA -XII - MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>10</sub> EXTIRPADO DE UN RATON  
C57BL/6J A LOS 25 DIAS DE SER INOCULADO  
CON 50 X 10<sup>4</sup> CELULAS TUMORALES.

Son más evidentes las áreas necróticas,  
que en el melanoma de la FIGURA - X -.



Así LEYVA con la misma técnica obtiene el 100% de crecimiento tumoral (LEYVA, 1983, citado anteriormente), VICENTE & al obtienen el 99% de éxitos (VICENTE & al, 1988).

Los parámetros de crecimiento tumoral y mortalidad son similares a los reseñados por otros autores (LEYVA, 1983, citado anteriormente, GOMEZ & al, 1987), si bien estos autores difieren, entre ellos, en el tiempo en que el tumor se hace palpable, ya que mientras que GOMEZ & al sostienen que el tumor es palpable entre siete y diez días después de la inoculación, nosotros coincidimos con LEYVA en que el tumor puede hacerse palpable más tardíamente. La discondancia, probablemente obedece a la concentración de células tumorales viables inoculadas en cada caso.

Hemos encontrado ulceración del tumor, en un 30% de los mismos, pertenecientes a la línea B<sub>16</sub> /F<sub>10</sub>, lo que difiere de lo reseñado por otros autores, en cuanto a que el melanoma B<sub>16</sub> en ningún caso se ulcera (BERTALANFFI, 1984, YAMADA, 1985; GOMEZ & al, 1987, citado anteriormente).

La diferencia probablemente estribe en que estos autores en sus trabajos probablemente han utilizando línea de melanoma B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> , en la que nosotros tampoco hemos encontrado ulceración tumoral.

La muerte del animal sobreviene entre la quinta y séptima semana después de la inoculación tumoral, no sobreviviendo ningún ratón más allá de día 35.

### **3. ESTUDIO HISTOLOGICO DEL MELANOMA B<sub>16</sub> Y DE SUS METASTASIS EN DIFERENTES ETAPAS.**

#### **3.1. INTRODUCCION.**

Con el objeto de estudiar los cambios histológicos del melanoma B<sub>16</sub> en sus dos líneas F<sub>1</sub> y F<sub>10</sub> se procedió al estudio histológico sistemático, de todos los tumores. Asimismo en animales elegidos al azar, en distintas fases evolutivas, se estudiaron histológicamente los pulmones y ganglios con el fin de evidenciar la posible existencia de metástasis.

#### **3.2. PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS EMPLEADOS.**

Para la obtención del tumor se anestesió al ratón con éter, incidiendo a continuación la zona de localización del melanoma, liberándolo y suturando la zona.

En los animales seleccionados para estudio histológico de pulmones y ganglios linfático, se procedió a su sacrificio, realizando a continuación toracotomía, liberación de los órganos mencionados y extracción de los mismos.

### 3.3. PROCEDIMIENTOS HISTOLOGICOS RUTINARIOS.

El tumor y los órganos extraídos fueron procesados rutinariamente en el Laboratorio de Histopatología Cutánea (DEPARTAMENTO de DERMATOLOGIA. HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CARLOS. MADRID ESPAÑA).

### 3.4. ESTUDIO HISTOLOGICO DEL MELANOMA B<sub>16</sub> .

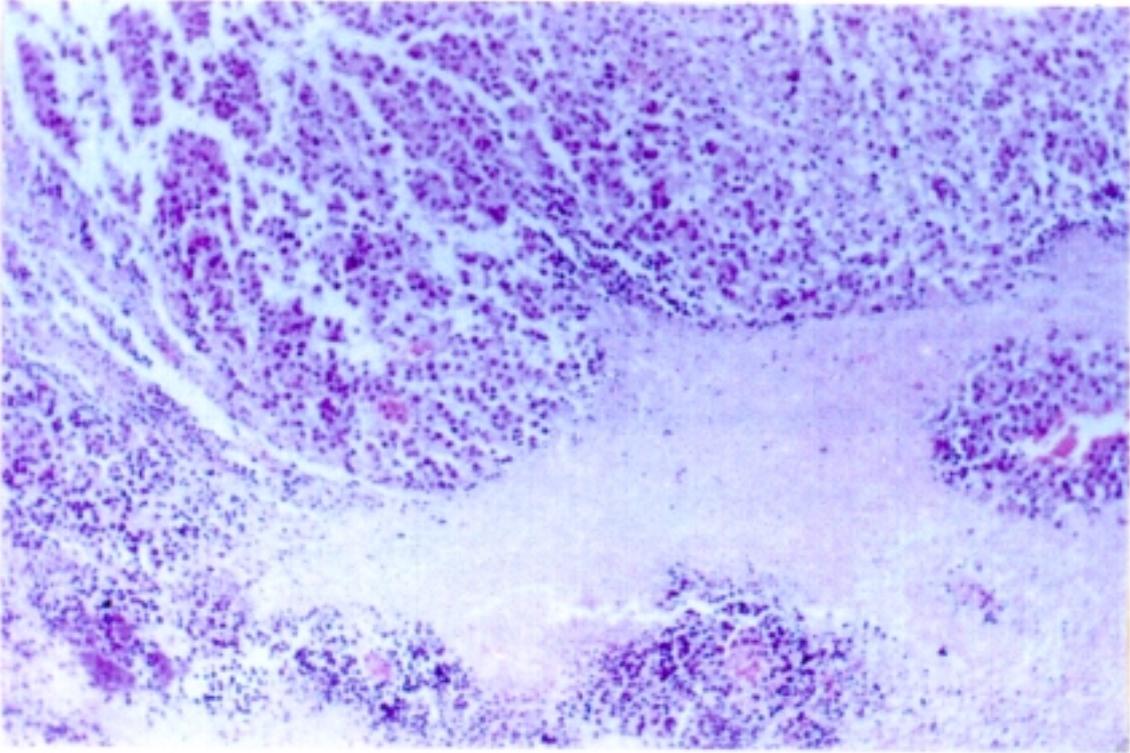
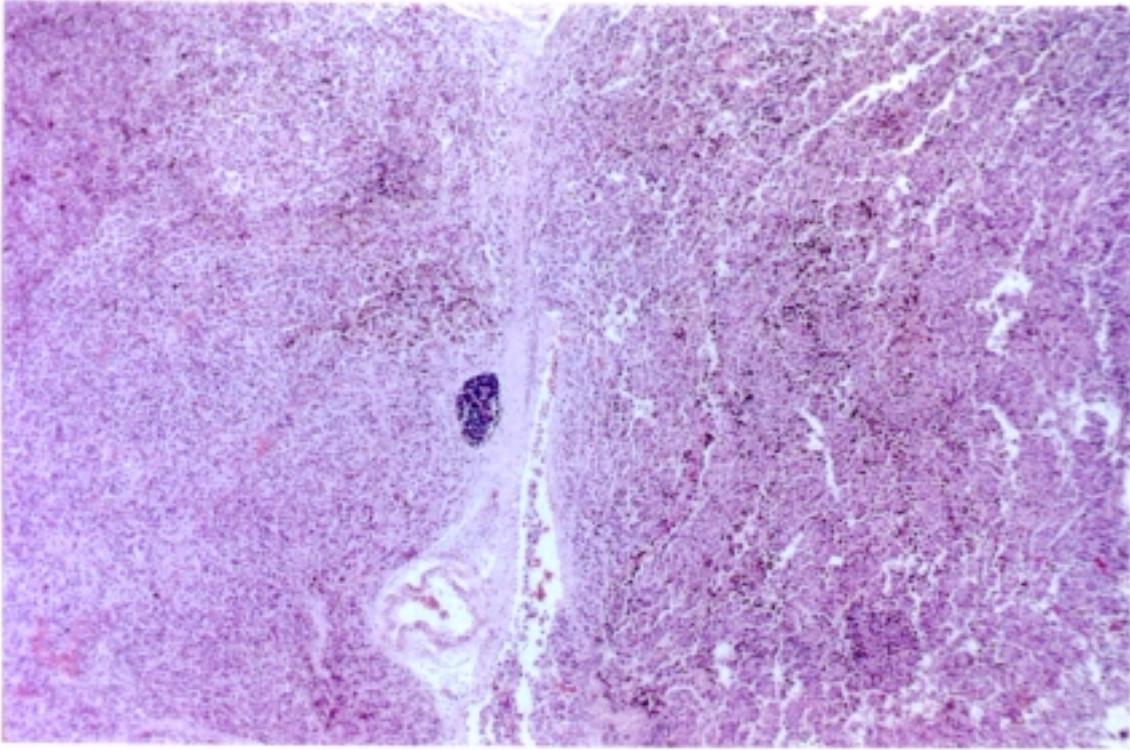
El estudio histológico del melanoma B<sub>16</sub> a lo largo de su evolución muestra una imagen histológica "igual" a la del melanoma humano (FIGURAS 13 y 14). Las áreas necróticas son evidentes y van en aumento a lo largo de la evolución tumoral. Obsérvese en las FIGURAS 15 y 16, en las que se muestran a más detalle las imágenes

**FIGURA -XIII - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DE UN  
MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> .**

Observen las etapas de transformación necrótica de los melanocitos. En la zona superior se observan melanocitos "vivos", en la zona inferior se evidencian claramente zonas de necrosis y entre ambas son visibles células en las que se inicia el proceso de necrosis.

**FIGURA -XIV - IDEN A - XIII - DE UN MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>10</sub> .**

Mayores áreas de necrosis que en la FIGURA anterior. Se pueden observar un buen número de vasos sanguíneos en las zonas necróticas.

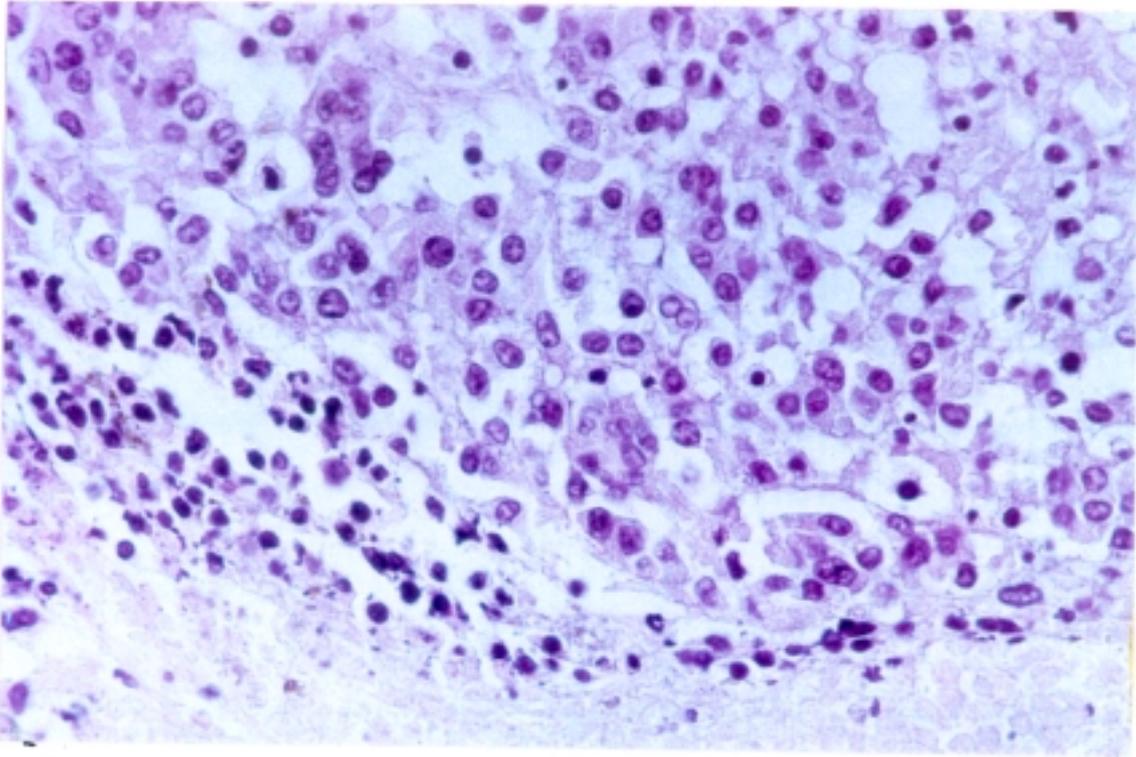
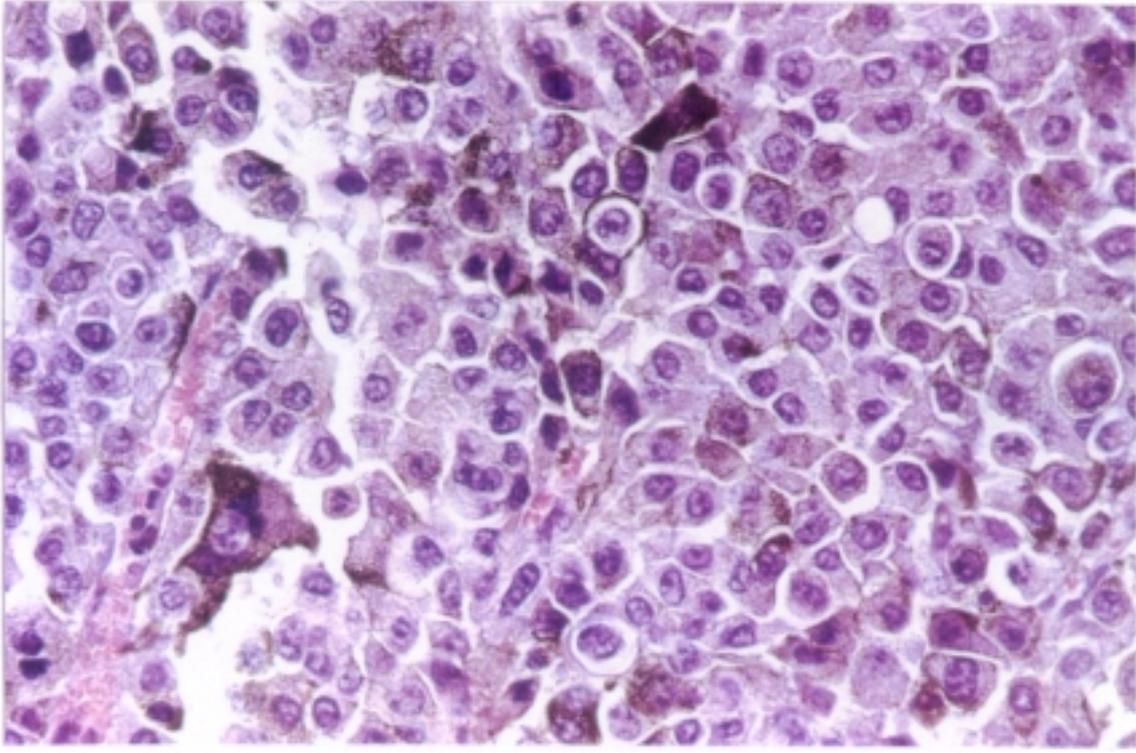


**FIGURA - XV - LA IMAGEN HISTOLOGICA DEL MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub>  
A MAS DETALLE.**

Nótese la poca presencia de pigmento melánico.

**FIGURA -XVI - LA IMAGEN HISTOLOGICA DEL MELANOMA  
B<sub>16</sub> /F<sub>10</sub> A MAS DETALLE.**

La presencia de pigmento melánico, aunque escasa, es más abundante que en el melanoma anterior.



histológicas de los melanomas de las FIGURAS 13 y 14, como la presencia de áreas necróticas es mayor en el melanoma de las FIGURA 14 y 16 imágenes correspondientes a un tumor de 32 días de evolución, que en el de las FIGURAS 13 y 15, imágenes correspondientes a un melanoma de 25 días de evolución.

En la imagen histológica de la FIGURA 13 son claramente diferenciables las etapas de transformación necrótica de los melanocitos. En la zona superior de la imagen se observan melanocitos "vivos", mientras que la zona inferior muestra claras zonas de necrosis y entre ambas es visible una zona intermedia, en la que se está iniciando la necrosis.

Ambos tumores presentan poca melanina, si bien es más manifiesta en el tumor de la FIGURA 14.

### 3.5. ESTUDIO HISTOLOGICO DE LAS METASTASIS DEL MELANOMA B .

En contadas ocasiones se encontraron metástasis pulmonares, y poco más frecuentemente encontramos adenomegalias metastásicas.

Las FIGURAS 17 y 18 muestran las imágenes histológicas de un ganglio linfático metastatizado.

Las FIGURAS 19 y 20 muestran las imágenes histológicas de un pulmón metastatizado.

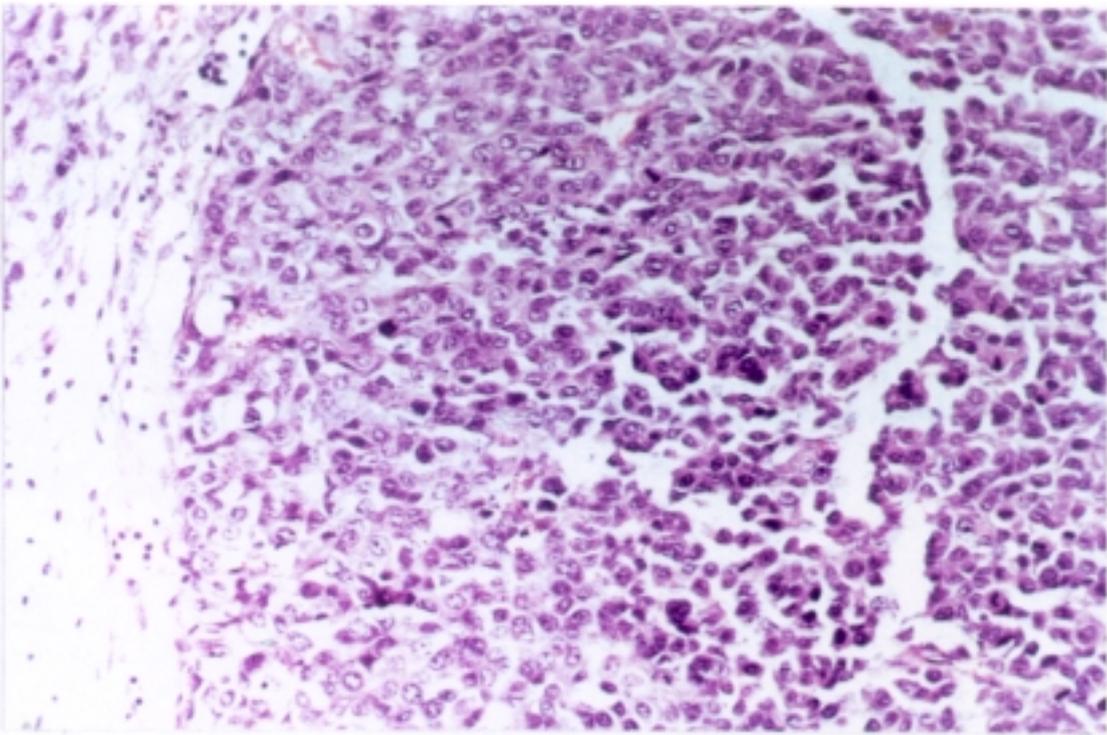
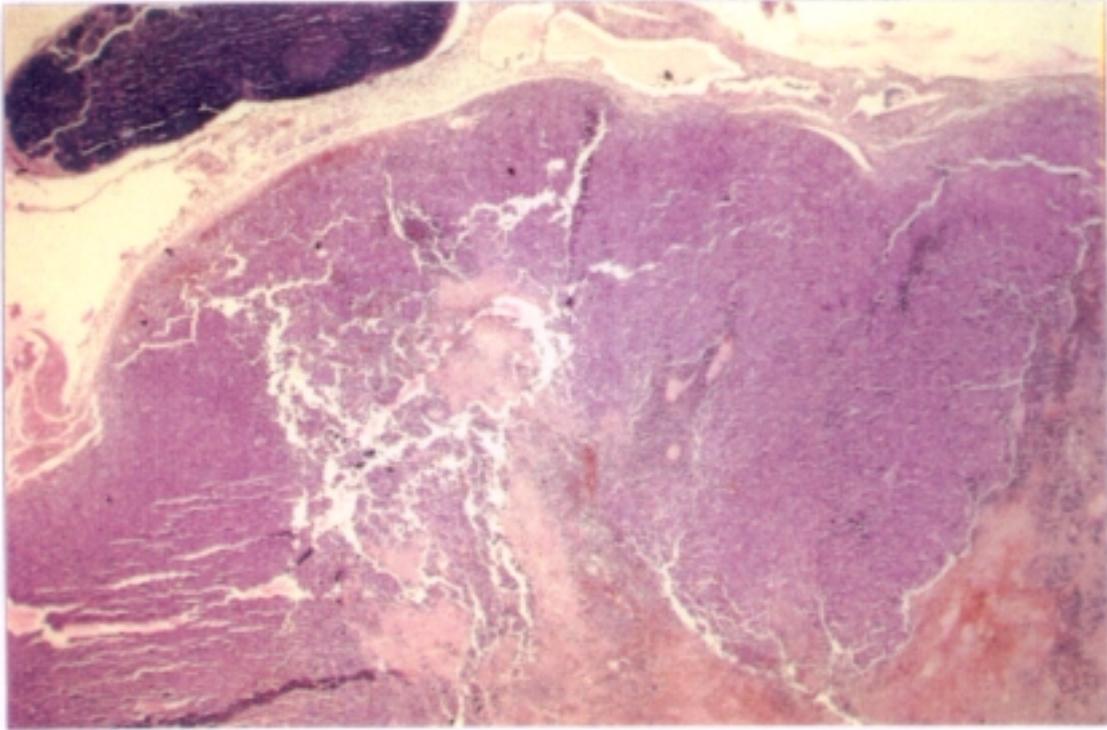
### 3.6. COMENTARIO.

La presencia de grandes áreas de necrosis en el melanoma B podría hacernos pensar, en que tales focos necróticos pudieran ser el resultado del rápido crecimiento tumoral y de fallos en la vascularización del mismo; sin embargo, hemos encontrado áreas necróticas vascularizadas (En la FIGURA 14 se pueden observar un buen número de vasos sanguíneos en las zonas necróticas), lo que lleva a suponer que ciertas necrosis sean consecuencia de un fenómeno de respuesta inmunitaria por parte del huésped, ya que los estudios histológicos muestran una disminución del infiltrado mononuclear a lo largo de la evolución del tumor. A pesar de esta respuesta inmune del huésped, el tumor continua creciendo y mata a su portador.

**FIGURA - XVII - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DE UN  
GANGLIO LINFATICO, METASTATIZADO POR  
MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> .**

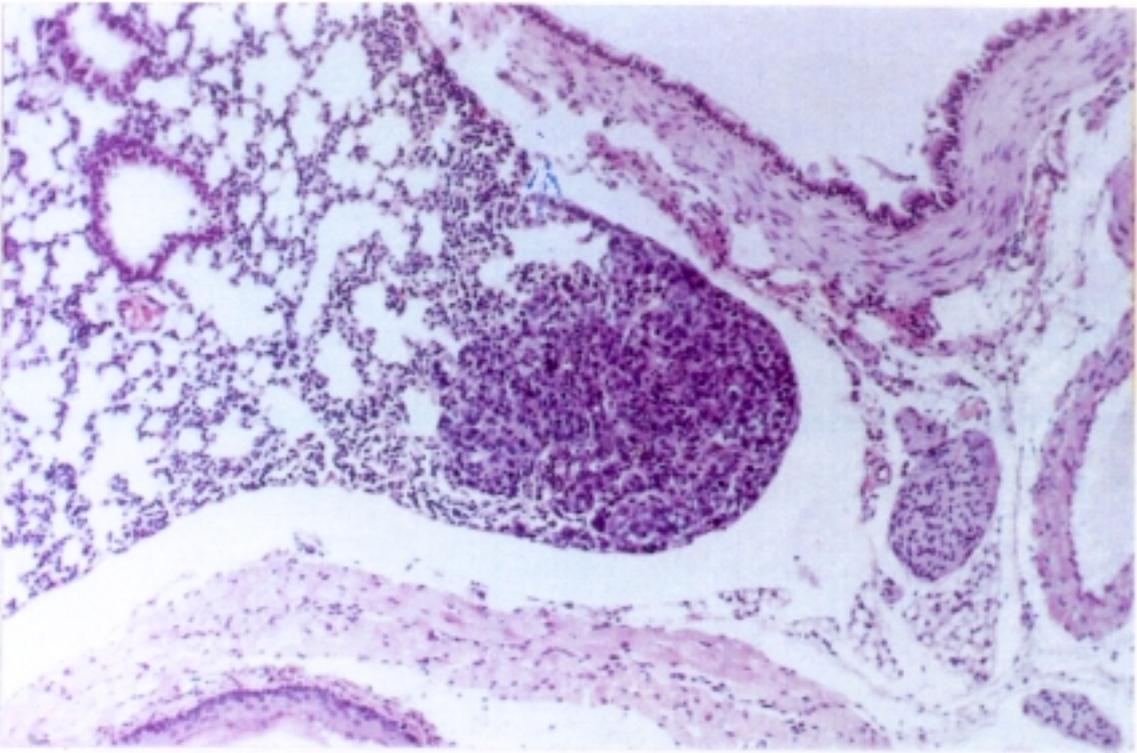
**FIGURA - XVIII - IMAGEN HISTOLOGICA DEL GANGLIO  
METASTATIZADO A MAS DETALLE.**

**Se pueden observar melanocitos  
neoplásicos.**



**FIGURA - XIX - IMAGEN HISTOLOGICA DEL CORAZON DE UN**  
**RATON C57BL/6J Y DEL PULMON**  
**METASTATIZADO POR MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>1</sub> .**

**FIGURA - XX - DETALLE DE LA METASTASIS PULMONAR, DE LA**  
**FIGURA - XIX -.**



El potencial metastásico del melanoma B es escaso, tal como ha sido puesto de manifiesto por otros autores (MAEKAWA, 1970). Existe acuerdo en la literatura en la presencia, escasa, de metástasis en pulmones de ratones C57BL inoculados con melanoma B<sub>16</sub> ; sin embargo existen fuertes discrepancias, en cuanto a si las adenomegalias pigmentadas, que se encuentran en estos ratones, corresponden : A la activación defensiva del sistema inmune del huésped, como sostienen VICENTE & al (citados anteriormente), ya que en sus estudios histológicos, de las adenomegalias de ratones con B<sub>16</sub> , encuentran únicamente acúmulos de melanófagos, sin presencia de melanocitos neoplásicos o si por el contrario son verdaderas adenomegalias tumorales como sostiene SUGIURA (SUGIURA, 1948). Nuestros estudios apoyan la hipótesis de SUGIURA, ya que como hemos reseñado anteriormente las imágenes histológicas de las adenomegalias estudiadas muestran melanocitos neoplásicos.

#### 4. ESTUDIO NECROPSICO.

##### 4.1. INTRODUCCION.

Se evalúan los cambios macroscópicos, gravimétricos e histopatológicos ocurridos en los siguientes órganos de animales portadores del melanoma B<sub>16</sub> : timo, bazo, ganglios linfáticos, pulmones, riñones, páncreas, hígado; así como en el tumor.

##### 4.2. PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS.

De forma rutinaria, en animales escogidos al azar de los protocolos experimentales, que tuvieron una muerte espontánea por su proceso maligno, se practicó un estudio necrópsico. Se extrajeron los órganos mencionados en 4.1. y el tumor, siendo todos ellos debidamente procesados y evaluados. Se compararon con animales control, de la misma edad, que fueron sacrificados, siendo procesados a continuación sus órganos y evaluados.

#### 4.3. RESULTADOS.

En el estudio necrópsico se observó que los ganglios linfáticos regionales no metastatizados, tenían unos valores similares a los de los controles normales. El estudio histológico de los mismos no reveló alteraciones (FIGURAS - XXI , XXII).

El estudio histológico de pulmones no metastatizados no mostró alteraciones significativas (FIGURA XXIII).

El estudio del timo reveló una disminución del tamaño del mismo en comparación con los ratones control, pero no se evidenció ninguna alteración histológica como se observa en la (FIGURA - XXIV).

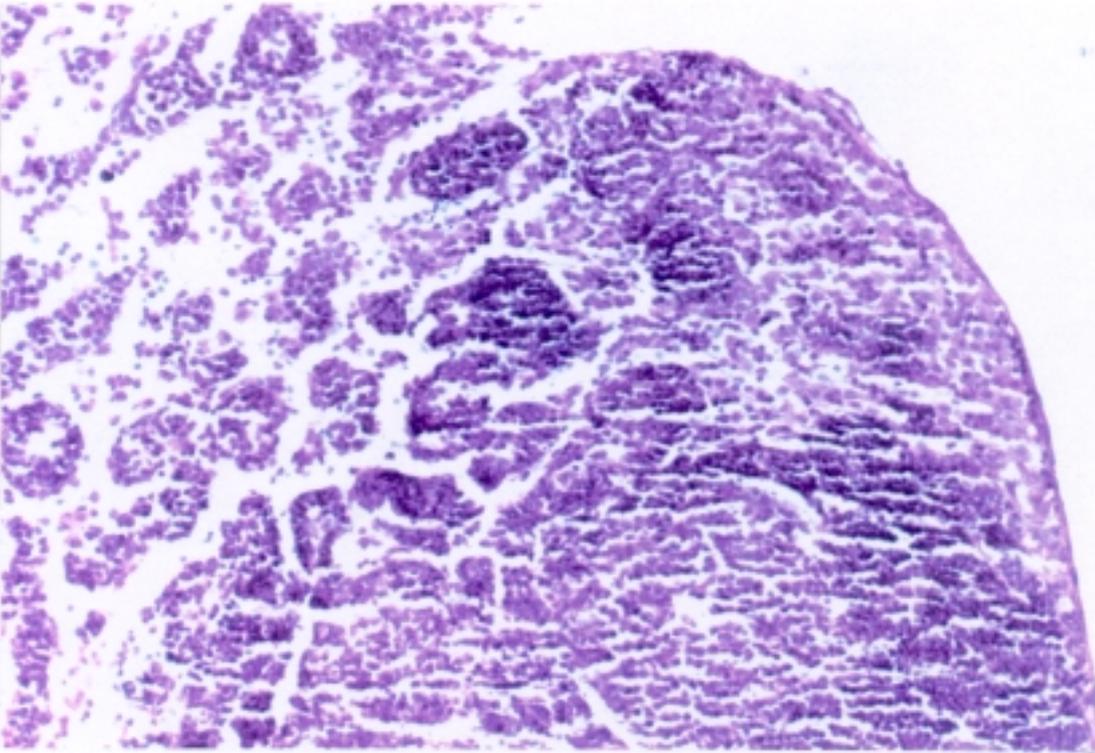
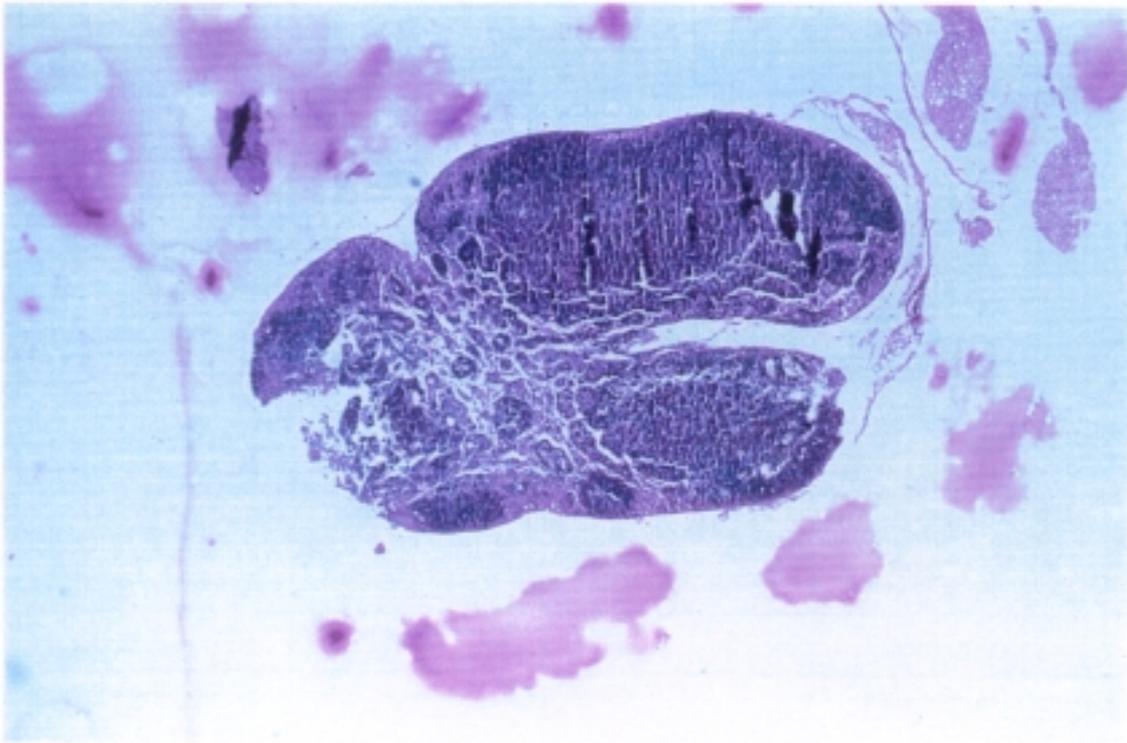
El bazo aumentó significativamente de tamaño, llegando en muchos casos a pesar el doble que en los ratones control. No se evidenciarón alteraciones histológicas (FIGURA XXV).

El estudio histológico del riñón, en animales portadores del tumor mostró una discreta glomerulonefritis proliferativa. En ningún caso se evidenciaron metástasis renales (FIGURA XXVI y XXVII).

El estudio histológico del hígado fue considerado normal (FIGURA - XXVIII).

FIGURA - XXI - IMAGEN HISTOLOGICA DE UN GANGLIO NORMAL,  
EN UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON  
MELANOMA B<sub>16</sub> / F<sub>10</sub> .

FIGURA - XXII - LA FIGURA - XXI - A MAS DETALLE.



**FIGURA - XXIII - IMAGEN HISTOLOGICA DEL CORAZON Y**  
**PULMON DE UN RATON C57BL/6J INOCULADO**  
**CON MELANOMA B<sub>16</sub> /F<sub>10</sub> .**

**No se observan ningún detalle que  
revele anormalidad en ambos órganos.**

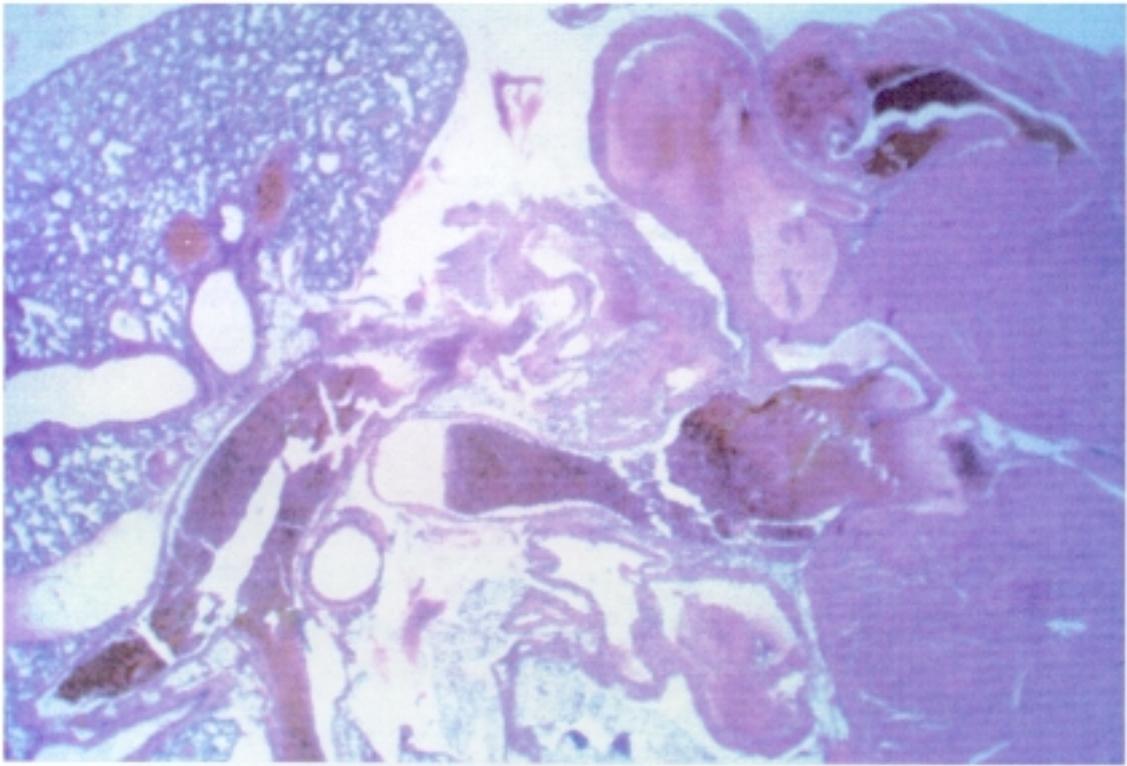


FIGURA - XXIV - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DEL TIMO,  
DE UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON  
MELANOMA B<sub>16</sub> . TOMA NECROPSICA.  
No hay datos de anormalidad.

FIGURA - XXV - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA DEL BAZO DE  
UN RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA  
B<sub>16</sub> . ESTUDIO NECROPSICO.  
No se observan alteraciones.

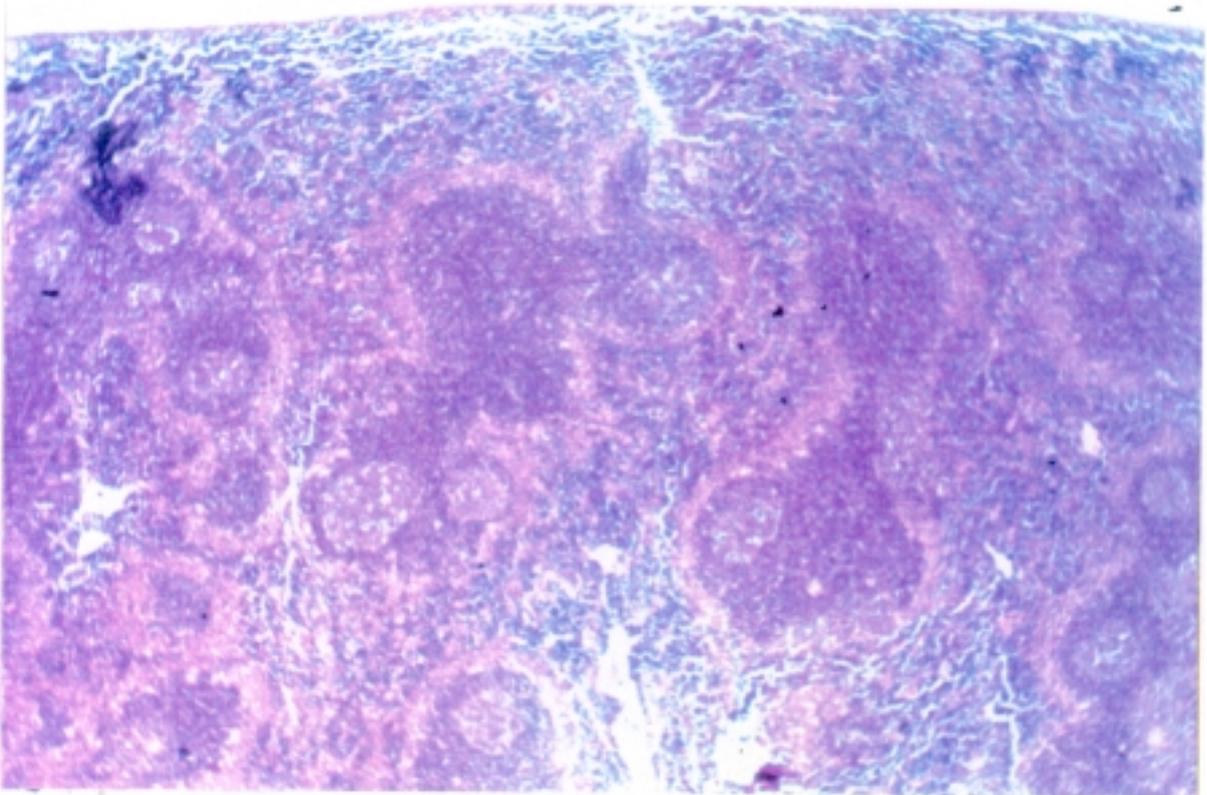
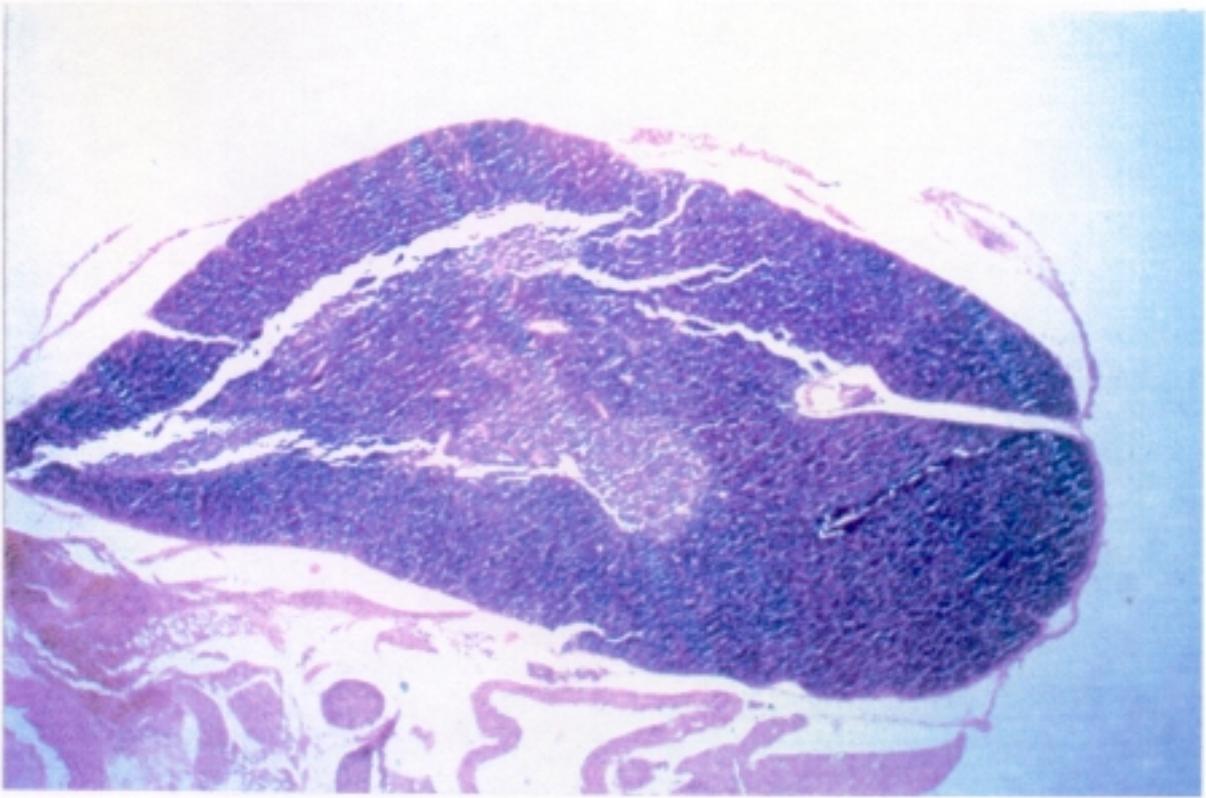
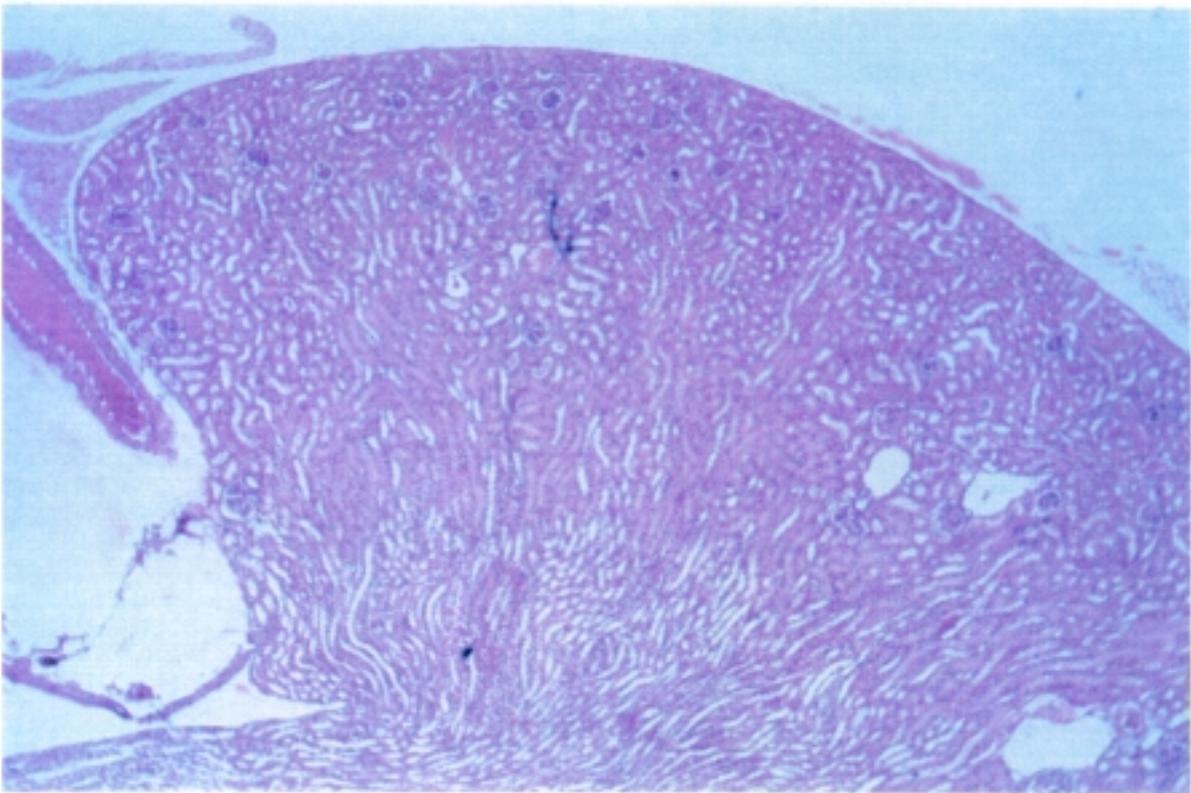
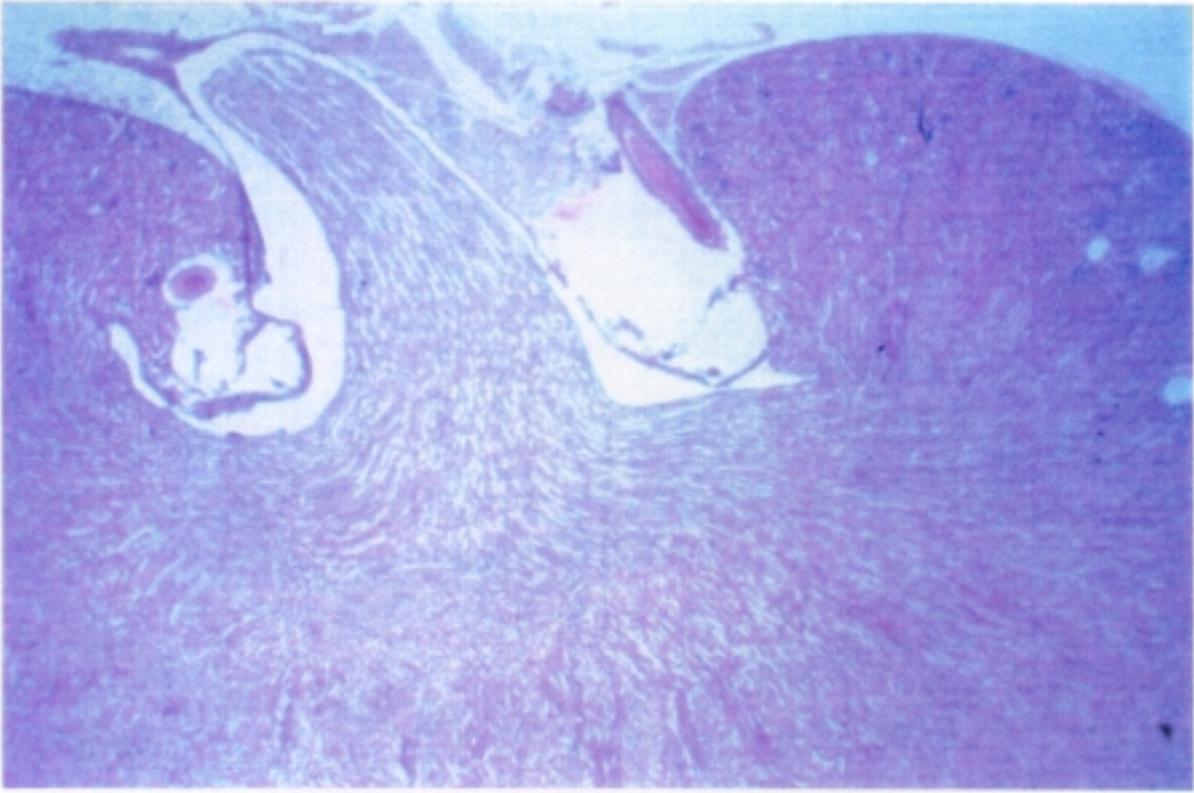


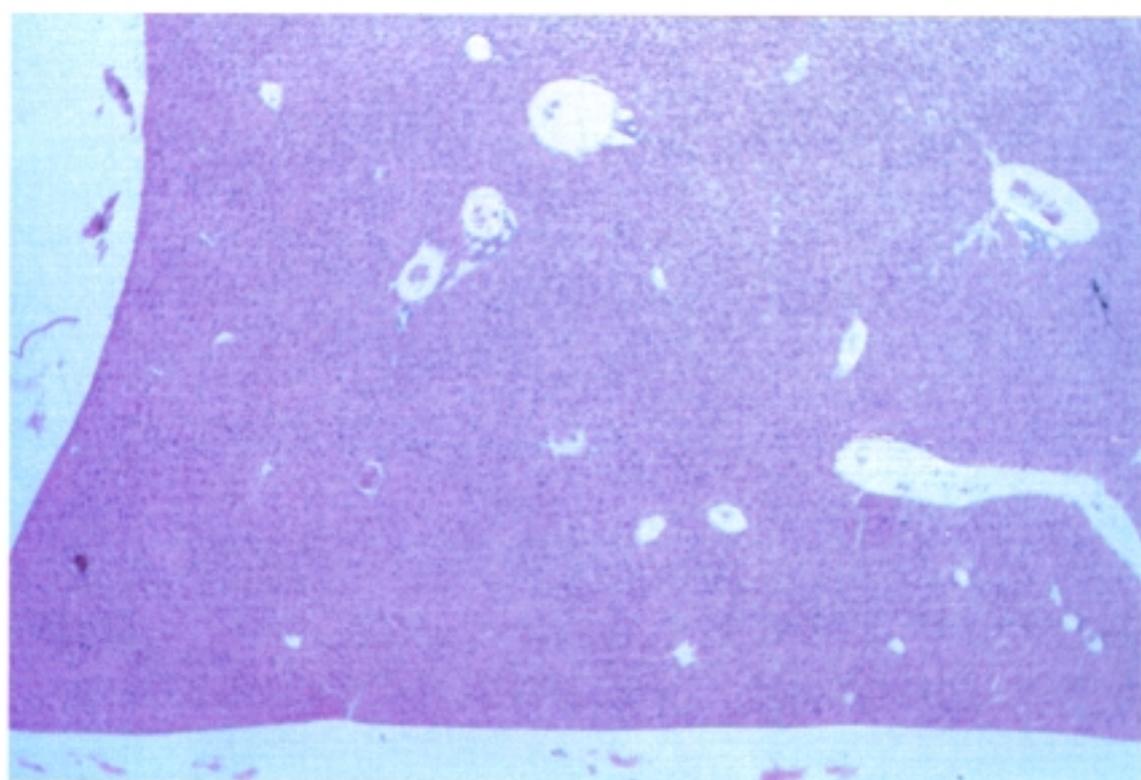
FIGURA - XXVI - IMAGEN HISTOLOGICA DEL  
ESTUDIO NECROPSICO DEL RIÑON DE UN  
RATON C57BL/6J INOCULADO CON MELANOMA

B<sub>16</sub> .

FIGURA - XXVII - LA IMAGEN ANTERIOR A MAS DETALLE.



**FIGURA - XXVIII - IMAGEN HISTOLOGICA PANORAMICA,**  
**CORRESPONDIENTE AL ESTUDIO NECROPSICO**  
**DEL HIGADO DE UN RATON C57BL/6J**  
**INOCULADO CON MELANOMA B<sub>16</sub> .**  
**No se evidencian alteraciones.**



#### 4.4. COMENTARIO.

Este estudio pone de manifiesto la esplenomegalia que acompaña al crecimiento tumoral, lo cual es un fenómeno bien establecido en la literatura (BARUAH, 1960; OLD, CLARKE & al, 1960).

Está también establecida la adenomegalia, como fenómeno acompañante del crecimiento tumoral (HOMBURGER, 1948; ANDREINI, DRASHER & al, 1955; SYMES, 1965). El que en nuestros estudios no se evidencie, obedece probablemente a que las adenomegalias no tumorales, son una respuesta del sistema inmune al tumor, en las fases iniciales y medias del mismo y la involución en su tamaño aumentado ocurriría en las fases finales del mismo.

La glomerulonefritis proliferativa encontrada en el riñón, es debido probablemente al depósito de complejos inmunes en los riñones en relación con la evolución del tumor (LUMENG, 1966; OLDSTONE, 1975). Es muy poco probable que este depósito de complejos inmunes renal sea debido a una enfermedad por complejos inmunes espontáneos y debido a la edad, ya que nuestros animales comenzaron los experimentos siempre entre 4 y 6 semanas de edad.

**B. INMUNOTERAPIA DEL MELANOMA MALIGNO**

## 1. INTRODUCCION.

Tal y como hemos señalado en la revisión específica, efectuada anteriormente, la inmunoterapia activa específica en el melanoma humano, ha sido un deseo no conseguido hasta el momento presente, de muchos investigadores. Al observar la poca eficacia de los extractos de melanoma autólogos se pensó en aumentar su eficacia mediante la copulación de los extractos con inmunógenos más potentes, ya sean bacterianos, víricos o químicos (TABLA III). Dentro de los diversos intentos, a nosotros nos ha interesado, particularmente, el método de la oncolisis viral, al cual ha dedicado gran atención el grupo de WALLACK & al (citados anteriormente). Este grupo ha usado el método, ya señalado, en el cual la yuxtaposición de un fuerte antígeno viral a un antígeno tumoral débil, induce una respuesta inmune intensa en este último. Teniendo en cuenta el interés de estos trabajos, pero basándonos fundamentalmente, en las ya antiguas experiencias de Burky, mencionadas con anterioridad, en las que utilizando estafilococos aureus toxina-positivos producía una autoinmunidad en el cristalino de conejos, tratamos de proponer una línea de investigación en inmunoterapia del melanoma maligno.

<b>INMUNOESTIMULANTES NO ESPECIFICOS</b>
--

<b>Micobacterias (BCG, PPD, MER)</b>
--------------------------------------

<b>Corynebacterium parvum</b>
-------------------------------

<b>Listeria monocytogenes</b>
-------------------------------

<b>Corynebacterium granulosum</b>
-----------------------------------

<b>Bordetella pertussis</b>
-----------------------------

<b>Brucella abortus</b>
-------------------------

<b>DNCB</b>
-------------

<b>Levamisole</b>
-------------------

<b>Interferón</b>
-------------------

**TABLA III.- INMUNOESTIMULANTES NO ESPECIFICOS  
EMPLEADOS EN INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL**

**2. ELECCION DEL GERMEN EXPERIMENTAL Y OBTENCION DEL PREPARADO PARA LA INMUNOTERAPIA.**

**2.1. ELECCION DEL GERMEN.**

**2.1.1. EL ESTAFILOCOCO AUREUS.**

**2.1.1.a. Introducción.**

Tratando de reproducir, lo más fielmente posible, el trabajo de Burky, mencionado ampliamente en la revisión específica de este trabajo, hemos utilizado estafilococos aureus productores de toxina.

**2.1.1.b. Material y Metodos.**

Se utilizaron las siguientes cepas de estafilococos aureus productores de toxinas : NC 05655 02 ; NC 07428 02; NC 05664 02. Las cepas fueron proporcionadas inicialmente por el Service Central Public Health Laboratory National Collection of Type Cultures (LONDON NW9, 5HT ENGLAND).

Los liofilizados con las distintas cepas, se reconstituyeron con caldo de tioglicolato.

Para preparar el caldo de tioglicolato se pusieron en suspensión 29,5 g de polvo (bio-Trypcase, L-cistina, Glucosa, Extracto de levadura, cloruro sódico, Tioglicolato sódico, agar) en 1 litro de agua destilada. Se mezclaron cuidadosamente hasta obtener una suspensión homogénea y se calentó agitando. Se llevó a ebullición 1 ó 2 minutos. A continuación se incubaron en estufa a 37<sup>0</sup> C. Una vez recuperados los microorganismos se cultivaron en un medio agar de sangre (Laboratorios BIOMERIEUX. MADRID. ESPAÑA). Para preparar el medio se procedió de la siguiente manera : se pusieron en suspensión 40 grs, de polvo (Infusión de corazón y músculo, bio-thione, cloruro sódico, agar) en 1 litro de agua destilada. Se dejó reposar 5 minutos y se mezcló después. Se calentó agitando frecuentemente. Se llevó a ebullición 1 minuto. Se repartió y esterilizó en autoclave a 120<sup>0</sup> C durante 20 minutos (en cantidades del orden de 100 ml).

Después del autoaclarado, se agitaron los frascos para asegurar una destrucción homogénea de los componentes del medio. El medio se repartió en tubos, esterilizándolo 15 minutos a 120<sup>0</sup> C Para su utilización se añadió del 5 a 10% de sangre de cordero (los resultados son mejores cuando se utiliza sangre de cordero, que con sangre de caballo o de conejo, (SNAVELY & BRAHIER, 1960), desfibrinada estéril al agar fundido estéril y enfriado después a 45<sup>0</sup> C aproximadamente. Se agitó por rotación para mezclar, evitando la formación de burbujas de aire en el agar. Se echó en placas Petri. Se sembró con las distintas cepas de estafilococos y se incubó a 37<sup>0</sup> C durante 18 a 24 horas, realizando a continuación el aislamiento de colonias. A partir de las colonias aisladas se realizó una suspensión con una turbidez de 1 en la escala de McFarland (aprox. 300 x 10<sup>6</sup> Unidades Formadoras de Colonias = UFC/ml).

De esta suspensión se realizaron 6 diluciones por cada cepa de estafilococos; las diluciones se prepararon en solución salina y en cada una de las 6 diluciones había respectivamente, un número medio de UFC de  $20 \times 10^3$ ;  $10 \times 10^3$ ;  $5 \times 10^3$ ;  $25 \times 10^2$ ;  $125 \times 10^1$ , 625 por mililitro. De cada una de estas diluciones se inoculó subcutáneamente 0,1 mililitros a grupos de 4 ratones C57BL/6J (machos y hembras, entre 4 y 6 semanas de edad). Los ratones fueron reinoculados con la misma dilución, misma vía y dosis, a las 3 semanas de la primera inoculación.

Previamente a las inoculaciones se había "rapado" el dorso de los ratones, en un área de unos 5 cm en cuyo centro se efectuaban las inoculaciones, con el fin de poder observar las posibles reacciones cutáneas en los animales inoculados y en caso positivo proceder a biopiar la zona "diana".

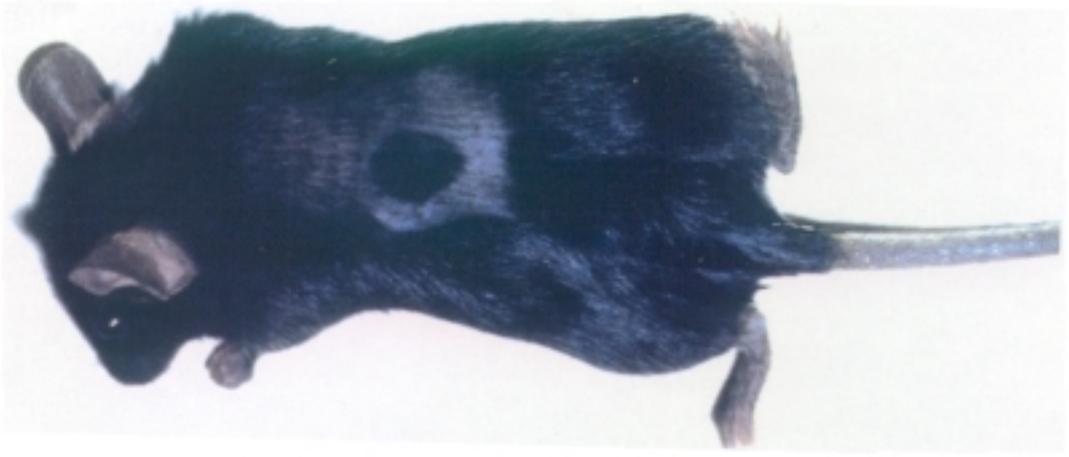
#### 2.1.1.c. Resultados clínicos e histológicos.

En aproximadamente la mitad de los ratones inoculados, se observaron reacciones cutáneas del tipo de eritema, induración e incluso necrosis en el área que circundaba al lugar de la inoculación. En la FIGURA 29 se ilustra un ejemplo de estas reacciones cutáneas. Después de la segunda reinoculación, la intensidad de las reacciones cutáneas, en los ratones en que ya habían tenido lugar con la primera inoculación, se intensificaron y aparecieron también lesiones cutáneas, del tipo ya descrito, en un porcentaje de animales que no habían reaccionado a la primera dosis. Así en algunos grupos el porcentaje de ratones afectados se elevó al 100%.

Probablemente los grupos en los que no se vieron afectados todos los ratones, obedeció a fallos en la técnica, ya que estos grupos en los que estuvieron

**FIGURA - XXIX - RATON C57BL/6J, CON DORSO RAPADO, Y CON**  
**PLACA RESULTANTE DE LA INOCULACION**  
**PREVIA CON ESTAFILOCOCO AUREUS TOXINA**  
**+**

Es evidente la placa necrótica que se  
ha formado en el lugar de la  
inoculación y zona circundante.



ausentes las reacciones cutáneas, no se correspondían con las menores diluciones utilizadas.

El estudio histológico de las lesiones aparecidas con la primera y segunda inoculación muestra en el primer caso "un absceso" con gran presencia de "cocos", sin reacción inflamatoria (no se observaba ningún neutrófilo) (FIGURAS 30, 31, 32) y en el segundo caso se observa "un absceso", con ciertas áreas neocróticas, con gran presencia de cocos. En este caso se evidenciaba la presencia de neutrófilos. (FIGURA 33)

En ninguno de los dos casos se observaron células plasmáticas (inmunidad humoral) ni linfocitos (inmunidad celular).

#### **2.1.1.d. Comentario.**

La nula respuesta inmunitaria celular, encontrada en los ratones inoculados con las distintas cepas y diluciones de

**FIGURA - XXX - IMAGEN HISTOLOGICA DE LA BIOPSIA**  
**PRACTICADA EN LA ZONA INOCULADA CON**  
**ESTAFILOCOCO AUREUS TOXINA +. 7 DIAS**  
**DESPUES DE LA INOCULACION.**

Se observa un absceso, con pelos de color negro, como el azabache, dentro del mismo.

**FIGURA - XXXI - IDEM A LA FIGURA - XXX - A MAS DETALLE.**

Es objetivable la presencia de bacterias, "cocos".

No se evidencia reacción inflamatoria, no observándose ningún neutrófilo.

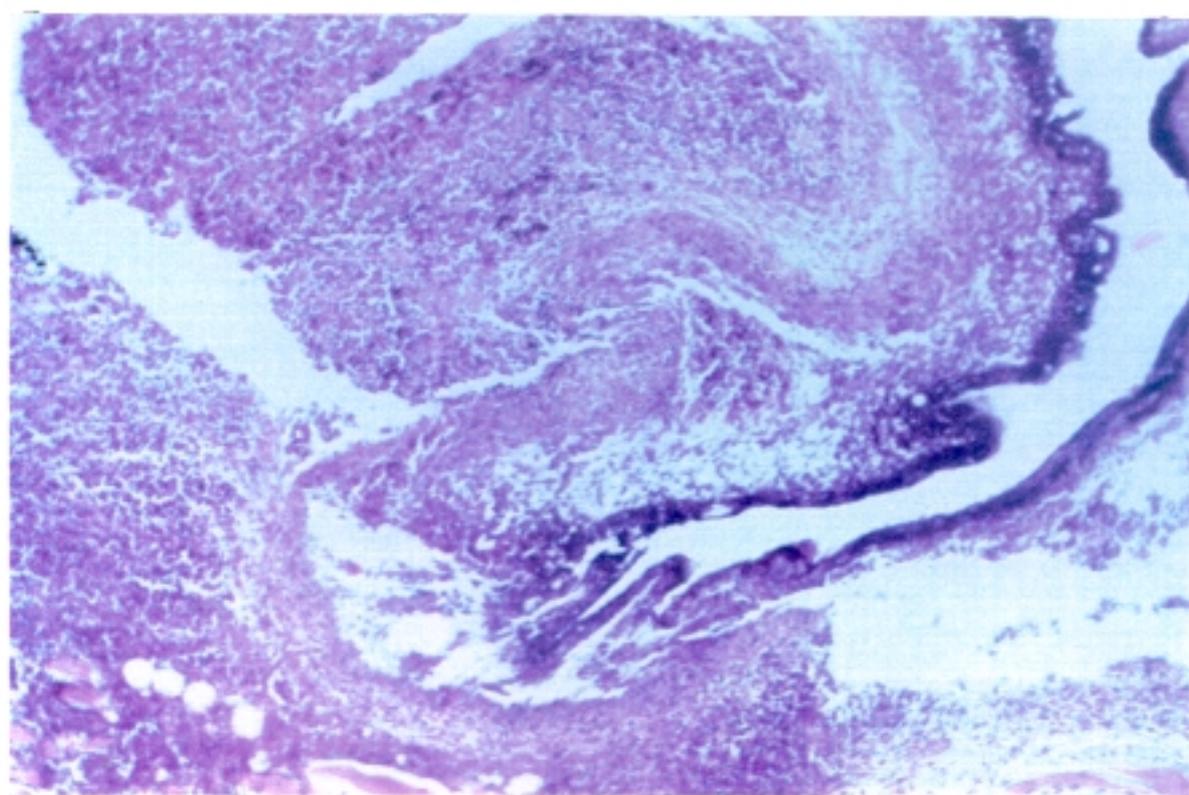
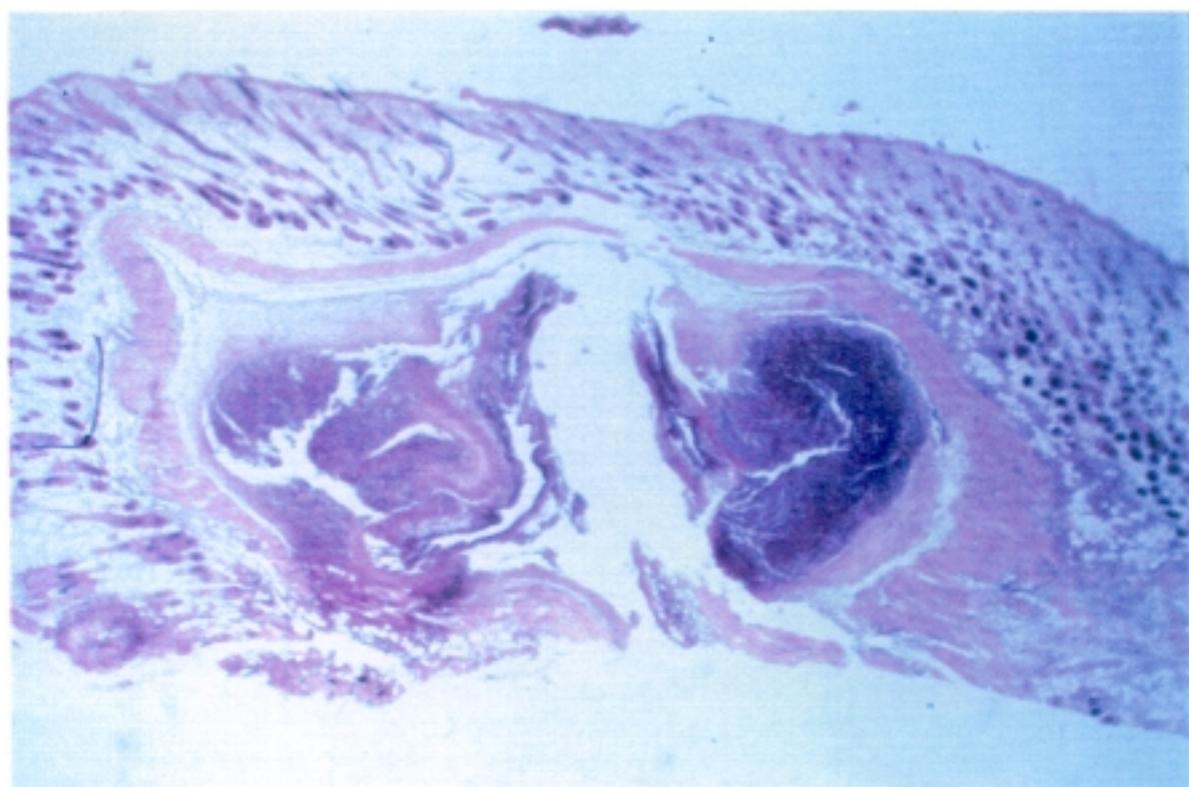
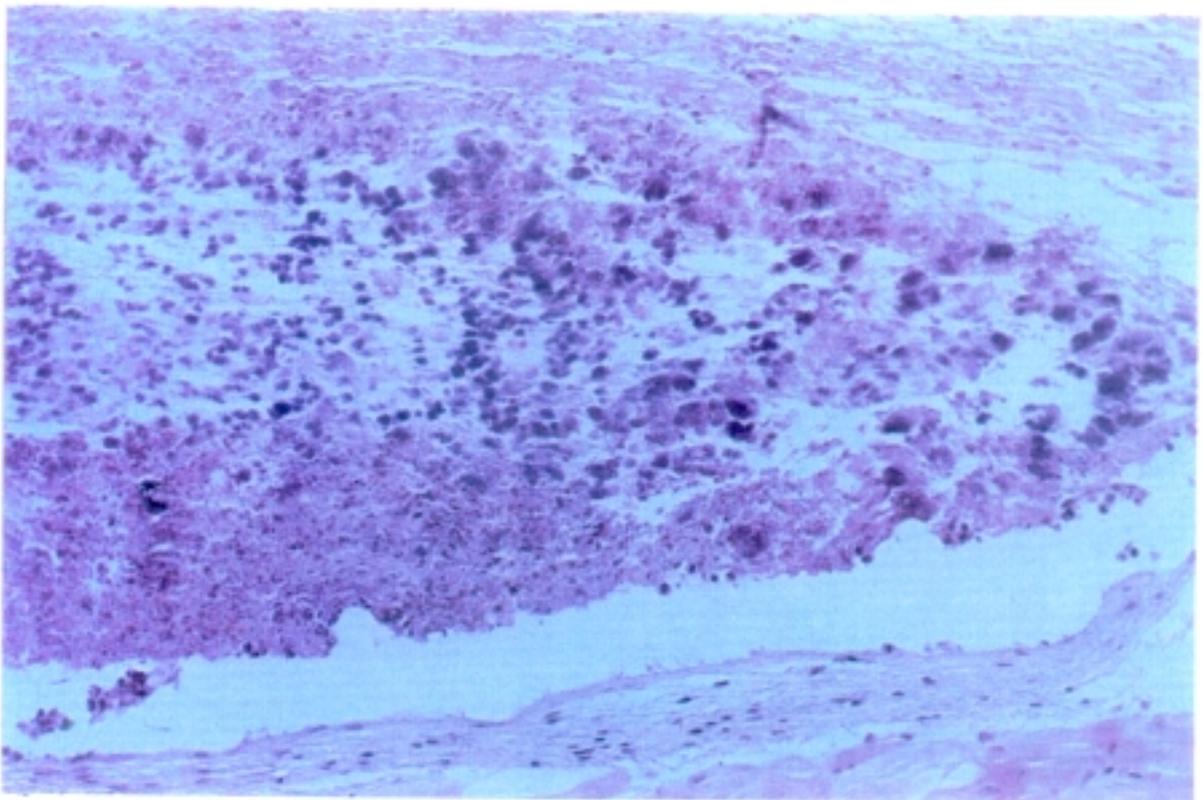
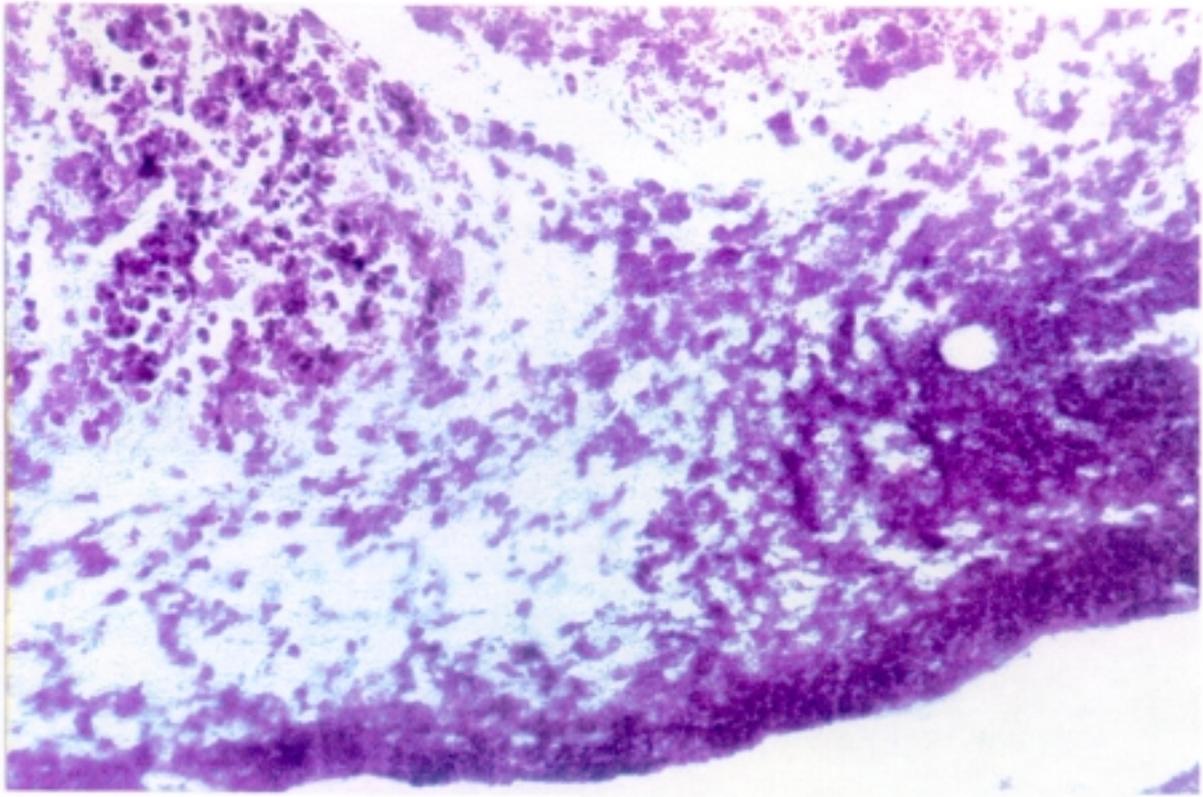


FIGURA - XXXII - LA IMAGEN DE LAS FIGURAS 30 Y 31 A MAS  
DETALLE.

FIGURA - XXXIII - IMAGEN HISTOLOGICA DE LA BIOPSIA  
PRACTICADA EN LA ZONA INOCULADA CON  
ESTAFILOCOCO AUREUS TOXINA +, A LOS  
12 DIAS DE LA INOCULACION.

Se observa ya reacción inflamatoria,  
con presencia de neutrófilos. Se  
evidencian algunas áreas necróticas  
en la región central del absceso. Hay  
gran presencia de "cocos".



estafilococo aureus toxina-positivo, como ha quedado anteriormente de manifiesto, nos ha llevado a desechar la utilización de este germen, para la preparación de la vacuna, en el método de inmunoterapia que más adelante proponemos.

Sin dejar de reseñar que probablemente la copulación del estafilococo con extractos de melanoma B<sub>16</sub> podría incrementar la respuesta inmune en el portador del tumor, hemos preferido buscar un germen fuertemente inmunógeno desde el punto de vista de la inmunidad celular.

#### **2.1.2. EL CORYNEBACTERIUM.**

##### **2.1.2.a. Introducción.**

El corynebacterium parvum también llamado corynebacterium granulosum, desde las observaciones realizadas por PREVOT, constatadas en los trabajos de ISRAEL Y HALPERN (ISRAEL & HALPERN, 1972) está considerado como un

inmunoestimulante muy activo (HALPERN & al, 1964, HALPERN & al. 1966; LAMENSANS & al 1968; FISCHER & al, 1970). El corynebacterium parvum ha sido ampliamente utilizado, tanto en animales, como en humanos, en inmunoterapia antitumoral en general ( HALPERN & al, 1973; WOODRUFF & al 1974; OLIVOTTO, 1974; SCOTT, 1974; FISCHER & al, 1976; RAO & al, 1977, etc) y en inmunoterapia antimelanoma (MITCHELL & al, 1977; PRESANT & al, 1979; TERRY, 1980; SPITLER & SAGEBIEL, 1980; BLUME & al, 1981; BALCH & al, 1982; BOWLIN & al, 1985).

En la TABLA IV se recogen los distintos modelos animales y tumorales en que se utilizó el corynebacterium parvum.

Los efectos del corynebacterium parvum en los cánceres humanos graves parecen prometedores, teniendo en cuenta además que la inmunoterapia con este adyuvante está desprovista de toxicidad incluso a largo plazo.

Su mecanismo de acción en el cáncer humano no está todavía del todo aclarado. ¿Cuáles son los factores que condicionan la acción inhibidora del *Corynebacterium parvum* en el cáncer?. Es difícil responder a esta pregunta, pero está claro que no está ligada únicamente a un factor particular. Así lo indica el efecto tan remarcable del *Corynebacterium parvum* en la enfermedad provocada por la reacción injerto contra huésped, en cuya acción se imbrican factores celulares, tales como la inhibición alogénica, la liberación de

TIPO DE TUMOR	ANIMAL	USO PROFILACTICO		USO TERAPEUTICO	
		SISTEMICO	LOCAL	SISTEMICO	LOCAL
carcinoma mamario	A - strain (S)	(SMITH,1968)	(WOODRUFF,71)	(WOODRUFF,73)	
carcinoma mamario	C3H/He (S)	(MILAR,1974)		(LIKHTE,73)	
carcinoma mamario	DBA/2 (S)				(MILAS,1968)
Sarcoma (metilcolantreno)	C57BL (S)				
CBAT-3 Fibrosarcoma	CBA (S)	(SMITH,1972)			
Leucemia Moloney	CDF1 (S)				(PEARSON,74)
Leucemia YC8	BALB/C (S)			(HALPERN,73)	
Hepatoma (etionina)	Hoodet rats (S)			(PROCTER,73)	
Melanoma-Fortner's	Hamster alogénico				(PASLIN,1974)

S= SINGENICO

TABLA IV.- USOS DEL CORYNEBACTERIUM PARVUM EN DISTINTOS MODELOS ANIMALES Y TUMORALES (REF. BIBLIOGRAFICAS)

citolisinas, la destrucción de células tumorales por los linfocitos inmunizados, etc. En la interpretación de los resultados terapéuticos, conviene tener en cuenta todos estos factores (ISRAEL & HALPERN, citados anteriormente).

#### 2.1.2.b. Material y métodos.

Hemos utilizado la cepa de *Corynebacterium parvum* CNG (134). Dicha cepa fue proporcionada inicialmente por el Dr. Robert Bomford (Department of Experimental Immunobiology Wellcome Beckenham Kent BR3 3B5 England).

Posteriormente se mantuvo en la Unidad de Microbiología (Dra Court) del Hospital Universitario San Carlos Madrid. España.

Para la reconstitución del microorganismo que nos fue enviado liofilizado, hemos empleado caldo de tioglicolato con resazurina (para su

preparación se procedió como en 2.1.1.b.). A continuación se pasó a medio de agar columbia y se cultivaron en una jarra para anaerobiosis. (Laboratorios BIOMERIEUX - MADRID - ESPAÑA). La jarra para anaerobiosis permitió obtener una atmósfera empobrecida en oxígeno garantizando un buen crecimiento del corynebacterium (gérmen anaerobio).

La anaerobiosis se obtiene por reacción catalítica del oxígeno atmosférico de la jarra y el hidrógeno producido por una bolsa generadora anaerobia, "H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>" GAS GENERATIN BOX.

Como catalizador se utilizó GASPAC Anaerobic Jar (BECTON DICKINSON. BBL Microbiology Systems. Cockeysville USA). En estas condiciones, la atmósfera se enriquece igualmente en gas carbónico que favorece el desarrollo de estos gérmenes exigentes.

El proceso se realizó como sigue : primero se colocaron las placas Petri

con los gérmenes en su medio de cultivo dentro de la jarra. Segundo se introdujo un sobre indicador, previamente abierto. El viraje de azul a blanco indica la obtención de unas buenas condiciones de anaerobiosis, aunque para esto pueden necesitarse varias horas. Tercero, echamos una dosis de catalizador; cuarto, abrimos el sobre generador "H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>", le añadimos 10 ml de agua y rápidamente lo colocamos en posición vertical en la jarra; quinto, se cierra correctamente la jarra y sexto, se colocó la jarra en la estufa a 37<sup>0</sup> C.

El medio de cultivo utilizado, agar columbia, (Laboratorios BIOMERIEUX) se preparó poniendo 42,5 g de polvo (bio-polytone, bio-Lysat, bio-Myotone, almidón de maíz, cloruro sódico, agar) en agua destilada. Se mezcló y disolvió calentando suavemente y agitando con frecuencia. Se llevó a ebullición un minuto. Se distribuyó y esterilizó en autoclave 15 minutos a 118<sup>0</sup> C.

Después se añadió sangre. Una vez obtenidas colonias aisladas, se realizaron suspensiones con una turbidez de 1 en la escala de McFarland y a continuación se prepararon 4 diluciones, con un número medio de UFC de  $10 \times 10^3$  .  $5 \times 10^3$  ,  $25 \times 10^2$  ,  $125 \times 10^1$  . A continuación estas diluciones se inocularon subcutáneamente, 0,1 ml, en grupos de 4 ratones C57BL/6J (machos y hembras, entre 4 y 6 semanas de edad) por cada dilución.

#### 2.1.2.c. Resultados.

Clinicamente las reacciones cutáneas no variaron en su morfología de las observadas con la inoculación de estafilococos, pero en este caso el número de ratones afectados fue del 100%. Se biopsiaron, aleatoriamente, el 50% de los ratones inoculados.

El estudio histológico de las biopsias practicadas, mostró imágenes de absceso , con abundante número de

linfocitos, tal como se observa en la  
FIGURA - 34

No se evidenciaron datos de toxicidad sistémica, lo que coincide con lo ya reseñado en la literatura, tanto en animales como en humanos (SCOTT, 1974).

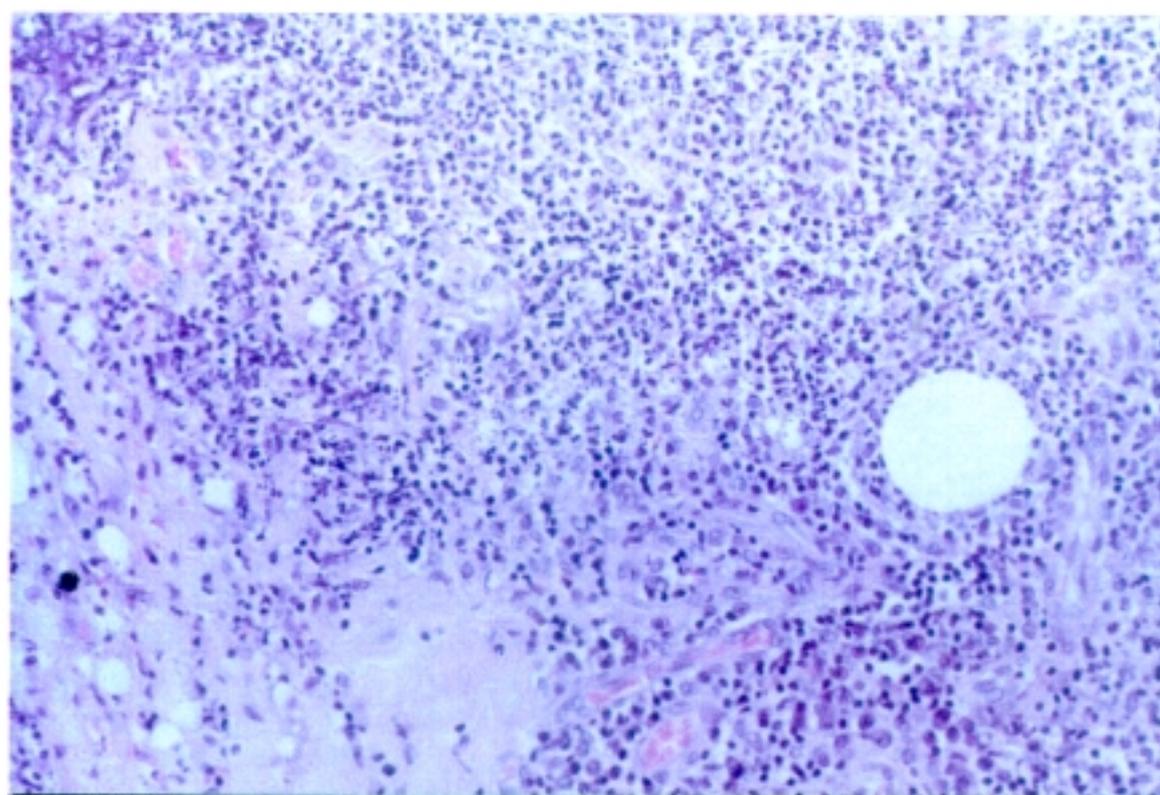
Al igual que, cuando se realizaron las inoculaciones con estafilococos, se "rapó" el dorso de los ratones, en un área de unos 5 cm<sup>2</sup>, en cuyo centro se realizaron las inoculaciones subcutáneas, con el fin de leer las posibles reacciones cutáneas y en su caso biopsiarlas.

#### 2.1.2.d. COMENTARIO.

Los resultados clínicos e histológicos obtenidos confirman el fuerte potencial inmunógeno celular del *corynebacterium parvum*. La abundante presencia de linfocitos, observada en las histologías practicadas, al contrario de lo que ocurría cuando se biopsiaba ratones

**FIGURA - XXXIV - IMAGEN HISTOLOGICA DE LA BIOPSIA**  
**PRACTICADA A UN RATON C57BL/6J, EN EL**  
**LUGAR EN EL QUE SE LE HABIA INOCULADO**  
**PREVIAMENTE CON CORYNEBACTERIUM**  
**PARVUM. 10 DIAS DE EVOLUCION.**

Observen el abundante infiltrado  
linfocitario existente a los 10 días  
de la inoculación del germen.



inoculados con estafilococos, en donde no observábamos linfocitos, parecen confirmar la hipótesis de que el corynebacterium (GNG 134) es un inmunoestimulante idoneo para la inmunoterapia antitumoral, desprovisto además de toxicidad sistémica cuando se inocula subcutáneamente en ratones C57BL/6J.

## **2.2. OBTENCION DEL PREPARADO PARA LA INMUNOTERAPIA.**

### **2.2.1. MATERIAL Y METODOS.**

La obtención del preparado para la inmunoterapia se realizó (siguiendo el método de Burky) de la siguiente forma : Se inocularon 4 ratones C57BL/6J el día 0 con  $2 \times 10^6$  células de melanoma B16. El día 22 se extirparon los 4 tumores, de sus respectivos portadores. Los procedimientos quirúrgicos empleados fueron los mismos que los descritos en el apartado 3.2.a. A continuación se eliminó el tejido "extramelanoma" : tejido fibroso, áreas necroticas, etc.

Posteriormente, los tumores así preparados, se introdujeron en agua hirviendo durante 30". A continuación, se volvió a "limpiar" el melanoma, eliminando las áreas necróticas que quedaban. Se introdujeron en 4 tubos conteniendo, cada uno 20cc de "hormone bouillon". Los tubos se incubaron durante 1 semana a una temperatura que varió desde la de la habitación hasta los 37° C. Se eliminó 1 tubo que se había contaminado y los 3 restantes se inocularon con *Corynebacterium parvum* (CNG, 134).

Después de 10 días de incubación a 37° C se juntó el contenido de los tubos, se les añadió cresol al 0,5%, se filtró la solución, a través de un filtro Berkefeld V. La masa resultante se utilizará como preparado para la inmunoterapia.

### **3. INMUNOTERAPIA ESPECIFICA ACTIVA POLIVALENTE.**

#### **3.1. INTRODUCCION.**

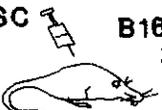
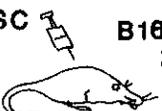
En una segunda fase del trabajo experimental, expuesto hasta ahora, se procederá a desarrollar un procedimiento de inmunoterapia específica activa polivalente, utilizando los materiales, métodos y protocolo experimental que se describen a continuación.

#### **3.2. MATERIAL Y METODOS.**

Se utilizarán ratones C57BL/6J, melanoma B<sub>16</sub> y el preparado para la inmunoterapia descrito anteriormente.

#### **3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.**

Se procederá de la siguiente manera, tal como se refleja en la FIGURA 35: se harán 9 lotes de 10 ratones cada uno, machos y hembras, entre 4 y 6 semanas de edad y con aparente buen estado de salud, al comienzo de los experimentos. Los lotes 1-A, 2-A, 3-A y 4-A se inocularán el día 0 con  $2 \times 10^6$  células de melanoma B<sub>16</sub>

	DIA		DIA	
GRUPO 1A.	0	SC  B16 $2 \times 10^6$	10	SC  PREPARADO INMUNOTERAPICO
GRUPO 2A.	0	SC  B16 $2 \times 10^6$	10	SC  SUSPENSION DE CELULAS DE MELANOMA B16 IRRADIADAS PREVIAMENTE
GRUPO 3A.	0	SC  B16 $2 \times 10^6$	10	SC  SUSPENSION DE CORYNEBACTERIUM PARVUM
GRUPO 4A.	0	SC  B16 $2 \times 10^6$	10	SC  MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO PARA EL CORYNEBACTERIUM
GRUPO 1B.	0	SC  PREPARADO INMUNOTERAPICO	10	SC  B16 $2 \times 10^6$
GRUPO 2B.	0	SC  SUSPENSION DE CELULAS DE MELANOMA B16 IRRADIADAS PREVIAMENTE	10	SC  B16 $2 \times 10^6$
GRUPO 3B.	0	SC  SUSPENSION DE CORYNEBACTERIUM PARVUM	10	SC  B16 $2 \times 10^6$
GRUPO 4B.	0	SC  MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO PARA EL CORYNEBACTERIUM	10	SC  B16 $2 \times 10^6$
GRUPO 5.	LOTE CONTROL			

SC= SUBCUTANEA

FIGURA XXXV.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INMUNOTERAPIA ACTIVA ESPECIFICA EN EL MELANOMA B16

tripsinizadas y viables. El día 10 el lote 1-A, se inoculará con el preparado inmunoterápico, ya mencionado, el lote 2-A con una suspensión de células tumorales de B<sub>16</sub> irradiadas; el lote 3-A con una suspensión de corynebacterium parvum (CNG 134); el lote 4-A con el medio de cultivo utilizado para el corynebacterium parvum. Los lotes 1-B, 2-B, 3-B y 4-B se inocularán el día 0, respectivamente con : el lote 1-B con el preparado inmunoterápico, el lote 2-B con una suspensión de células tumorales de B<sub>16</sub> irradiadas; el lote 3-B con una suspensión de corynebacterium parvum (CNG,134), el lote 4-B con el medio de cultivo utilizado para el corynebacterium parvum. Posteriormente el día 10 se inocularán los 4 lotes con  $2 \times 10^6$  células de melanoma B<sub>16</sub> tripsinizadas, y viables. El lote 5 se utilizará como control.

Se estudiarán los siguientes parámetros en todos los lotes comparándolos entre ellos y con el lote control : tiempo medio de supervivencia, diámetro medio del tumor desde que sea palpable, presencia o no de metástasis pulmonares y/o ganglionares , evolución,

cambios histológicos del tumor y de las metástasis, y cambios generales ocurridos en los diversos órganos de los animales utilizados.

#### 3.4. COMENTARIO.

Los datos acumulados a lo largo de este trabajo y en la bibliografía reseñada permiten albergar la esperanza de que la inmunoterapia antitumoral utilizando *corynebacterium parvum* sea útil en el tratamiento del cáncer. Como con cualquier forma de inmunoterapia, los efectos beneficiosos de la misma serán mayores cuanto más localizado y más pequeño sea el tumor (SCOTT, 1974 citado anteriormente).

El modo de acción del *corynebacterium parvum* es similar al de la BCG, en cuanto a la actividad antitumoral (ZBAR, 1971).

El *corynebacterium parvum* ha sido descrito tan eficaz como la BCG en la reducción de metástasis pulmonares en ratas (PROCTER, 1973) y considerablemente más efectivo en el tratamiento del carcinoma mamario del ratón (WOODRUFF, 1973) y del melanoma en el hamster

(PASLIN, 1974, citado anteriormente). SCOTT ha señalado, que si las condiciones exigen una inyección local de corynebacterium parvum en un lugar distante del tumor, como ocurriría en la enfermedad diseminada, se obtienen mejores resultados mezclando células tumorales inactivadas con corynebacterium parvum. Parece que esta modalidad inmunoterápica, aseguraría el incremento o desarrollo de la inmunidad antitumoral sistémica.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, creemos que el protocolo experimental que proponemos será útil para el estudio del procedimiento de inmunoterapia activa específica polivalente, anteriormente descrito, en melanomas B<sub>16</sub> trasplantados en su portador singénico : el ratón C57BL/6J.

**VIII. CONCLUSIONES GENERALES.**

1. El ratón C57BL/6J es idóneo como modelo animal, para el trasplante del melanoma B16, F<sub>1</sub> y F<sub>10</sub> habiendo prendido en nuestros estudios el 99 y 100% de los tumores transplantados respectivamente.

La presencia de tumores espontáneos de otro tipo y de otras patologías en este tipo de ratones es escasa (ROBERTS & al, 1976).

2. El melanoma B16 es un modelo experimental idóneo, ya que se trata de un tumor animal autóctono primario. Este tipo de tumores son considerados (HEWITT, 1979; RAPP, 1979; citados anteriormente) como buenos modelos del cáncer humano.

Es un tumor fácilmente trasplantable, mediante la inyección subcutánea de células tumorales viables.

(LI & al, 1984; KANCLERTZ & al, 1986).

3. Los tumores son palpables entre los 7 y 18 días de evolución. Cuanto menor es la dosis de células tumorales más tardía es la palpación del tumor, lo que está en discordancia con lo comunicado por otros autores (BERTALANFFI & al, 1984; GOMEZ & al. 1987; citado anteriormente) en cuanto a que los tumores son palpables entre los siete y diez días post-implante.

No existe ninguna regresión espontánea del tumor.

4. En la tercera parte de los animales inoculados con B16/F<sub>1</sub>, observamos ulceración de la epidermis, como ocurre con mucha frecuencia en otro tipo de melanomas experimentales, como el Harding-Passey en el mismo período de evolución tumoral y lo que está en discordancia con lo señalado por otros autores (GOMEZ & al, 1987 citados anteriormente) en cuanto a que el melanoma B16 no se ulcera nunca.

El tumor mata al huésped entre la tercera y quinta semanas post-implante no sobreviniendo ningún animal después del trigésimoquinto día.

5. Nuestros estudios demuestran la escasa presencia de pigmentación melánica en este tipo de tumor. (HU, 1981).

6. Nuestro trabajo confirma la poca capacidad metastatizante de este tumor, limitándose las metástasis, cuando se producen, a pulmones y/o ganglios linfáticos.

Las adenomegalias, que se encuentran a lo largo de la evolución tumoral son, en algunos casos, verdaderas metástasis con presencia de melanocitos neoplásicos y no siempre corresponden, como señalan algunos trabajos (SUGIURA, 1984) a manifestaciones reactivas del sistema defensivo del huésped.

7. Evidenciamos en nuestro trabajo el alto poder inmunógeno celular del *Corynebacterium parvum* o *Corynebacterium granulosum* (CNG, 134). El intenso infiltrado linfocitario encontrado en las biopsias practicadas en las placas necróticas que sobrevinieron en los ratones a los pocos días de la inoculación con distintas diluciones de *Corynebacterium parvum* lo confirma. Esto contrasta con la nula capacidad inmunógena celular de las cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de tóxina.

8. El melanoma B<sub>16</sub> es inmunogénico. Este hecho está evidenciado por el aumento de resistencia frente al tumor en animales inoculados previamente con células tumorales irradiadas.

La inmunoterapia no específica con productos bacterianos no aumenta los períodos libres de enfermedad o de supervivencia.

Nuestros trabajos confirman la hipótesis de GATENBY de que el melanoma B16 transplantado en el ratón C57BL/6J es un modelo experimental idóneo para inmunoterapia con corybacterium parvum (GATENBY, 1980, citado anteriormente)

A la vista de lo anterior concluimos que la inmunoterapia es un arma terapéutica todavía en vías de ser comprendida y utilizada positivamente.

**IX BIBLIOGRAFIA.**

## INTRODUCCION.

1. ALEXANDER, P. : In "Scientific Bases of Surgery", 2nd ed., Ed. by W.J. Irvine, Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1972.
2. BEAN, M.A. : In "Cáncer Achievements, Challenges and Prospects for the 1980s", Ed. by J.A. Burchenal & H.F. Oettgen, vol. I, Grune & Stratton, New York, 1981.
3. CASTRO, J.E. (Ed) : "Immunological Aspectos of Cancer", MTP Press Ltd, Lancaster, 1978.
4. HERBERMAN, R.B. (Ed): "Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors", Academic Press, New York, 1980.
5. LEYVA, F. : Aspectos Inmunobiológicos del Macrófago durante el crecimiento tumoral". Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense, 1983.
6. LAMOUREUX, G., POISSON, R. & DESRSERS, M. : In "BCG in Cancer Immunotherapy", Ed. by G. Lamoureux, R. Turcotte & V. Portelance, Grune. & Stratton, New York, 1976.
7. BYSTRYN, J.C. : Int. Journ of Dermat., 19, 375, 1980.
8. MORTON, D.L. : Surgery 64, 233, 1968.
9. HELLSTROM, K.E. : Adv. Cancer Res, 12, 167, 1969.

10. SOBER, A : Int. J. Dermat, 15, 1, 1976.
11. EVERSON, T.C : "Spontaneous regresion of cancer",  
London, Saunders, 1966.
12. BODENHAN, D.C. : Ann. Roy Coll. Surg. Engl. 43,  
218, 1968.
13. SUMMER, A.F : Cancer, 13, 79, 1960.
14. TEIMONSION Y: J. of the Nat. Cancer Inst., 53,  
1527, 1963.
15. BODURTH, J.H. : Canc. Res., 35, 189, 1975.
16. MCGOVERN, J.G.: Pathology, 7, 91, 1975.
17. STEWART, S.H : Cancer, 23, 1368, 1969.
18. FASS, L : Lancet, 1, 116, 1970.
19. BLUMING, A.Z: Cancer Inst., 48, 17. 1972.
20. HOLLINGSHEAD, A: Cancer, 34, 1235, 1974.
21. ARIEL, J.L : Cancer, 36, 1262, 1975.
22. LEWIS, M.G.: Brit. Med. Journal 3, 547, 1969.
23. NAIRN, R.C.: Med. J. Aust, 1, 397, 1972.
24. WOOD, A & BARTH, R.: J. Nat. Cancer Inst. 53, 309,  
1974.
25. LEWIS, M.G. : Nature 232, 52, 1971.
26. GUPTA. & MORTON, D.L. : Canc. Research, 35, 58,  
1975.
27. COCHRAN, A.J.: Lancet 1, 1340, 1972.
28. COCHRAN, A.J.: Brit. J. Cancer, 28, 77, 1973.
29. SEGAL, A.: Int. J. Cancer, 9, 417, 1972.
30. FALK, R.E.: Surgery 107, 261, 1973.

31. NAGEL, G.A. : Cancer Res., 30, 1828, 1970.
32. MAVLIGIT, G.M. & GUTTERMAN, J.U. : Cancer, 34, 1712, 1974.
33. MAVLIGIT, G.M. & GUTTERMAN, J.U. : Nature, 243, 188, 1973.
34. MAVLIGIT, G.M. & GUTTERMAN, J.U. : Int. J. Cancer, 14, 291, 1974.
35. AVIS, P. : J. Nat, Cancer Inst., 51, 1063, 1973.
36. FOSSATI, G. : J. Nat, Cancer Inst., 51, 667, 1973.
37. HELLSTROM, I. & HELLSTROM, K.E. : Int. J. Cancer, 7, 1, 1971.
38. CURRIE, G.A. : Brit. Med. Journ, 2, 305, 1971.
39. LEWIS, M.G. : "Immunological aspects of skin diseases", 172 Edited by Fry and Seah 1974.
40. SJÖGREM, H.O. : Proc. Natl. Acad. Scien., 68, 1372, 1971.
41. SJÖGREM, H.O. : Int. J. Cancer, 9, 274, 1972.
42. CURRIE, G.A. : Brit. J. Cancer, 26, 427, 1972.
43. BYSTRYN, J.C. : J. Invest.Derm., 63, 369, 1974.
44. BYSTRYN, J.C. : J. Immunol, 120, 96, 1978.
45. CEROTTINI, J.C. & BRUNNER, K.T. : Adv. Immunol, 18, 67, 1974.
46. LANDOLF, S. : J. Nat. Cancer Inst., 56, 1675, 1977.
47. BURNET, F.M. : Prog. Exp. Tum., 13, 1, 1970.
48. BRODER, S. WALDMANN, T.A : N. Engl. J. Med. 299, 1281-1335, 1978.

49. GRENE, M.I. : Immunol Today, 2 , . 23-25, 1981.
50. FERNANDEZ-CRUZ, E. : J. Immunol, 129, 1324-1329, 1982.
51. PLESCIA, O.J. : Proc. Nat. Acad. Sc.(USA), 72, 1848-1851, 1975.
52. BERENDT, M.J. : J. Exp. Med., 151, 69-82, 1980.
53. FERNANDEZ-CRUZ, E. :J. Immunol, 134, 3489-96, 1985.
54. FLOOD, P.M. : Proc. Ntl. Acad. Sci. (USA), 77, 2209-14, 1980.
55. MARRACK, P. & KAPPLER, J. : Immunology, 5 2-20, 1986.
56. FESTENSTEIN, H. & GARRIDO, F. : Nature, 322, 502-50, 1986.
57. NATALI, P.G. : Cancer Res, 45, 2883-89, 1985.
58. BYSTRIN, J. C. : "Shedding of tumor-associated antigens by viable human malignant melanoma cells"  
Proc the pigment Cell. Conf. Bael, Kaerger, p. 155, 1979.
59. HOUGHTON, R. : Immunodermatology, 7, 1981.
60. KOKOSCHKA, E.M. : Der Hautarzt, 30, 656-61, 1979.
61. KOKOSCHA, E.M.: Wien. Klin. Wochenschr. (Suppl.), 91, 5, 1979.
62. BALDWIN, R. W. & BYERS, V.S. : "Monoclonal antibodies for cancer detection and Therapy".  
Academic Press. London. New York Eds. 1985.

63. NATALI, P.G. : J. Cutaneous Pathol., 10, 514-528, 1983.
64. KANTOR, R.R. : Cancer Reseach, 46 5223-28, 1986.
65. G. DE LA CONCHA, E. : Rev. Cancer, I,97-101,1987.
66. FOLEY, E.S. : Cancer Res., 13, 835-42, 1953.
67. BURNET, F.M. : "Immunological Surveillance". Londres. Pergamon Press. 1970.
68. HENKART, P.A. : Ann. Rev. Immunol., 3, 31-58, 1985.
69. RYGAARD, J. & POULSEN, C.O. : Transplant. Rev. 28 43-61, 1976.
70. HERBERMANN, R.B. : Ann. Rev. Immunol. 4 651-680, 1986.
71. THOMPSON, P.G. : Pigment Cell, 1, 285, 1982.
72. GHOSE, T : Br. M.J. 3., 495, 1982.
73. BUMOL, T.F. : Hybridome 1, 283, 1982.
74. DIPPOL, W.G. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6114, 1989.
75. IRIE, R.F. : Cancer Res., 36, 3510, 1982.
76. MATHE, G., DAUSSET, J., HERVET, E., AMIEL, J.L. : J. Nat. Cancer. Inst., 33, 193, 1964.
77. MATHE, G. : "La chimioterapia des Cancers". Deuxième edition. L'Expansion, ed, 1966.
78. DIAZ-RUBIO, E. : Revista Clínica española, 139, 6, 1975.

79. DIAZ-RUBIO, E. : Revista Cáncer (Madrid), 1, 95-6, 1980.
80. AMIEL, J.L. & BERDET, M.: Rev. Franc. Clin. Biol., 14, 685, 1960.
81. BLUMING, A.Z., VOGEL, J.Z. & al. : Annals of Int. Medicine, 76, 405-11, 1972.
82. GUTTERMAN, J.V., MAVLIGIT, G.M., McBRIDRE, C.M. & al: Lancet 1, 1208-12, 1973.
83. GUTTERMAN, J.V., MAVLIGIT, G.M., McBRIDE, C.M. & al : Natl. Cancer Inst. Monogr. 39, 205-12, 1973.
84. IKONOPISOV, R.L. : "The International Symposium on Immunological reactions to melanoma antigens". Hannover, 1974.
85. MORTON, D.F., ELBER, F.R., HOLMES, E.C. & al. : Ann. Surg. 180, 635-643, 1974.
86. PATERSON, A.H., WILLIAMS, D.J. & al. : Can. Med. Assoc. I., 131, 744, 1984.
87. GUTTERMAN, J.V., MAVLIGIT, G.M., McBRIDE, C.M. : "Postoperative immunotherapy for recurrent malignant melanoma : An up-date report". In, Immunotherapy of cancer : Present status of trials in man". Terry W., Windhorst D., New York. Raven Press, 1978.

88. PINSKY, C.M., HIRSHAUT, H.Y. & al : "Surgical adjuvant immunotherapy with BCG." In. : "Immunotherapy of cancer Present status of trials in man." Terry, W., Windhorst, D., New York. Raven Pres, 1978.
89. KOKOSCHKA, E.M. : Der Hautarzt, 30, 656-61, 1979.
90. ISRAEL, L. & HALPERN, B.: Nouv. Presse Med., 1, 19-23, 1972.
91. GUTTERMAN, J.V., MAVLIGIT, G.M., & al : Cancer Treat. Rep. 60 177-182, 1976.
92. LAGRANGE, P.H., MACKANESS, G.B., MILLER, T.E. : J. Exp. Med., 139, 1529-1539, 1974.
93. GUTTERMAN, J.V., MAVLIGIT, G.M., & al : N. Engl. J. Med., 291, 592-97, 1974.
94. KOKOSCHKA, E.M., LUGER, T.H., MICKSCHE, M. : Onkologie, 1, 98-103, 1978.
95. CONSTANZI, J.J. : Cancer Treat. Rep., 60, 189, 1976.
96. VERONESI, U. & al : Tumori, 70, 41-8, 1984.
97. COLEY, W.B. : Surg. Gynecol. Obstet., 13, 174-190, 1911.
98. ROSENBERG, S.A., & HERBERT, J.R. : "Inmunoterapia intralesional del melanoma con BCG" En "Inmunoterapia en enfermedades malignas" Clínicas Médicas, mayo, 1976.

99. UNANUE, E.R. : Adv. Immunol., 15, 95, 1972.
100. IKONOPISOV, K., LEWIS, M.G. & HUNTER-CRAIG, I.D. :  
Brit. Med. J., 2, 752-54, 1970.
101. CURRIE, G.A., LEJEUNE, F., FAIRLEY, G.H. : Brit.  
J. Cancer, 28, 25-35, 1973.
102. GRAHAM, J.B. & GRAHAM, R.M. : Surg. Gynec.  
Obstet., 114, 1, 1962.
103. CUNNINGHAM, T.J., OLSON, K.B. & al : Cancer 24,  
932, 1969.
104. MCCOY, J.L., FEFER, A. & GLYNN, J.P. : Cancer  
Res., 27, 2267, 1967.
105. KOKOSCHA, E.M. MICKSCHE, M. : Pigm. Cell. 4,  
97-102, 1978.
106. KOKOSCHA, E.M., MICKSCHE, M. : Wien. Klin.  
Wochenschr. (suppl.) 91, 5, 1979.
107. HUMPREY, L.J., TASCHLER-COLLINS, S., & al : Journ  
of Surg. Oncology, 25, 303-305, 1984.
108. CALKINS, E.R., SONDAK, V.K., & al : Am. Soc. Cli.  
Oncol., 4, 259, 1984.
109. MASTRANGELO, M.J., BERD, D., MAGUIRE, H.C. Jr. :  
Cancer Treat Rep. 68, 207-219, 1984.
110. LIVINGSTON, P.O., KAE LIN, K. : Cancer 56,  
2194-2200, 1985.

111. SIEGLER, H.F., COX, E. & al. : Ann. Surg. 190, 366-372, 1979.
112. BYSTRYN, J.C., : Dermatol. Clin., 3, 327-334, 1985.
113. BYSTRYN, J.C., VALENTINE, F.B. & BERNSTEIN, P. : "Tumor antigen heterogeneity and specific immunotherapy of melanoma". In, Bagnara J., Klaus S.N., & al. : Eds Pigment Cell. Tokyo, 1985.
114. BYSTRYN, J.C., BERNSTEIN, P. & al : Clin. Res., 33, 628, 1985.
115. BYSTRYN, J.C., JACOBSEN, S., & al. : J. Biol. Response Mod., 5, 211-224, 1986.
116. BYSTRIN, J.C., RUTH, M.N., & al. : Cancer 61, 1065-1070, 1988.
117. CZAJKOWSKI, N.P., ROSENBLAT, M. & al. : Lancet, 2, 905, 1972.
118. CUNNINGHAM, J.J., OLSON, K.B., & al. : Cancer 24, 932, 1969.
119. HOUGHTON, A.N., & al. : "Immunodermatology". In "Comprehensive Immunology". Good, R.A., & Day, S.B., 7, 552, 1981.
120. SHARPLES, G.R., DAVIES, M.C. & COX, H.R. : Proc. Soc. Exp. Med., 73, 270-75, 1950.
121. KOPROWSKI, H., LOVE R., DOPPROWSKA, I. : Rep. Biol. Med., 15, 559-76, 1957.

122. LINDENMANN, J., KLEIN, P. : J. Exp. Med., 126, 93-108, 1967.
123. MURRAY, D.R., CASSEL, W., & al. : Cancer, 40, 680-6, 1977.
124. WALLACK, M.K., STEPLEWSKI, A. & al. : Cancer, 39, 560-4, 1977.
125. WALLACK, M.K. : Cancer, 23, 273-83, 1979.
126. WALLACK, M.K. : Cancer Immunol. Immunother. 12, 1-4, 1981.
127. WALLACK, M.K., MEYER, A. & al. : J. of Biological Response Modifiers, 2, 586-96, 1983.
128. WALLACK, M.K. & MICHAELIDES, M. : Surgery, 10, 791, 1984.
129. PRAGER, M.D. & BAECHEL, I.S. : "Methods for modification of cancer cells to enhance their antigenicity". In "Methods in Cancer Research". H. Busch ed. Academic Pres. N.Y. 339, 1973.
130. PRAGER, M.D. : Biomedicine, 18, 261, 1973.
131. CURRIE, G.A. & BAGSHAW, K.D. : Brit. J. Cancer, 23, 141, 1969.
132. SANFORD, B.H. & CONDINGTON, J.F. : Tissue Antigens, 1, 153, 1971.
133. SIMMONS, R.F., RIOS, A. & RAY, P.K. : Nature 231, 179, 1971.
134. GORER, P.A. & AMOS, D.B. : Cancer Res., 16, 338, 1956.

135. NAGEL, G.A. : Rev. Med. Suiza, 31, 824-29, 1970.
136. DULLENS, H.F., WEGERDE, R.A. & al. : Eur. J. Cancer, 15, 69-75, 1979.
137. GHISEM, S.T., NORVELL, A., & al. : Brit. Med. Jour. 3, 495-99, 1972.
138. HELLSTROM, I., BROWN, J.P., & HELLSTROM, K.E. : J. of Immun., 127, 1, 1981.
139. HELLSTROM, I., BRANKOVAN, V., & HELLSTROM, K.E.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1499-1502, 1985.
140. ROSENBERG, S.A., EISENTHAL, A. : Cancer. Res., 47, 2771-2776, 1987.
141. ALEXANDER, P. : Canc. Res. 34, 2077-2082, 1974.
142. NADLER, S.H. & MOORE, G.E. : Geriatrics, 23, 150-153, 1968.
143. FRIDMAN, S.H. & KEURILSKY, F.M. : Nature, 5, 224-27, 1969.
144. MORTON, D.J. & MALMGREN, R.A. : Science, 162, 1279, 1968.
145. BALSARI, A., TONA, M.P. & al. : Int. J. Cancer, 38, 923-27, 1986.
146. ROSENBERG, S.A., LOTZE, M.T. & al. : Sugery, 100, 262-272, 1986.
147. ROSENBERG, S.A., LOTZE, M.T. & al. : N. Engl. J. Med., 316, 889-897, 1987.
148. BALSARI, A., FOSSATI, G. & al. : Brit. J. Cancer, 52, 73-80, 1985.

149. HERSEY, P., MACDONALD, M., & al. : Cancer Immunology Immunotherapy, 22, 15-23, 1986.
150. MUUL, L.M., SPIESS, J. & al. : J. Immunology. 138, 989-995, 1987.
151. SLINGLUFF, C.L., TIMOTHY, L. & al. : Arch. surg., 122, 1407-11, 1987.
152. ALEXAMDER, P., DELORME, E.J., & HALL, J.G. : "Stimulation of antitumor activity of the host with RNA from immune lymphocytes". In "Nucleic Acids in Immunology". J. Plescia & W. Brown Eds. Springer-Verlag. N.Y. 527, 1968.
153. ALEXANDER, P., DELORME, E.J. & al. : Nature 213, 569, 1967.
154. RANJIT, S.P. & LALA, K.: J. Exp. Med., 165, 14-28, 1987.
155. SILAGI, S., DUTDOWSK, R. & SCHAEFER, A. : Int. J. Cancer, 41, 315-322, 1988.
156. THATCHER, P., DAZZI, T. & al. : Brit. Journ. of Cancer, 60, 770-4, 1989.
157. LOPEZ-BRAN, E., ROBLEDO, A. & al.: Medic. Cut. ILA, 17, 269-273, 1989.
158. CREAGAN, E.T., FRYTAK, S. & al. : Cancer, 64, 1034-1037, 1989.
159. OSANTO, S., JANSEN, R. & al. : Int. Journal Cancer, 43, 1001-1006, 1989.

160. SERTOLI, M.R., BERNENGO, M.G. & al. : Oncology, 46, 96-98, 1989.
161. RÖCKL, H. : DerHautarzt 7 Jahrg. Heft., 2, 70, 1956.
162. RÖCKL, H. : DerHautarzt 7 Heft, 6, 249, 1956.
163. DARIER, J. : Ann. de Dermat. et Syph., 7, 1431, 1896.
164. AUDRY, C. : Bull. Soc. Franç. de Dermat. et syph., 13, 118, 1902.
165. RAVAUT, P.H. Y RABEAU, I. : Presse. med., 1932, 1925.
166. KICHERAT, M., LANSIEN, J., DERAUX, E. : Bull. Soc. Franç. Derm., 37, 139, 1930.
167. MONTLAUR, M. : Zit. nach. G. Miescher, Wien. Klin. Wschr, 1949.
168. RAJKA, E. : Acta Médica. hung., 2, 124, 1951.
169. JADASSONH, J. : Dermatologie. Wien u. Bern, 1938.
170. GUTH, E.L. : J. Immunol., 14, 312, 1933.
171. HOPKINS, H. & BURKY, E.L. : Arch. Derm. Syph. New York, 49, 124, 1944.
172. LANDSTEINER, K. & JACOBS, J. : J. Exper. Med. 64, 625, 1936.
173. BURKY, E.L. : J. Immunol, 25, 419, 1933.
174. BURKY, E.L. : Arch. Ophthal. 12, 536, 1934.
175. BURKY, E.L. : J. Allergy, 5, 466, 1934.

176. SALVIN, S.B. & CHAPTER, V. : "Advances in Biology of Skin", Vol XI, Immunology and skin Edited by W. Montagna and R.E. Billingham, 1969.
177. SAIZ MORENO, L., G. DE OSMA, J.L. & COMPAIRE, C. : "Animales de Laboratorio". Colección de Monografías Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, 39. Madrid 1983.
178. MANUEL TECHNIQUE : ANIMAUX DE LABORATOIRE. Laboratoire Iffa CREDO. Domaine des ONCINS. 69210 L'ARBRESLE. FRANCIA 1987.
179. FOULDS, L. : Cancer Res, 14, 327, 1954.
180. HEWITT, H.B. : Cancer Res., 39, 4286, 1979.
181. RAPP, H.J. : Cancer Res., 39, 4285, 1979.
182. MURPHY, E.D. : In "Biology of the Laboratory Mouse" Ed. by E.L. Green, McGraw Hill, N.Y., 1966.
183. VICENTE, V., OCHOTORENA, M.M., & al. : Actas. Dermo. sif., 79, 803-807, 1988.
184. GOMEZ, M., HERNANDEZ, GIL, A. & al. : Actas. Dermo-sif., 11-12, 755-761, 1987.
185. BERTALANFFI, F.D. & McASKILL, C. : J. Nat. Cancer Inst., 32, 534-45, 1984.
186. YAMADA, K., SOMAYA, T. & SHIMIDA, S. : J. Invest. Dermatol., 85, 43-46, 1985.
187. MAEKAWA, A. & KISHIMOTO, H. : Nogoya Med. J., 16, 51-58, 1970.

188. **SUGIURA, D.:** "The effects of various physical and chemical factors on transplantable mouse melanoma". In "Biology of melanoma". New York Acad. Sc., 4, 369-387, 1948.
189. **BARVAH, B.D. :** Cancer Res, 20, 1184, 1960.
190. **OLD, L.J., CLARKE, D.A. & al. :** Ann N.Y. Acad. Sc., 88, 264, 1960.
191. **HOMBURGER, F. :** Science, 107, 648, 1948.
192. **ANDREINI, P., DRASHER, M.L. & al. :** J. Exp. Med., 102, 199, 1955.
193. **SYMES, M.O. :** Brit. J. Cancer, 19, 181, 1965.
194. **LUMENG, J. & MORAN, J.F. :** Ann. Int. Med., 65, 1266, 1966.
195. **OLDSTONE, M.B.A. :** J. Natl. Cancer Inst., 54, 223, 1975.
196. **SNAVELY, J.G., BRAHIER, J. :** Am. J clin. Pathol, 32, 511-5, 1960.
197. **ISRAEL L. & HALPERN, B. :** La Nouvelle Presse médicale, 1, 19-23, 1972.
198. **HALPERN, B., PREVOT, A.R. & al. :** J. reticulo endoth. Soc., 1, 77, 1964.
199. **HALPERN, B., BIOZZI, G. & al. :** Nature (Londres), 212, 853, 1966.
200. **LAMENSANS, A., STIFFEL, C. & al. :** Rev. franç et Clin-Biol., 13, 773, 1968.
201. **FISCHER, J.C., WILLIAM, R. & al. :** Cancer, 26, 1379, 1970.

202. HALPERN, B., FRAY A., & al. : "Corynebacterium parvum, a potent immunostimulant in experimental infections and malignancies". In : Immunopotential Ciba Found Symp., 18, 217-234, 1973.
203. WOODRUFF M.F.A., McBRIDGE, W.H. & DUNBAR, N. : Clin. Exp. Immunol., 17, 509-515, 1974.
204. OLIVOTTO, M. & BOMFORD, R. : Int. J. Cancer, 13, 478-88, 1974.
205. SCOTT, M.T. : Cell Immunol., 13: 251-263, 1974.
206. FISCHER, B., RUBIN H., & al : Cancer, 38 119-130, 1976.
207. RAO, B., WANEBO, H.J. & al. : Cancer, 39 514-526, 1977.
208. MITCHELL, M.S., MOKYR, M.B. & DAVIS, J.M. : J. Clin. Invest., 59, 1017-1026, 1977.
209. PRESANT, C.A., BARTOLUCCI, A.A. & al. : Cancer, 44, 899-905, 1979.
210. TERRY, W.D. : N.Engl. J. Med., 303, 1174-1175, 1980.
211. SPITLER L.E. & SAGEBIEL, R. : N.Engl. J. Med., 303, 1143-1147, 1980.
212. BLUME, M.R., ROSENBAUM, E.H. & al.: Cancer, 47, 882-888, 1981.
213. BOWLIM, T.L. & al. : Cancer Immunol. Immunother., 20, 214-8, 1985.

214. SMIT, L.H. & WOODRUFF, M.F.A. : Nature, 219,  
197-8, 1968.
215. WOODRUFF, M.F.A. & INCHLEY, M.P. : Br. J. Cancer,  
25, 584-593, 1971.
216. WOODRUFF, M.F.A., DUNBAR, N. & CHAFFAR, A. : Proc.  
R. Soc. Lond. (Biol), 184, 97-102, 1973.
217. MILAR, L., HUNTER, M., & WITHERS, H.R. : Cancer  
Res, 34, 613-620, 1974.
218. LIKHTE, W., HALPERN, B.N. : Cancer Res. 34,  
341-4, 1974.
219. SMITH, L.H. & WODRUFF, M.F.A. : Nature, 219 ,  
197-8, 1968.
220. PEARSON, J.W., PEARSON, G.R. & al. : Cancer Res.,  
32, 904-7, 1972.
221. HALPERN, B, FRAY, A. & al. : CR Acad. Sci (D)  
(Paris), 276, 1911-5, 1973.
222. PROCTER, J., RUDENSTAM, C.M. & ALEXANDER, P. :  
Biomedicine, 19, 248-252, 1973.
223. PASLIN, D., DIMITROV, M. & HEATON, C. : J. Natl.  
Cancer. Inst., 52, 571-3, 1974.
224. SCOTT, T.M. : Sem.in Onc.,1, 367-378, 1974.
225. ZBAR, B., BERNSTEIN, I.D. & RAPP, H.J. : J. Natl.  
Cancer Inst., 46, 831-839, 1971.
226. WOODRUF, M.F.A. & DUMBAR, M. : "The effect of  
corynebacterium parvum and other reticulo  
endothelial stimulants on transplanted tumors in  
mice". In : Immunopotential Ciba Found.

227. ROBERTS, A., & THOMPSON, J.S. : "Imbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research". In Panlab, S.L., B, 313-327, 1976.
228. WOSKO, J.J., FERRARA, D.T., SARTORI, L.S. : Cancer Letters, 24 , 57-63, 1984.
229. LI, X., PAULOS, G. & al. : Am. J. Pathol., 115 , 403-411, 1984.
230. KANCLERZ, A., & CHAPMAN, J.D. : Br. J. Cancer, 54, 693-698, 1986.
231. HU, F. : "Melanocyte cytology in skin, melanocytic nevi, and malignant melanoma. A review". In : Ackerman, A.B. (ed) : "The pathology of malignant melanoma", Masson, N.Y., 1-21, 1981.
232. DEMOPOULOS, H.B. & al. : Lab. Invest., 14, 109-121, 1965.

**X - ABREVIATURAS UTILIZADAS**

BCG -	Bacilo Calmette-Guérin
& -	Y
al. -	colaboradores
IgG o IGG -	Inmunoglobulina G
IgM o IGM -	Inmunoglobulina M
Fc -	Porción de una Inmunoglobulina
Fab -	Porción del Anticuerpo que se combina con el antígeno.
IL1 -	Interleuquina - 1 -
IL2 -	Interleuquina - 2 -
IFN - Y -	Interferón gamma
MHC -	Complejo mayor de histocompatibilidad
TSA -	Antígeno asociado al tumor
AAM -	Antígenos asociados al melanoma
CTL -	Linfocitos citotóxicos
LGL -	Linfocitos grandes granulares
ADCC -	Citotoxicidad celular dependiente de Anticuerpos
NK -	Natural Killer
HLA -	Antígeno de Histocompatibilidad
NC -	Citotóxicas naturales
TNF -	Factor de necrosis tumoral
OFA -	Antígeno oncofetal
MM -	Melanoma maligno
DNCB -	Dinitroclorobenceno
PPD -	Derivado proteico purificado
SRE -	Sistema Reticulo endotelial

Me -	Metil
IGGS -	Inmunoglobulinas
IL -	Interleuquina
RNA -	Acido ribonucleico
TP <sub>1</sub> -	Timosina alfa 4
E -	Estafilococo
Paba-Hea -	P-azobenzoatao-albúmina de huevo de gallina
BGG -	Gammaglobulina de BUCY
DFB -	Dinitrofluorobenceno
DNP-Hea -	Dinitrofenil - albúmina de huevo de gallina
MER -	Metanol extractable residue
STF -	Suero de ternera fetal
HBBS -	Solución salina balanceada de Hanks
DMSO -	Dimetilsulfóxido
UFC -	Unidades Formadoras de Colonias
CNG -	Corynebacterium granulosum o parvum.