

R. 10.760

T.D.  
6/85

1



LA INMUNIDAD EN LOS TUMORES  
INMUNOTERAPIA Y FACILITACION INMUNOLOGICA  
(ESTUDIO EXPERIMENTAL)

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía de José Antonio Sánchez Cousteau. Realizada en la I Cátedra de Patología y Clínica Médicas, Prof. Dr. D. Miguel - Garrido Peralta. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. Mayo, 1.979.



MIGUEL GARRIDO PERALTA, CATEDRATICO DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS (I). FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICO:

Que D. José Antonio Sánchez Cousteau, ha realizado esta Tesis Doctoral sobre "LA INMUNIDAD EN LOS TUMORES. INMUNOTERAPIA Y FACILITACION INMUNOLOGICA (ESTUDIO EXPERIMENTAL)", bajo mi dirección y co-dirección del Dr. Justo Alpañés en la I Cátedra de Patología y Clínica Médicas de la que soy Titular.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla a dos de Mayo de mil novecientos setenta y nueve.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "M. Garrido Peralta".

Facultad de Medicina de Sevilla  
Hospital Universitario  
1.<sup>a</sup> Cátedra de Patología Médica  
Departamento de Medicina Interna  
Prof. Miguel Garrido Peralta

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor Dr. D. Miguel Garrido Peralta. Sin su estímulo continuo y su exigente dirección este trabajo no se habría realizado.

Mi profundo agradecimiento al Dr. D. Enrique Justo Alpañés (Co-director) y al Dr. D. Diego Ledro Molina. Siempre tuve a mi disposición su ayuda y sus consejos.

Agradezco sinceramente al Profesor Dr. D. Hugo Galera Davidson y a todo su Departamento su importante colaboración en los estudios anatomopatológicos de esta Tesis Doctoral que fueron realizados en su Departamento.

Mi agradecimiento también al Dr. D. Rafael Fernández, Jefe del Animalario de nuestra Facultad de Medicina.

A todos que de un modo u otro me estimularon y me ayudaron para su realización les doy mi más sinceras gracias.

DEDICATORIA

A mis padres.

A mi hermano Jorge.

LA INMUNIDAD EN LOS TUMORES  
INMUNOTERAPIA Y FACILITACION INMUNOLOGICA.  
( ESTUDIO EXPERIMENTAL )

Cátedra de Patología y Clínica Médicas, (I)  
Prof. Dr. Miguel Garrido Peralta.

José Antonio Sánchez Cousteau.

INDICE

INDICE

I.-	INTRODUCCION.	9
II.-	MATERIAL Y METODOS.	70
III.-	RESULTADOS.	104
IV.-	DISCUSION.	140
V.-	CONCLUSIONES.	161
VI.-	RESUMEN.	165
VII.-	BIBLIOGRAFIA.	171

I.- INTRODUCCION.



Una amplia bibliografía ha recogido en los pasados años, experiencias favorables con el tratamiento inmunoterápico - de modelos experimentales tumorales. A partir de entonces, - hemos asistido a una rápida incorporación a la clínica ( 1 ) de tratamiento con inmunoadyuvantes, de indudables buenos - resultados en pocos casos (melanomas, leucosis) ( 2 )( 3 ); de dudosos resultados en la mayoría, y de resultados negativos en otros.

Sorprende la escasa repercusión que ha tenido en la práctica la teoría de la Inmunoestimulación del desarrollo de - los tumores, de PREHN y LAPPE ( 4 ) ya publicada en 1.971, cuyas inquietudes han sido secundadas sólo por un escaso número de trabajos experimentales de diversos autores ( 5 ) ( 6 ).( 7 ).

Nuestro trabajo, desea contribuir al mejor conocimiento de esta teoría de PREHN y LAPPE y al mismo tiempo, ofrecer/ investigación básica en este sentido. Asimismo, considerar/ el valor de la inmunoterapia, (uno de los pocos tratamientos con raíces etiopatogénicas), en nuestra lucha diaria contra la neoplasia.

Pasamos a ocuparnos de algunos aspectos especialmente - relacionados con nuestro trabajo.

## A.- LA INMUNOLOGIA EN LOS TUMORES.

Tras inducir en ratones, tumores con metilcolantreno, - FOLEY ( 8 ) en 1.953 y PREHN y MAIN ( 9 ) en 1.957 consiguen poner en evidencia, los antígenos específicos de este/ tumor inducido, siendo pues sus trabajos los primeros que - demostraron con una base real, la existencia de una respuesta inmune a una neoplasia.

Esta, ahora realidad, fué una hipótesis en la mente de/ muchos investigadores, desde primeros de siglo. La respuesta inmune a la neoplasia, es un hecho, cuya necesidad se - presentía, y sus manifestaciones externas parecían a veces/ confirmar esta hipótesis. Pero era necesario, demostrar de alguna forma inequívoca el proceso. Y los pioneros de la investigación de la inmunidad tumoral en las neoplasias experimentales, comenzaron a transplantar tumores inducidos a - animales de laboratorio.

La aparición de fuertes respuestas inmunitarias, les llenó de esperanzas. Tenía que ser posible evidenciar a los mediadores de esas respuestas que, creían no podrían ser otros

que los antígenos específicos del tumor. Pero cuando el rigor científico, les llevó a transplantar tejidos normales - entre los mismos animales, vieron con desencanto, como las/ mismas reacciones de rechazo, que se obtenían con el transplante de tejido tumoral, se reproducían con el tejido no/ neoplásico. Estaba claro, que las respuestas observadas - eran sólo la consecuencia de antígenos de histoincompatibilidad que ya existían en las células transplantadas.

Su error, consistió en el uso de animales de laboratorio no seleccionados, de forma que no existía una identidad genética entre el animal que donaba el transplante y el que lo recibiría y técnicas imperfectas.

Otros aspectos de la medicina, fueron arrastrando la - atención de los investigadores que tuvieron así otros motivos para olvidar la investigación de las respuestas inmunes a tumores. En los años 40, se publicó muy poco sobre el tema, que resurgiría a partir de los años 50 con FOLEY Y PREHN a la cabeza.

Sus brillantes éxitos iniciales, descansaban sobre todo, en una buena y exigente técnica de transplante y en sus conocimientos inmunitarios.

Consiguieron cepas endogámicas de animales de laboratorio, en los que tras años de cruzamientos, llegaron a conseguir, una homogeneidad genética de gemelos monocigóticos.

Este campo, libre de histo-incompatibilidades, y el empleo de sus buenas técnicas de transplante, pusieron los medios necesarios para que se evidenciasen los primeros "antígenos de transplantes específicos de tumores" (tumor specific transplantation antigens), que son ya designados clásicamente como T.S.T.A.

Estos antígenos serían demostrados no sólo en la mayoría de las neoplasias quimio-inducidas, sino que algunos años - más tarde, en 1.965 OLD ( 10 ), publica un trabajo, recogiendo la aparición de rechazos de tumores hasta entonces, - teóricamente producidos por virus, en animales que previamente habían sido inmunizados contra estos virus. SJÖGREN, - demuestra en 1.961 antígenos T.S.T.A. en células de tumores

provocados en el ratón por virus de polioma ( 11 ).

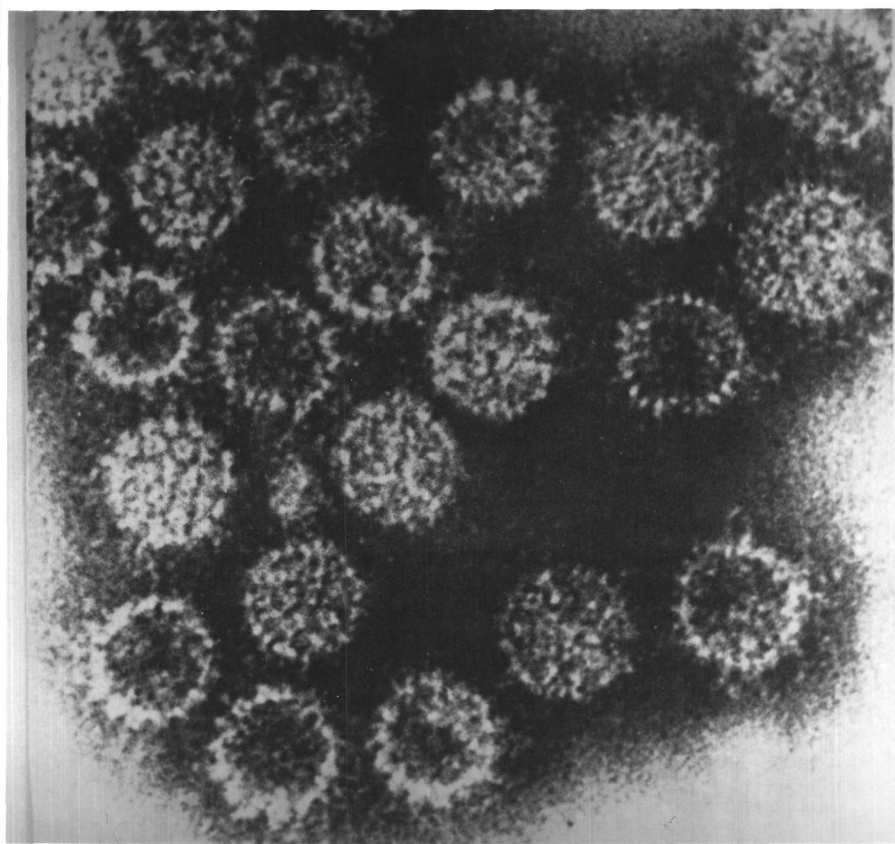
Estas experiencias al tiempo que demostraban la existencia de antígenos comunes de transplantes de tumores inducidos por ciertos virus de D.N.A., como el Polioma ( 10 ) ( - 11 ), el SU-40 y adenovirus, afianzaban el papel etiológico de esos virus en la génesis de estas neoplasias. Figura nº 1

TRENTIN ( 12 ), pública un trabajo en 1.962, demostrando que diversos adenovirus humanos, eran oncógenos en los roedores. El interés de este experimento, es indiscutible - si recordamos que generalmente, los virus que se han comportado como oncógenos para otras especies, lo han sido también para la especie de la que fueron aislados.

Es interesante el hecho, de que los antígenos T.S.T.A.- existente en tumores provocados por virus manifiesten reacción cruzada con cualquier otra célula tumoral provocada - por el mismo virus. Es decir, si a tres ratones se les inyecta virus de polioma, se desarrollará un tumor en cada ra tón, y cada tumor puede inmunizar eficazmente a un cuarto - ratón normal, contra los tumores de cualquiera de los otros

## FIGURA Nº 1

NEUTRALIZACION DE VIRUS DE POLIOMA, DE 400 ANGSTROMS DE DIAMETRO POR ANTICUERPOS, QUE SE VEN FORMANDO HALOS TENUES EN TORNO A LAS PARTICULAS ESFERICAS DEL VIRUS, LOS ANTICUERPOS ALTERAN LA ESTRUCTURA DE ESTE, SIENDO ASI MAS FACILMENTE EN GLOBADO POR LOS LEUCOCITOS. MICROFOTOGRAFIA. ALMEIDA (ONTARIO CANCER INSTITUTE) Y CINADES-HOWATSON (UNIVERSIDAD DE TORONTO).



dos ratones ( 13 ).

Parece, que los tumores provocados por virus DNA oncógenos, se comportan dentro de un mismo esquema inmunológico.- Pertenecen a este grupo de virus, el polioma, el SV40 y el/ adenovirus ( 10 ).

Sin embargo, en los animales que ya tienen desarrollado un tumor, no se consigue generalmente aislar el posible virus productor, ni aún en los casos, en los que tratándose de tumores inducidos por virus, estamos seguros, del papel/ de este agente oncógeno en la aparición del tumor: la explicación que parece más viable, es que cuando la célula infectada por el virus sufre la transformación maligna, el propio virus tiene su ciclo abortado y no sigue suplicandose.

Es verdad, que la existencia de una respuesta de rechazo a células tumorales, parece quedar largamente demostrada, tanto en los tumores inducidos por carcinógenos químicos, - como en los inducidos por virus.

En ambos, conocemos también a los mediadores de estas -

respuestas inmunes. El protagonismo parece corresponder a los T.S.T.A. de los linfocitos B (inmunidad humoral), entendidos de una forma un tanto simplista. Sin embargo, el íntimo mecanismo de producción de estas respuestas de rechazo, no son tan bien conocidas.

Parece ser, que para que se produzca la destrucción de células tumorales por los linfocitos T, es esencial un contacto íntimo entre ambas células. Los linfocitos, una vez fijados al lugar antigénico, en la superficie de la célula tumoral, producen un efecto lítico, ya no específico, que actúa lesionando la membrana celular de la célula neoplásica, ocasionándole la muerte.

Consecuencia de este posible mecanismo de acción es que se considere, a la densidad antigénica como un factor decisivo en estas reacciones.

Las células con mayor concentración de receptores antigénicos de superficie, están más expuestas a la lisis por anticuerpo, que las poseen una antigenicidad pobre. La existencia de pocos lugares receptores de antígeno, en la super



ficie de la célula tumoral, hace difícil, que anticuerpo y/ complemento se fijen y produzcan la rotura de la membrana - celular.

Los tumores provocados por carcinógenos químicos, parecen más fuertemente antigénicos que los provocados por agentes físicos.

También parece poseer una antigenicidad más intensa, los tumores que aparecen precozmente tras la inyección de un carcinógeno, que aquellos que lo hacen más tardíamente.

Otro detalle a tener en cuenta, es la modificación que/ en este aspecto, introduce la diferencia de especies: son - menos antigénicos, los tumores metilcolantreno inducidos en la rata y en los ratones, que cuando son los cobayas los - animales empleados.

En cuanto a las diferencias de comportamiento inmunitario de las neoplasias, OLD y BOYSE ( 14 ) publicaron en - 1.963 un trabajo, en el que demostraba que las células de - la leucosis murina y de los linfomas, son más sensibles al

anticuerpo citotóxico que las células de los tumores sólidos.

También se han observado, a partir de los estudios de OLD que la acción de la inmunidad celular, es superior a la de/ la inmunidad humoral ( 15 ).

Las células linfoides desensibilizadas ejercen un efecto inhibitor más eficaz que los anticuerpos humorales.

La destrucción específica de células blanco neoplásicas por células linfoides inmunes, ha sido demostrado por ROSE-  
NAN ( 16 ) en 1.966 y más específicamente por HELLSTROM en 1.971 ( 17 ).

Es muy importante la relación linfocitos T/ células tu-  
morales: niveles muy insuficientes de respuesta inmunitaria pueden dar lugar a efectos contrarios al deseado, es decir/ pueden potenciar el crecimiento tumoral. A medida que nos -  
adentremos en este trabajo iremos ampliando nuestra atención a esta interesante circunstancia.

Esta es la base de la "Teoría de Inmunoestimulación".-  
Esta "teoría", es una de las más interesantes hipótesis den

tro de la que integran el grupo que se conoce como "Mecanismos de escape", que tratan de justificar los comportamientos inmunitariamente paradójicos de ciertos tumores.

Tiene sus primeras bases en los trabajos de KALISS en 1.958 ( 18 ), que observó como pequeñas dosis de anticuerpos administradas pasivamente, lograban el crecimiento progresivo de un injerto tumoral. Años después, PREHN y LAPPE/ ( 4 ) afirman que respuesta inmunes mínimas, en lugar de presentar una reacción inicial contra el tumor, pueden paradójicamente potenciar su desarrollo. Este es el centro de la "Teoría de Inmunoestimulación" de PREHN ( 19 ), publicado en 1.972, en la que se mantiene, que el crecimiento tumoral, puede verse más facilitado por una reacción inmune mínima, que por una ausencia de inmunidad ( 20 ).

Las proporciones necesarias de linfocitos en relación con las células neoplásicas, para obtener una respuesta conveniente, parece ser de 200/1. Esta desproporción puede ser explicada en parte, ( 13 ) por el número pequeño de linfocitos que están sensibilizados ( células Killer), dentro de una población linfoide, tomada al azar para su estudio.

De estos últimos datos, puede sacarse en conclusión, -- que la inhibición del crecimiento tumoral, está influida - por diversos factores, de los que parecen ser los más impor-tantes: 1.- El número de linfocitos. 2.- El tipo de las células blanco. 3.- La especificidad de los linfocitos T por/ el antígeno celular. 4.- La especie animal del huésped.

Por diversos métodos se ha producido la inmunidad con-- tra el trasplante de tumores específicos, en animales de - experimentación: A.- La extirpación completa del tumor. B.- La inmunización con dosis elevadas de células tumorales - irradiadas. C.- La inyección de un cierto número de células tumorales viables en teoría incapaces de crear un tumor de/ crecimiento progresivo. D.- La estrangulación por su base - del tumor en crecimiento. E.- La inmunización por prepara-- dos solubles de T.S.T.A. ( 21 ), así como F.- El tratamien- to con coadyuvantes inmunológicos, como el bacilo de Calme- tte y Guerin atenuado (BCG), o la Neuroaminidasa del vibrio colerae (V.C.N.), métodos estos últimos, motivo de nuestro/ estudio en el tumor de Yoshida, con los que se especula que se produce una inmunidad más intensa, que con la inyección/ única de antígenos de tumores. Algunos de estos puntos, con

cretamente los A,B,C y F, serán más ampliamente comentados/  
a partir de nuestra propia experiencia en posteriores apar-  
tados de este trabajo.

## B.- ONCOGENESIS EXPERIMENTAL

Podríamos precisar que el precursor de la carcinogénesis química fué PERCIVAL POTT, que en 1.875 atribuye la alta incidencia de cáncer escrotal en los deshollinadores, a su exposición al hollín. En el laboratorio, parece que la primera inducción de un tumor por medios químicos, corresponde a YAMAGIWA, 1.918, que consigue la aparición de un tumor maligno en conejos a los que había pincelado las orejas con/ un derivado del alquitrán. La hipótesis de PERCIVAL POTT fué confirmada también por esos años en 1.922, 147 años después de su observación, PASSEY consigue inducir un cáncer cutá--neo en el ratón empleando extractos de hollín.

El factor común de estas sustancias capaces de desencadenar la aparición de tumores, parecía radicar en su estructura química, ya que todos eran hidrocarburos policíclicos. Sin embargo, aún hoy no podemos relacionar la estructura de un hidrocarburo, con su supuesto potencial cancerígeno.

Es decir, desconocemos el porqué, estos carcinógenos químicos producen los tumores.

Son varias las hipótesis que tratan de justificar este hecho evidente. Hemos escogido las tres que nos parecen más en armonía con las bases de la oncología actual.

1.- La primera atribuye a un efecto local, la estimulación/ de la transformación maligna de una sola, célula, que sería la desencadenante. Es un hecho comprobado, que al menos in/ vitro, estos carcinógenos producen la transformación maligna en las células expuestas.

2.- La segunda hipótesis, viene a coincidir en gran parte, - con nuestros propios planteamientos sobre la oncogénesis. - Se basa en la comprobación de que todos los carcinógenos quí- micos estudiados hasta el momento, han resultado ser immu- supresores, tanto para la inmunidad humoral como para las - células. Animales que reciban dosis standars de metilcolantre no aceptan la presencia de injertos cutáneos homólogos que/ en controles no tratados son precozmente rechazados.

Es un hecho hoy aceptado y comprobado incluso en la cli- nica humana, que la inmunosupresión es una situación que - suele acompañar al desarrollo de tumores por medios químicos

A pesar de ello, pensamos que el "efecto local" está necesari  
amente implicado.

3.- La tercera hipótesis, enlaza con teoría de la carcinogé  
nesis viral, al suponer que los hidrocarburos policíclicos/  
activan a virus tumorales latentes. Sería necesario admitir  
la existencia de un número suficiente de virus diversos den  
tro de cada célula para explicar el poder antigénico vírico  
que se manifiesta en los tumores inducidos por carcinógenos  
químicos. Es verdad, que se han aislado algunos virus en tu  
mores inducidos por carcinógenos, pero no tenemos ninguna -  
seguridad en su papel etiológico pudiendo tratarse de sólo/  
virus ocasionales.

En este trabajo describiremos las experiencias de trans  
plantes y tratamiento de dos tumores inducidos químicamente:  
el sarcoma de Yoshida y el Metil-Colantreno-inducido, usan  
do en ambos casos a ratas de la variedad Wistar como huéspe  
des. Haremos también referencia a la inducción de tumores -  
con Metil-Colantreno y con Benzantraceno en Syrians Hamster.



C.- EL TRANSPLANTE EXPERIMENTAL DE TUMORES:

SU HISTORIA Y SU IMPLICACION EN LA ONCOLOGIA ACTUAL.

El tumor por su presencia fácilmente asequible a los sentidos del investigador, y por sus frecuentemente fatales consecuencias para el huésped, ha sido una de las desviaciones de la normalidad fisiológica, que más han estado presente en la curiosidad científica de biólogos y médicos desde la más clásica antigüedad.

A pesar de que ciertos trabajos ( 22 ) atribuyen a PEYRILHE en 1.773, la realización del primer experimento con éxito de transplante de tumores, al inocular por vía subcutánea a un perro, material procedente de lesiones cancerosas de una mama humana, con toda seguridad este experimento de transplante no tuvo éxito, ya que las alteraciones descritas del animal, lesiones enfisematosas en la piel a los cinco días de realizada la inoculación, corresponden más bien, según nuestra opinión, a una infección por anaerobios.

Además la evolución de estas lesiones no pudieron ser/

seguidas ya que el investigador puso fin a la vida del animal, apiadándose de su lamentable estado.

A partir de las investigaciones realizadas por SHABAD, - en 1.950 ( 23 ), la gloria de ser el fundador de la oncología experimental recae sobre NOVINSKY. (24)

El día 19 de Diciembre de 1.875, MSTILAV NOVINSKY, de la Academia Médico-Quirúrgica de San Petersburgo consigue el primer trasplante con éxito de un tumor canceroso de un animal a otro.

Este primer trasplante, que seguidamente describiremos con detalle, fué el origen de numerosas experiencias en el mismo sentido, contribuyendo a mejorar los conocimientos sobre los mecanismos de crecimiento tumoral y sobre la relación huésped-tumor. Estos avances fueron también camino para las primeras experiencias sobre la bioquímica y la quimioterapia de los tumores.

Desde los trabajos de PEYRILHE, los frecuentes intentos de trasplante de tumores heterólogos (generalmente tumores

humanos en animales) o bien homólogos, entre animales, fallaban de forma sistemática.

Está recogido un trabajo de LEIDY, quién en 1.851, transplantó tumores humanos bajo la piel de los sapos. Los injertos se hicieron vascularizados y en un caso las células tumorales persistieron en el lugar de la inoculación pero no/ llegó a conseguir el crecimiento progresivo del tumor.

Es muy importante señalar, que a partir del año 1.825,- éste tipo de investigaciones comenzaron a realizarse con mayor base científica, gracias a la aportación al conocimiento de la histología de diversos tumores malignos humanos que por estos años hicieron SCHWAUN y MULLER ( 22 ). Además en 1.832, estos nuevos conceptos se desarrollaron ampliamente/ gracias a los principios de VIRCHOW sobre la Patología celular, que vino a reemplazar gradualmente a la teoría de la - Patología Humoral, que había denominado la Medicina durante las últimas centurias. Estos fueron los fundamentos sobre - los que fué construído el concepto de que "pequeños émbolos eran llevados por los vasos linfáticos y la sangre desde el sitio primario del cáncer a los órganos distantes", compro-

bándose que el tumor primitivo y las metástasis tenían el mismo patrón histológico.

En este entorno científico, NOVINSKY, alumno del Departamento de Medicina Veterinaria de la Academia de Medicina - Quirúrgica de San Petersburgo, diplomado en 1.874, comienza a trabajar en el Instituto de Patología bajo la dirección del Prof. Rudnew.

El Profesor Rudnew, consciente de la importancia del estudio comparado anatómo-patológico y experimental de los tumores había creado un animalario en el Instituto.

Junto con su equipo, se interesaba particularmente en el estudio de los tumores y comenzaba a considerar la biopsia como método fundamental del diagnóstico tumoral.

Rudnew, confió al joven NOVINSKY, la realización de los trasplantes y el estudio de su técnica.

NOVISNKY decidió desde el principio, que no intentaría/ trasplantar más que tejidos homólogos.

Los perros, eran entonces animales utilizados corrientemente en los laboratorios. Los trabajos sobre ratas, ratones eran en esas fechas muy raros. Efectuó algunos ensayos/ de transplantes en caballos.

Sus primeras tentativas fracasaron, pero descubrió que/ sus fracasos se debían a una imperfección técnica de transplantes. Observó por primera vez, que los fragmentos de tejidos excesivamente grandes crecían con mucha dificultad o no crecían. Su primer transplante con éxito al que ya hicimos referencia, el 19 de Diciembre de 1.875, fué realizado con un cáncer de cavidad nasal del perro.

Fragmentos de 2 milímetros de este tumor fueron transplantados en dos regiones del tejido subcutáneo de un cachorro.

Uno de los fragmentos transplantados, comenzó después a/ crecer, y al cabo de 68 días los nódulos se ulceraron.

Un fragmento de este tumor, fué enseguida transplantado a tres nuevos cachorros. El primer tumor resultante de es-

te trasplante, sufrió un crecimiento rápido y cuatro meses y medio después del trasplante el perro fué sacrificado.

Se constató que tenía un tumor infiltrante de la pared/torácica, acompañado de metástasis en los ganglios linfáticos axilares. Al examen microscópico, este tumor trasplantado, fué idéntico al tumor inicial. El trasplante de este tumor en tres cachorros, volvió a realizarse con éxito.

Al describir el aspecto microscópico de estos tumores - trasplantados, NOVINSKY, llamó particularmente la atención sobre la extensión de la necrosis ( 25 ).

NOVINSKY, continuó sus experiencias utilizando un myxosarcoma vaginal de una perra.

Una vez extirpado, trasplantó el tejido humoral a dos cachorros de pocos días ( 8 y 14 días respectivamente). Siguió la misma técnica que en las inoculaciones precedentes y dos meses y cuatro días después de la fecha del transplante, el tumor era evidenciable en los nuevos huéspedes.

Material del tumor de este cachorro, fué transplantado/ a otro consiguiéndose así por primera vez una segunda generación de tumores transplantados.

De sus experiencias NOVINSKY extrajo una serie de conclusiones sobre la técnica de transplantes en animales de experimentación que fueron recogidos en sus Tesis Doctoral ( 24 ) titulada " El problema de transplante de tumores malignos - Estudio experimental - ", que fué presentada en 1.877.

Estas conclusiones, no han perdido vigencia a pesar que han pasado sobre ellas cien años. Algunas, tras servir por/ aquellos años de punto de partida para otros investigadores como WEHR ( 26 ), que consiguió con éxito transplantes de/ sarcomas vaginales, en el perro en 1.889, o HAVAN ( 27 ) - que en el mismo año cita a MSTILAV NOVINSKY; en su artículo sobre el transplante de tumores en la rata, continúan siendo útiles a nuestros días, siendo importantes aspectos a tener en cuenta. Algunos de sus cinco puntos que a continuación citamos, han sido seguidos por nosotros en nuestros trabajos de transplantes.

Sus conclusiones eran las siguientes:

- 1.- El trasplante de un epiteloma medular y de un sarcoma mixomedular es posible.
- 2.- El éxito de estos trasplantes, depende de la extensión de la incisión sobre la piel del receptor, ( ésta no debe exceder de 5 milímetros) y de la vitalidad del tejido "vivo".
- 3.- El picado del tejido transplantado no debe sobrepasar los 3 milímetros.
- 4.- El huésped, debe pertenecer a la misma especie que el donante.
- 5.- La degeneración grasa, es más frecuente en el tejido transplantado que en el tumor inicial.

El interés por el estudio de los tumores en animales fué aumentando rápidamente.

Mc Fadyean en 1.890 y Sticker en 1.902 publicaron extensos trabajos con datos sobre los tumores en los animales.



Uno de los más fieles seguidores de las técnicas -- de NOVINSKY, HANAN, publica en 1.898 un trabajo, al que de pasada hicimos antes referencias ( 27 ) en el que describe el transplante de un carcinoma de células escamosas, de una región de la vulva de una rata vieja a otras también viejas, de la misma familia, consiguiendo/ el transplante en dos generaciones. MORAN, en 1.894, consiguió transplantar un tumor mamario espontáneo del ratón a través de varias generaciones. Usó habitualmente, huéspedes obtenidos por cruzamiento entre hermanos.

Conclusiones como las de Bashford y Murray, hacia 1.904 estableciendo definitivamente la elevada incidencia de los tumores malignos sobre los animales domésticos, fueron fruto de las investigaciones que por aquellos años de principios de siglo emprendiera sobre este tema la "Fundación Imperial Británica de Investigaciones del Cáncer".

Sin embargo, estas experiencias, no recibieron mucha difusión.

Por otro lado, a pesar del énfasis del Profesor Rudnew, sobre el necesario respaldo del estudio histológico

de la biopsia de cada tumor conseguido, la mayoría de los investigadores, o no realizaban estos estudios, o lo hacían de forma poco meticulosa, con deficiencia de técnicas y medios, por lo que muchos de los hipotéticos tumores transplantados podían tratarse de procesos infecciosos por hongos ó bacterias.

Una serie de investigadores, LOEB, JENSEN, BORREL, - BASHFORD, MURRAY y FLEXNER, que trabajaron en estos temas de 1.901 a 1.907, aportaron una mayor fiabilidad a sus trabajos, por ser más estrictos en este aspecto del examen histológico, llegando a aportar a los conocimientos/ de la época, el de que el crecimiento del tumor es una consecuencia de la multiplicación de las células.

Demostraron también, que las células tumorales pueden reproducirse de forma indefinida (hoy sabemos que esta conclusión no es cierta) cuando las condiciones de los transplantes son favorables.

En el año 1.904, se publica la "Systematic Chartin of tumor growth", carta sistemática sobre el crecimiento de

los tumores, en la que se recoge, una de las primeras manifestaciones de una línea de pensamiento sobre la relación/inmunidad del huésped-tumor, relación, protagonista de tantos trabajos en la moderna investigación del cáncer. En estos trabajos, se señalaba que aquellos tumores transplantados que regresaban espontáneamente, producirían una inmunidad en el huésped para los tumores de la misma línea, y en ocasiones, también para otros tumores.

En aquellos días, comenzó a observarse otro hecho, que sería fundamental en el desarrollo de los trasplantes tumorales experimentales: los tumores regresaban con más frecuencia en los casos en que receptor y huésped, no estaban ligados por relación de consanguinidad, y por otra parte, en los que existía esta relación el crecimiento era más rápido. NOVINSKY, HANAN y MORA, son los pioneros en estas observaciones.

Se continuó investigando en este sentido, y JENSEN, en 1.903 publica un trabajo, en el que demuestra, que un tumor originado en un ratón blanco, crecía mejor y más rápidamente en este tipo de ratones, que cuando se transplanta

ba a ratones grises. En los blancos obtuvo un crecimiento/ durante 19 generaciones, en un 50% de los casos, obteniéndose en los grises resultados inferiores. LOEB, en 1.904, realiza un transplante de un tumor de la glándula submaxilar de un ratón japonés WALTZING en otro de la misma raza/ y procedencia durante dos generaciones.

En este trabajo LOEB, exponía su tesis, de que variaciones existentes entre distintos individuos, o familias de la misma especie podían influenciar el crecimiento de los tumores.

Existían pues una serie de observaciones, que llevaban a pensar que por encima de la dificultades de técnica de transplante y al margen de la capacidad de desarrollo del tumor, existían unos factores dependientes de ciertas relaciones entre huésped y receptor que facilitan o dificultaban el crecimiento tumoral.

Estos aspectos fueron estudiados cada vez con más rigor científico por TYZZER y LITTLE entre 1.909 y 1.916. Trabajaron en la obtención de razas híbridas, realizando/

cruzamientos y mestizajes. Sus trabajos, fueron revisados/ por STRONG y HESTON. En 1.924 LITTLE y STRONG publican su/ "Teoría Genética de transplantes" ( 22 ).

En ella, se recogía la experiencia de que el crecimiento de los transplantes, dependía del grado de singularidad genética entre el tejido transplantado y el huésped.

En este trabajo, se describen los resultados de unos - transplantes realizados en híbridos, en los que el éxito, - se conseguía con elevada frecuencia, mientras que estos tu mores no prendían con la misma facilidad al ser transplan- tados de los híbridos a sus padres, ya que estos, no contie nen la totalidad de factores genéticos presentes en sus hí bridos.

Paralelamente a este desarrollo de los conocimientos - sobre genética de transplantes, MURPHY comenzó en 1.912 - sus intentos de transplantes de células de tumores de rato nes y ratas, en la membrana corio alantoidea del embrión - del pollo, y sostenía además que estas células tumorales, - podían ser mantenidas por fases de huevo a huevo.

A partir de sus trabajos, tanto tumores experimentales de animales, como tumores humanos han sido inoculados sobre huevos fértiles, usando la membrana corio alantoidea - del saco embrionario, para inyectar células tumorales en la corriente sanguínea, o en la sustancia del embrión, utilizando el soporte y el aporte de los vasos sanguíneos del embrión, para el desarrollo de estos tumores.

Gracias a esta técnica era posible conseguir una línea pura de transplantes, sólo de células tumorales, evitando/ el trasplante del estroma del tumor original, estroma, - que a veces se comportaba como fuente de histoincompatibilidad.

Esta técnica ha sido empleada actualmente para el estudio de ciertos fármacos antimitóticos (cloruro de prospidio) ( 28 ).

Hoy se basa sin duda alguna, que los embriones y los - fetos inmaduros e incluso los recién nacidos, constituyen/ un medio idóneo para conseguir transplantes heterólogos.

Esta circunstancia de la inmadurez inmunológica, fué - tal vez aprovechada por primera vez por BULLOCK que en 1.915 describe, la transferencia de un sarcoma y dos carcinomas de ratón a ratas recién nacidas.

Los animales adultos pueden ser llevados a esta situación de no respuesta a situaciones de histoincompatibilidad bloqueando sus sistema reticulo-endotelial, o bien por exposición a rayos X o por tratamientos con cortisina o inmunosupresores.

Nombres como PUNTNOKY (1.938) y DEBALOGH (1.940) junto con PATTI y MOORE (1.950), continuaron este tipo de trabajos, consiguiendo distintos transplantes heterólogos. Según sus observaciones, no es infrecuente observar rechazos cuando el animal se recupera de su inmunosupresión.

Es un dato histórico importante de recoger, el experimento de transplante, con éxito de GREEN y WHITELEY en 1.952, consiguiendo el transplante de un carcinoma pulmonar humano al tejido subcutáneo de cinco ratones tratados/ con cortisona previamente.

SOMMERS y TODON, continuaron estas experiencias llegado ya a nuestros días en que se trabaja en los transplantes heterólogos en animales no tratados con inmunosupresores.

Hemos visto tras este apresurado caminar por la historia de los transplantes experimentales de tumores, como esta faceta de la investigación médico-biológica, ha ido empujando a los científicos que lo han practicado a adentrarse en estudios cada vez más finos de la relación huésped - tumor, que necesariamente ha llevado también a un deseado/ mejor entendimiento de la fisiopatología tumoral.



#### D.- EL TUMOR DE YOSHIDA.

Ciertas características de comportamiento del tumor de Yoshida, como son su gran agresividad, y su elevado índice de división celular, por una parte, y por otra parte el no haber encontrado en la literatura ningún trabajo sobre él aspecto inmunitario de este tumor, ni sobre sus respuestas o cualquier intento de tratamiento, nos indujeron a usarlo en nuestras experiencias en este campo. Hemos obtenido 48 generaciones de tumor de Yoshida, forma sólida, en ratas - Wistar con un total de unos 400 transplantes.

El tumor de Yoshida, se indujo por primera vez en 1.943 T. YOSHIDA, en su laboratorio de Nagasaki, Japón, trabajaba en la inducción de tumores en ratas albinas (penbrend) con sustancias potencialmente cancerígenas. Trataba un grupo de 20 ratas con 0-amino-azotoluol, pincelándolas además la piel de la espalda tres veces por semana con arseniato-potásico. A los 90 días de seguir este tratamiento, en una de las ratas apareció una tumoración en el escroto.

A pesar de que las dudas sobre su clasificación histológica, se extenderían hasta mediada la década de los años/50, la Asociación Japonesa para la Investigación del Cáncer, lo registró en el año 1.948, con el nombre de "Sarcoma de Yoshida". Lo definió como un tumor indiferenciado - que surgió en una rata albina (pen-bred) a la que se dió - O-Amino-Azotoluol y se tiñó con arseniato potásico ( 22 ) Sinónimos como tumor ascíticos Yoshida, sarcoma Yoshida y Sarcoma Yoshida de células parecidas a las células reticulares, han sido utilizados para designarlo.

El estudio de este primer tumor inducido por Yoshida , reveló una suspensión de células tumorales en un líquido - ascítico, espeso y lechoso. Había una masa simétrica bilateral, pegada a la cápsula y al omentun de cada testículo.

El peritoneo y los tejidos retroperitoneales, habían -- sido invadidos. Los testículos eran atróficos, pero aparecían infiltrados por células neoplásicas.

El hígado presentaba un tumor que Yoshida describió como hepatoma.

El tumor pélvico, fué clasificado por Yoshida como un / sarcoma de células redondas, que en algunas zonas era similar al sarcoma de células reticulares. Pero en las preparaciones de plata de Wilder, no se pudo demostrar la presencia de retículo ( 29).

YOSHIDA, consideró como de crecimiento primario al tumor desarrollado en el omentun genital y peritoneo pélvico, pero nunca quedó claramente demostrado, que esta tumoración no fuera secundaria al tumor hepático.

Por un tiempo, Yoshida llegó a la conclusión de que el tumor pélvico era un "Sarcoma de células reticulares", muy posiblemente derivado de las células de Kuppffer del hígado ( 29 ) y ( 30 ). A pesar de ello, en Julio de 1.954,-- Yoshida manifestó que todavía dudaba el lugar de origen y la clasificación histológica cierta de su tumor.

Con idea de estudiar las posibilidades de transplantes para obtener una línea de tumores, el líquido ascítico del animal original, fué inoculado intraperitonealmente a dos

ratas albinas. Una de ellas, murió dos días después. La otra sobrevivió y desarrolló un nuevo tumor ascítico.

Simultáneamente, al trasplante intraperitoneal descrito, un trozo de tejido de tumor sólido, de la región pelviana de la rata original, se transplantó subcutáneamente/ a otra rata desarrollándose un tumor sólido en lugar de la inoculación.

En posteriores trasplantes, se llegó a una observación de interés: cuando un fragmento de la forma sólida del tumor, fué transplantado intraperitonealmente, se desarrolló la forma ascítica lechosa. Por el contrario, líquido ascítico que contenía células tumorales, inyectado subcutáneamente, daba lugar a un tumor sólido, en el lugar de su inoculación.

En su primer trasplante del tumor objeto de este estudio, ( es decir, el realizado a partir del líquido ascítico de 1ª rata que lo contrajo). T. YOSHIDA, siguió la siguiente técnica: ( 31 ).

Aproximadamente 0.1 c.c. de líquido ascítico, fué extraído por medio de un tubo capilar de cristal, desde la cavidad peritoneal de la rata afectada por la neoplasia. Una porción de líquido fué utilizado para examen macroscópico. Este examen reveló que 1 mm<sup>3</sup> de líquido ascítico, podía contener entre 500.000 y 1.000.000 de células tumorales.

El resto de líquido ascítico, aproximadamente 0.05 c.c. se inyectó intraperitonealmente en ratas albinas.

Entre dos y tres días después de realizado el transplante, las ratas inoculadas, desarrollaron una ascitis. La vida media a partir de realizado el transplante, es estimada en unos 12 días. Ocasionalmente, una rata inoculada llegó a sobrevivir 24 días al transplante.

Las necropsias demostraron numerosas localizaciones --lesionales extendidas por el peritoneo y elevada cantidad de líquido ascítico. Aproximadamente unos 10 c.c.

YOSHIDA continuó esta línea de transplantes, además de

en las pen-bred, en las ratas WISTAR, MARSHALL, 520 y en las rata F1 (Marshall 520 x ACX 9935). Se obtuvieron más de 400 generaciones de transplante ( 31 ) ( Marzo 1.953) y el tumor prendió con éxito en un 90% de las ratas inoculadas.

Durante este período de transplantes, el tumor conservó su patrón morfológico.

Por medio de diluciones graduales de líquido ascítico, llegó a conocer el mínimo número de células tumorales que era necesario para desarrollar la neoplasia en el animal transplantado. Una cantidad de líquido ascítico, conteniendo una sólo célula, aspirado con una micropipeta e inyectada intraperitonealmente, es suficiente, para producir el tumor en un 55% de las ratas inoculadas ( 32 ). No obstante, con la inoculación de una sólo célula , el tiempo de inducción del tumor ascítico es mayor: hasta los 12-13 días no existe evidencia clínica de la lesión. Sin embargo, con la técnica usual de trabajo, es decir con su mayor número de células, la neoplasia surge en 2-3 días.

Las células neoplásicas del tumor ascítico de YOSHIDA, se distinguen fácilmente, de los leucocitos y células mesoteliales de la serosa peritoneal. Su forma, es esférica u oval con diámetro medio de unas 30 U (micras).Figura nº 2.

Su membrana celular, es indistinguible y el citoplasma es muy basófilo, de aspecto granuloso o vacuolado. Es frecuente, distinguir en estas células un citocentro amplio y claro. Con la tinción de Sudan, se ponen de manifiesto, gotas de grasa.

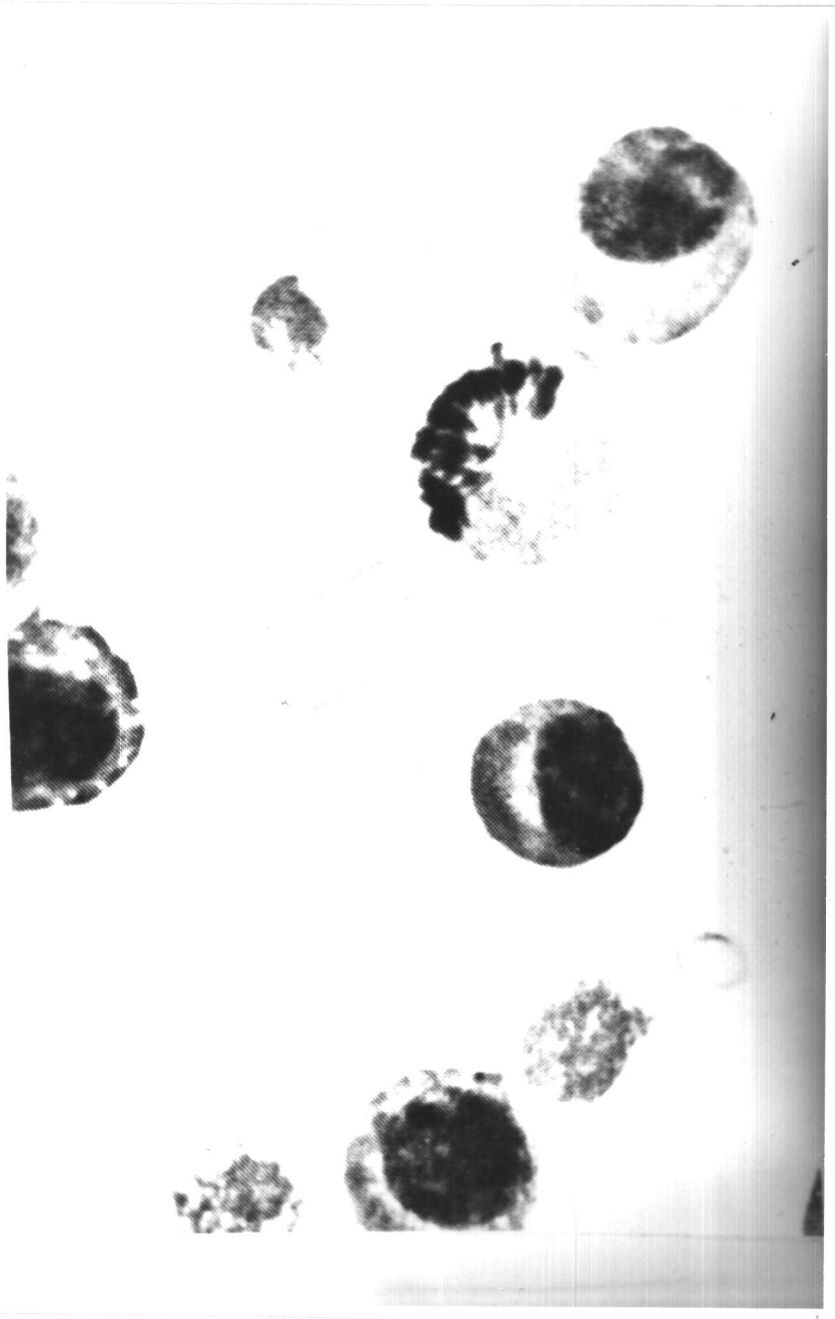
El núcleo, ocupa generalmente una posición excéntrica, suele ser de forma ovalada o redondo, y su membrana nuclear es indistinguible. Con el método de Giensa, se colorea/ de Violeta-rojizo, observándose además, gránulos gruesos y de uno a tres nucleolos de gran tamaño. Entre cuatro y diez días, después de la inoculación intraperitoneal, aparecen/ en el citoplasma, cerca del núcleo, gránulos neutrófilos, -rojos o azulados en forma de rosetas. Estos gránulos han sido interpretados como productos de degeneración del núcleo, por su relación indirectamente proporcional ( en cuanto a su tamaño) al período de tiempo que media entre la -

## FIGURA Nº 2

MICROFOTOGRAFIA DE CELULAS DE LIQUIDO ASCITICO, EXTRAIDO DE UNA RATA ALBINA, INOCULADA SIETE DIAS ANTES CON LA FORMA ASCITICA DEL TUMOR DE YOSHIDA. LAS CELULAS DEMUESTRAN UN NUCLEO SITUADO EXCENTRICAMENTE, CERCA DEL QUE HAY UN AREA CLARA EN EL CITOPLASMA. VARIAS CELULAS SON NECROTICAS. SE OBSERVA UNA CELULA EN MITOSIS. TINCION DE GIEMSA x 475. (tomado de Armed Forces Institute of Pathology.)

Washington D.C.





inoculación intraperitoneal, y su observación y en proporción inversa a la intensidad de la tinción nuclear. Fig.nº3

A partir de los 8 días de la inoculación, es frecuente la observación de degeneración y necrosis de las células - contenidas en el líquido ascítico ( 22 ).

En la mitosis, en número creciente a partir de la inoculación aparecen a veces formas bizarras. SATO ( 31 ) - ( 32 ), ha descrito cromosomas en forma de V en los elementos mitóticos.

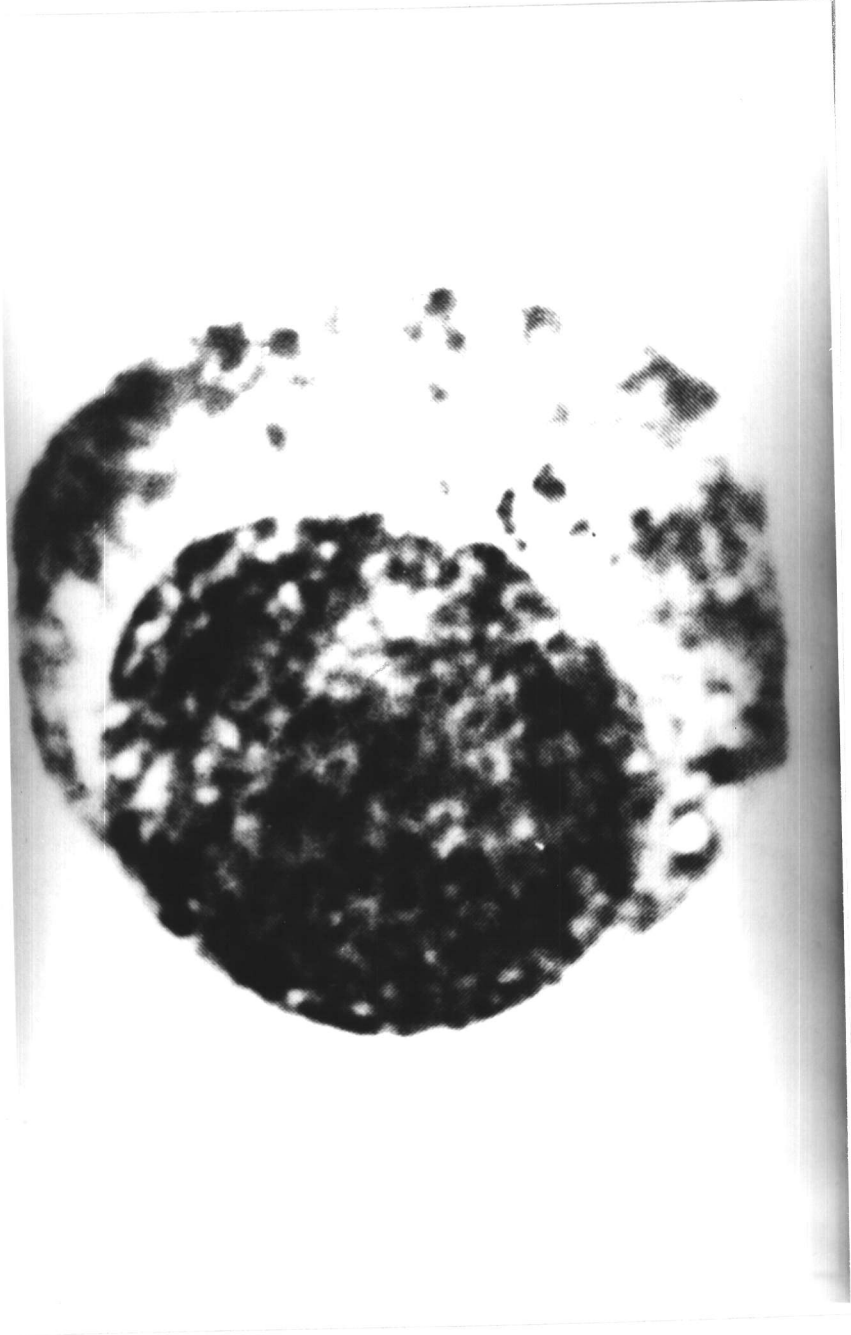
El estudio macroscópico del peritoneo y de las vísceras abdominales, después de la inoculación intraperitoneal con el líquido ascítico, demuestra a menudo, la existencia de/ formaciones tumorales sólidas en el peritoneo y en la superficie de las vísceras abdominales. Estas estructuras, - pueden estar infiltradas extensamente por células tumorales.

La siembra peritoneal, hacía el hígado, es frecuente, - como resultado de trombos neoplásicos en las ramas de la -

## FIGURA Nº 3

MICROFOTOGRAFIA A GRAN AUMENTO DE UNA DE LAS CELULAS DE LA FIGURA Nº2 . NOTESE LAS VACUOLAS Y GRANULOS EN EL CITOPLASMA. TINCION DE GIEMSA x 1.780.

(Tomado de Armed Forces Institute of Pathology )  
Washington D.C.



vena porta.

El espacio retroperitoneal y sus vasos pueden también/ estar invadido por la neoformación ( 29 ) ( 30 ), figura nº 4

Relación huésped-tumor de YOSHIDA en forma ascítica:

El trasplante intraperitoneal de células del tumor de Yoshida, dá lugar a una reacción inflamatoria con derrame.

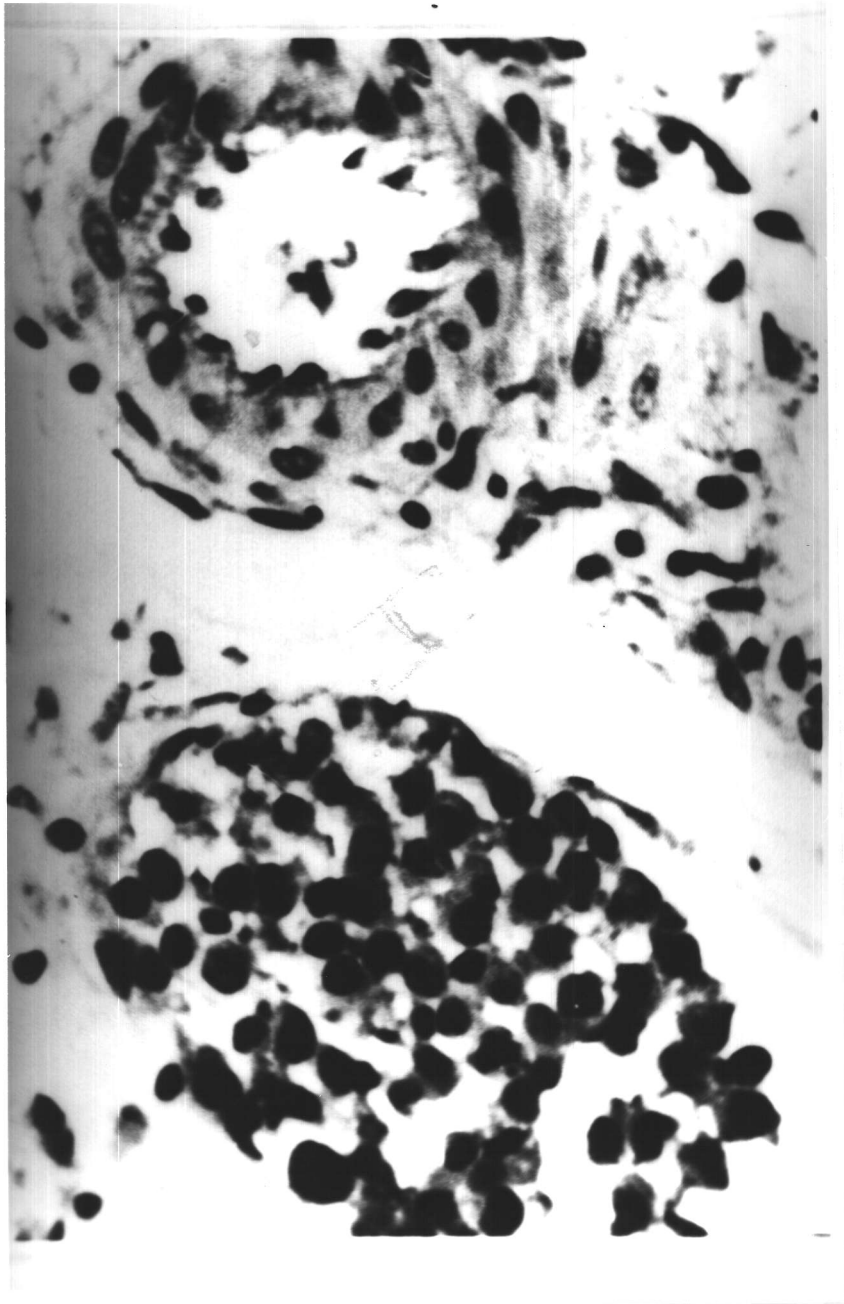
- Treinta minutos después de la inoculación, se observan leucocitos neutrófilos en el líquido ascítico. Su número vá aumentando progresivamente con gran rapidez, de forma que a las dos horas de realizado la inoculación, estos/ leucocitos constituyen el más abundante elemento celular - en el exudado inflamatorio.

Esta presencia, persiste sólo durante 12 horas. Dentro de las tres horas tras la inoculación, aparecen los leucocitos eosinófilos. Los neutrófilos van disminuyendo en el exudado.

## FIGURA Nº 4

MICROFOTOGRAFIA DE FORMA ASCITICA DEL SARCOMA DE YOSHIDA -  
(TUMOR TRANSPLANTE). SE OBSERVA INVASION INTRAVASCULAR DE  
CELULAS TUMORALES. TINCION HEMATOXILINA-EOSINA x 440 DR. HA  
ROV SATO, KUKUSHINA, JAPON: FORMERLY OF NATIONAL CANCER -  
INSTITUTE, BETHESDA.

(Tomado Armed Forces Institute of Pathology).  
Washington D.C.



El número de leucocitos mononucleares aumenta lentamente durante las primeras horas tras la inoculación. Cuando/ya son numerosas en el exudado, muestran actividad fagocitaria, con ingestión de neutrófilos.

Al mismo tiempo, las células tumorales, muestran signos de rápida multiplicación, aumentando progresivamente su número, hasta dominar la población celular de la inoculación del líquido ascítico.

Así pues, a las 48-72 horas de la inoculación nos encontramos con un líquido ascítico que contiene un elevado número de células tumorales, y un número, relativamente bajo de células inflamatorias, junto con algunas células mesoteliales. Se considera este líquido, representante del llamado "cultivo puro de células de tumor ascítico" ( 29 )( 30 ) ( 32 ), Figura nº 2

Nosotros hemos empleado para nuestros trabajos la forma sólida del tumor.



E.- DATOS DE INTERES SOBRE EL BACILO DE CALMETE Y GUERIN  
(B.C.G.) Y LA NEUROAMINIDASA DEL VIBRIO COLERAE (VCN).  
APUNTES PARA LA HISTORIA DE LA INMUNOTERAPIA ONCOLOGI-  
CA .

La creciente participación de la inmunoterapia en los/tratamientos antineoplásicos en nuestros días, debida fundamentalmente a MATHE, usando sobre todo la inmunoestimulación inespecífica, con coadyuvantes como la BCG ( el más usado actualmente ), nos llevó a utilizar estos métodos en nuestros tumores.

También hemos empleado la neuroaminidasa del vibrio colerae (V.C.N.), en tratamiento conjunto con la B.C.G. "Bacilo de Calmette y Guerin", e independientemente. Creemos de interés, pasar a describir algunos aspectos tanto del "Bacilo de Calmette y Guerin" como de la "Neuroaminidasa del/Vibrio Colerae".

EL BACILO DE CALMETTE Y GUERIN "B.C.G."

La búsqueda de Robert Koch de una vacuna contra la tu-

berculosis, no se vió coronado por el éxito. Pero sus trabajos continuados por CALMETTE y por CAMILLE GUERIN, estaban indirectamente marcando el punto de partida del uso de la B.C.G., como aadyuvante inmunológico en el tratamiento del cáncer (FIGURA Nº ).

ALBERT CALMETTE y CAMILLE GUERIN, estaban dedicados por aquél entonces, corría la segunda década de nuestro siglo/ al estudio de la excreción del bacilo virulento bovino por el sistema biliar de los animales afectados ( 33 ), FIGURA Nº .

Observaron que los bacilos cultivados en un medio conteniendo bilis, decrecían en virulencia.

La inyección intravenosa de este bacilo tuberculoso atenuado en terneras, protegía a estos animales, contra un enfrentamiento subsecuente, con el bacilo tuberculoso virulento bovino.

En el desarrollo de este proceso de investigación, en busca de la definitiva vacuna anti-tuberculosa, LEWIS y -

LOOMIS en 1.923, observaron por primera vez, como la respuesta inmune se modificaba por la infección tuberculosa:- Las cobayas que sufrían una infección tuberculosa por bacilos virulentos, experimentaban un aumento en su capacidad/ de respuesta humoral ( 34 ).

Infecciones por otros gérmenes, no producían un aumento tan importante en la respuesta humoral de los cobayas.

Estas observaciones de LEWIS y LOOMIS, fueron confirmadas por DIENES, quién también afirma que la infección por gérmenes tuberculosos, aumenta la facultad de generar respuesta de hipersensibilidad retardada.

El gran inconveniente de este método de estimulación - de la respuesta inmune, era la producción de la infección tuberculosa. FREUND, para tratar de soslayar este inconveniente comenzó a usar sólo la "Heat-Killed" de la mycobacteria, pero ésta no presentaba propiedad alguna como coadyuvante. Sin embargo, la preparación de heat-killed con una emulsión de aceite mineral si se comportaba como estimulante de la respuesta.

Se observaba, un incremento de la resistencia en el huésped a la inyección por antígenos de otros micro-organismos ( 35 ), un aumento de la fagocitosis ( 36 ), un aumento en la velocidad de rechazo de injertos ( 37 ), y lo que más nos interesa, un aumento de la resistencia, al crecimiento de los tumores transplantados según trabajos de BIOZZI y OLD en los años 1.959 ( 38 ) y 1.961 ( 39 ) respectivamente.

ZBAR y BERNSTEIN, en 1.972 ( 40 ), conscientes del interés de estos trabajos anteriores, comienza a emplear estas cualidades de la B.C.G., en el tratamiento de tumores experimentales. Indujeron en un híbrido de cobaya, un hepatoma usando como cancerígeno, diethylnitrosamina. Mantuvieron el tumor, transplantándolo durante 5 a 10 generaciones, inoculando el material tumoral intradérmicamente.

A los siete días de la inoculación del tumor, se hicieron 3 grupos de tratamiento:

A).- Un grupo fué tratado por inyección intralesional de B.C.G. viva.

B).- Un segundo grupo por inyección intralesional de un di  
luyente.

C).- Y el tercer grupo, por extirpación intradérmica del -  
nódulo tumoral.

Los resultados, que se nos antojan espectaculares, fueron  
los siguientes:

- Todos los cobayas tratados por inyección del diluyente  
ó extirpación quirúrgica del nódulo, es decir los grupos -  
segundo (B) y tercero (C) murieron de metástasis progresi-  
vas a los 60-90 días, tras la inoculación de las células -  
tumorales.

- Sin embargo, el 60% de los tratados por la inyección  
intralesional de B.C.G., (grupo A), estaban vivos dos años  
después del tratamiento.

A estos resultados, añadieron su conclusión, de que la  
inyección intralesional de B.C.G., causa la regresión en -  
tumores intradérmicos establecidos, y previene el crecimiento

to de nódulos linfoides metastásicos.

ZBAR y BERSTEIN, afirman finalmente que el éxito de la inmunoterapia, requiere el desarrollo de la respuesta inmune mediada por células, contra los antígenos de la mycobacteria.

En otro trabajo ZBAR y colaboradores, se refieren a la necesidad de un contacto directo entre la BCG y el tumor, para que este pueda realizar su función. Inyecciones de BCG adyacentes o contralaterales al tumor intradérmico, se mostraron ineficaces ( 41 ).

Un importante aspecto señalado por GEORGES MATHE, es el del método de preparación de la B.C.G.

Parece ser, que las preparaciones de B.C.G. que contienen gran número de mycobacterias muertas, no son óptimas para la inmunoterapia.

La mayoría de las preparaciones comerciales de B.C.G. se cultivan en la superficie de un medio líquido.

Según MATHE, ciertos fracasos en el empleo de la inmunoterapia en el "British Medical Research Trial", pueden obedecer al uso de una preparación de B.C.G. inadecuada.

El mecanismo de acción de la B.C.G., se basa en la proliferación causada por la mycobacterias, de linfocitos capaces de reconocer los antígenos tuberculosos.

Estos linfocitos abandonan el nódulo linfático, entran en la circulación, y durante su trayecto se ponen en contacto con la B.C.G. que permanece a su vez en contacto con el tumor intradérmico ( 42 ).

Tras la interacción entre estos linfocitos especialmente sensibles y los antígenos mycobacterianos, los linfocitos, segregan unas moléculas llamadas mediadoras (mediators). Algunos de estos mediadores van a matar a células tumorales ( 43 ). Otros provocan la inmovilización de estas células, activando además a los monocitos (macrófagos).

Las observaciones in vitro de CLEVELAN en 1.974, han permitido evidenciar, que macrófagos de ratas infectadas -

con B.C.G., matan a células tumorales.( 44 )( 45 )( 46 ).

Estudios histológicos posteriores demuestran la presencia de granulomas en los lugares de muertes de células tumorales por medio de la acción de la B.C.G. ( 47 ).

Convencidos de la importancia de la utilización experimental y clínica de este método de tratamiento, por los/ conocimientos que de su uso pueden desprenderse en el estudio del comportamiento de los tumores, y por su importan--cia efectiva, de indicaciones muy precisas en la clínica,- incorporamos su uso en nuestro trabajo.

#### NEUROAMINIDASA DEL VIBRIO COLERAE (V.C.N.)

También hemos utilizado la Neuroaminidasa. Tanto como único coadyuvante como en unión de la B.C.G.

La Neuroaminidasa del Vibrio Colerae empleada por nosotros, es un mucopolisacárido- N - Acetil - Neuroaminil-Hi-droxilasa 3.2.1.18.



Tiene una actividad de 500 unidades de Neuroaminidasa/ por ml<sup>3</sup>, y vá disuelta en una solución Tampón de acetato - de sodio 0.05 molar de pH 5.5 con el agregado de 9 mg./mk. de cloruro de sodio y de 1 mg/ml. de cloruro calcico. Está preparada, por el laboratorio BEHRINGWERKE A.G.

La V.C.N. se inactiva por una temperatura de 65°C. durante 30 minutos o por 100 ° C. durante 10 minutos.

SIMMONS y RIOS, realizan entre los años 1.971 y 1.972/ varios trabajos experimentales sobre la V.C.N.

Demostraron que tumores transplantados a ratas ingénicas regresaban si a éstas ratas se las trataba con células tumorales tratadas con V.C.N. ( 48 ). Es pues, una regresión inmunoespecífica ( 48 ).

Estos efectos inmunorregresivos aumentan por la inoculación simultánea de inmunoestimulantes inespecíficos (B.-C.G.) por ejemplo, ( 49 ) ( 50 ) L. RICHARD, SIMMONS, - y ANGELYN RIOS ( 51 ) en 1.974 inyectaron veinte mil cé-

lulas tumorales MC-42, por vía subcutánea en los flancos - de ratas C3H/Hej.

La inyección de  $10^6$  células tumorales MC-42, tratadas/ con V.C.N., enlenteció de manera destacada el crecimiento/ del tumor.

Este tratamiento se les aplicó cuando los tumores alcanzaron los 0.3 a 0.9 de diámetro, esto fué aproximadamente a los 15 días de inoculados ( 51 ).

La regresión total de algunos tumores MC-42 establecidos firmemente pudo inducirse al parecer, tratando a las ratas con inyecciones  $10^6$  células tumorales incubadas con/ V.C.N. Aquellos animales cuyos tumores desaparecieron vivieron indefinidamente, según afirman estos autores ( 51 ). Posteriores experimentos de estos mismos autores demostraron que la regresión inmunoespecífica de adenocarcinomas - mamarios en ratas C3H/Hej y tumores Bl6 en ratas C57 BL / 65 pueden lograrse, cuando estas ratas son tratadas con células tumorales expuestas a la V.C.N. ( 52 ).

Parece ser, que el mecanismo de inmunogenicidad aumentada, en estas células tratadas con V.C.N., responde a la creación en la superficie celular, de mitógenos, que suplementan a los antígenos en su enfrentamiento con las células inmunorreactivas.

#### HIPOTESIS DE TRABAJO

Una vez revisados estos aspectos, tan directamente relacionados con nuestras experiencias, queremos exponer nuestra hipótesis de trabajo.

Nos planteamos este trabajo con la intención de demostrar que los tratamientos con inmunoadyuvantes podían modificar la evolución de tumores sólidos ya establecidos.

Era también nuestro deseo,dejar de alguna forma constancia, de que ésta posible modificación no se realizaba siempre en un mismo y deseado sentido ( el del mecanismo de rechazo contra el tumor implantado), si no qué también, podíamos asistir, sí se daban determinadas circunstancias/

al fenómeno opuesto que es la facilitación del progreso de la enfermedad neoplásica.

## II.- MATERIAL Y METODOS

## 1.- MATERIAL

Hemos empleado como material 570 ratas Wistars adultas y 130 Syrians Hamsters. De las citadas ratas Wistars adultas, 5 tenían un tumor Yoshida tal y como se describe más adelante.

### LA RATA WISTAR.

Es un subtipo de la conocida especie de ratas Hanovarianas. Se trata de la rata albina de Laboratorio usada en el Instituto Wistar de Philadelphia, Pensylvania. Alcanza un tamaño medio de once centímetros. Machos y hembras llegan a la madurez entre los 50 y 60 días de edad. El peso medio de un recién nacido es de 60 gramos. En ellas, se dá con cierta frecuencia (en nuestra experiencia con una incidencia de 0.5%) un tumor mamario en las hembras, que se trata de un fibroadenoma de la glándula mamaria.

A parte de los estudios oncológicos, en la rata Wistar se han realizado numerosos estudios sobre neumonías y lamberintitis. (53).

### EL SYRIAN HAMSTER.

Es muy común actualmente en los laboratorios de todo / el mundo. En 1.930 se establecieron los primeros núcleos - de crianza, en Jerusalén, a partir de 1 macho y 2 hembras, capturados cerca de Aleppo en Syria ( 54 ). Comenzaron a utilizarse en trabajos sobre Kala-Azar, Brucellosis y Tuberculosis. En 1.939, GYE y FOULDS hacen referencia a la susceptibilidad de estos animales a los carcinógenos químicos.

Según HANDLER, su particular bolsa de la mejilla es lugar de elección para los injertos tumorales. BRINDLEY y - BANDFIELD describen en ellos un sarcoma de células reticulares transmitido por mordedura.

El corto período de gestación del Syrian Hamster (nace a los 16 días post-coíto) y su consiguiente inmadurez inunitaria, hacen de él un sujeto ideal para el estudio de :- problemas inmunológicos y de trasplante.

### TUMOR DE YOSHIDA.

Hemos empleado la forma sólida del tumor de Yoshida obtenida a partir de 5 ratas portadoras de dicho tumor, enviádas por la Fundación Jiménez Díaz.

Según nuestro punto de vista, esta forma sólida, ofrece más comodidad para la apreciación de respuesta a cualquier método de tratamiento.

Tanto si se inoculara en tejido celular subcutáneo, como intramuscular, la velocidad de crecimiento del tumor, es fácilmente apreciable al poder estimar cómodamente, mediante palpación el diámetro de la lesión. Asimismo, la posibilidad de extirpación completa o parciales, permite el acceso en algunas experiencias que no son posibles, al traba--jar con la forma ascítica.

Esta forma sólida del tumor de Yoshida, podemos conseguirla a partir de la inoculación intramuscular de líquido ascítico, que contenga células tumorales ( de Yoshida), ó/bien a partir de una porción de un fino picado celular de



de otro tumor sólido, extirpado a otro animal, que tras su introducción en un trocar, es inyectado a un nuevo huésped.

En otro apartado expondremos con todo detenimiento nuestra técnica de trasplante y sus resultados.

A partir de cualquiera de los dos procedimientos descritos, a los 4-5 días que es palpable la tumoración y a los 10-11 días puede alcanzar un diámetro de unos 4 cm.

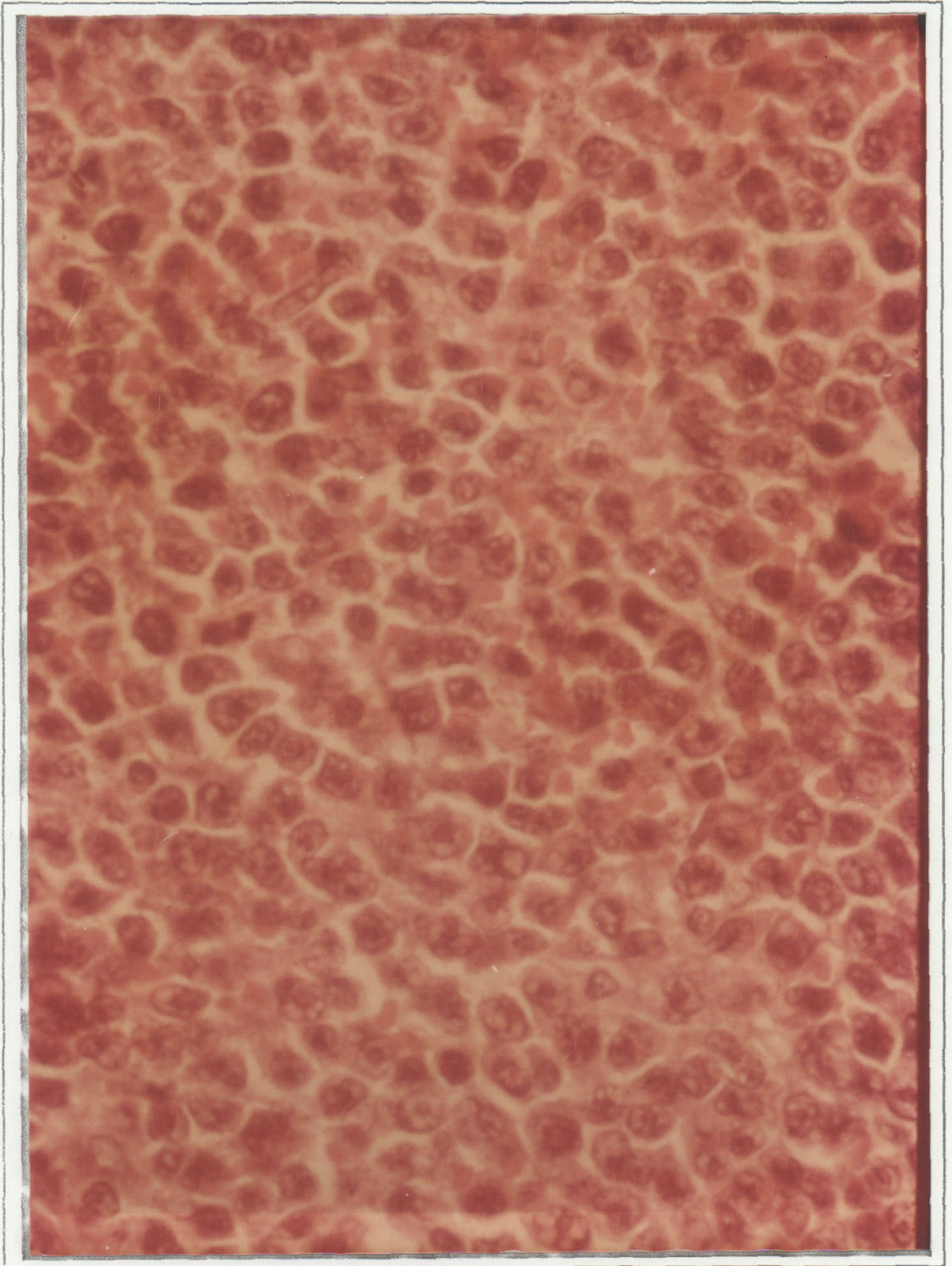
La necropsia muestra un tejido rosa-grisáceo desmenuzable y brillante.

Habitualmente no se encuentra metástasis ( 22 ). La tumoración al microscópio, presenta una estructura de células situadas formando capas. Son células de 20 a 40 micras en su diámetro mayor ( Figura nº 5 ) y forma redondeada o poligonal.

La membrana celular, en la forma sólida si puede distinguirse del resto de las estructuras, cosa, que recordaremos no era posible en la forma ascítica. Se consigue por -

## FIGURA Nº 5

MICROFOTOGRAFIA DE LA FORMA SOLIDA DEL SARCOMA DE YOSHIDA. (TUMOR TRANSPLANTE). EL TUMOR ESTA COMPUESTO DE HOJAS DE - CELULAS REDONDEADAS O POLIGONALES, MOSTRANDO MUCHAS DE - ELLAS DEGENERACION Y NECROSIS ESPORADICAS LOS ELEMENTOS MI - TOTICOS SON NUMEROSOS. TINCION: HEMATOXILINA-EOSINA x 400.



medio del ácido fosfotunsténico, en una preparación de hematoxilina.

Tienen las células un citoplasma finamente granular y ligeramente acidófilo.

El núcleo ocupa aproximadamente la mitad del volumen celular, y su forma puede ser, redondeada, ovular, lobulada o de forma ímbricada. El núcleo presenta un gran nucleo central del que irradian hilos de revestimiento delicados en forma arrosariada.

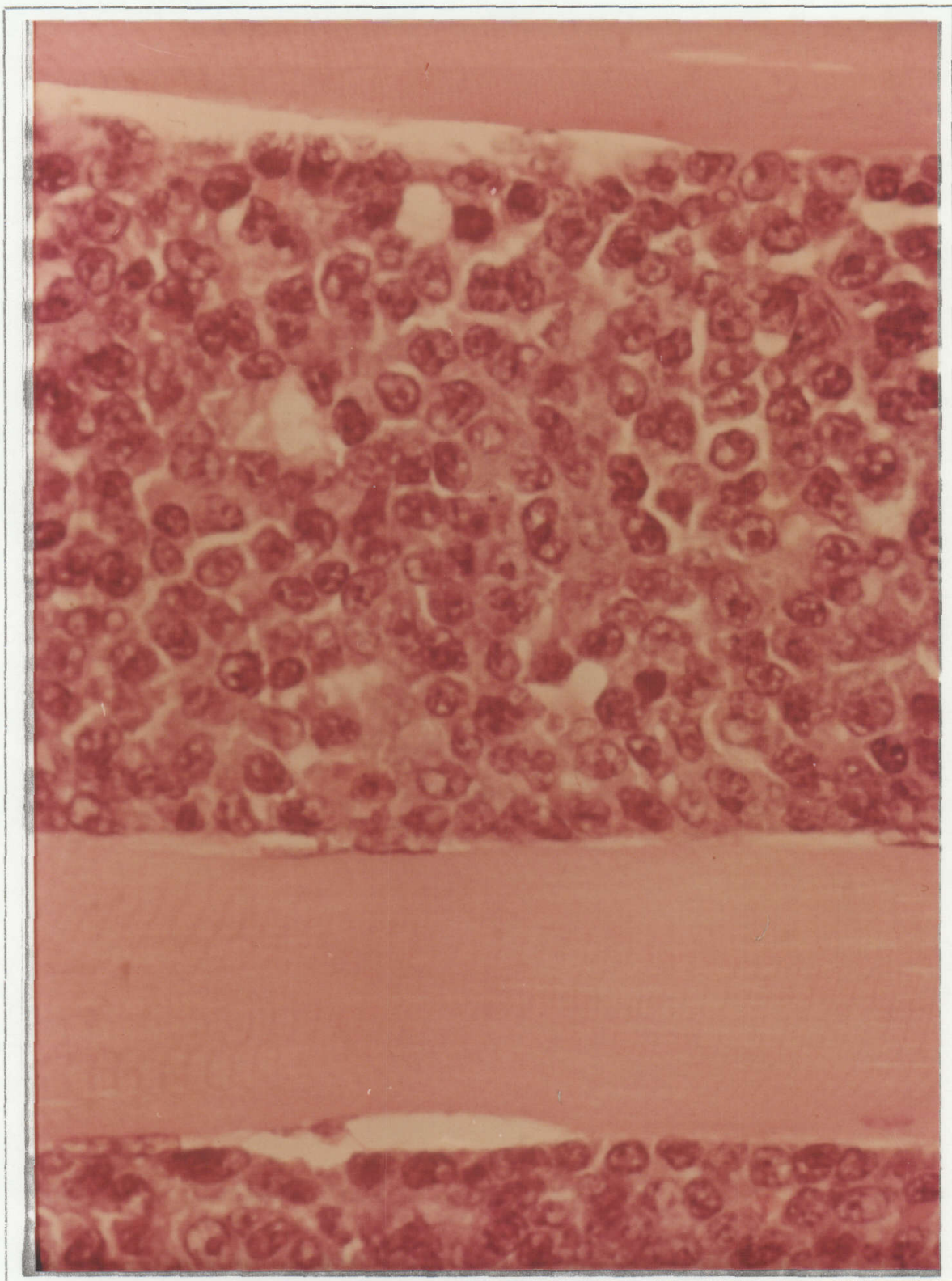
Es frecuente observar figuras de mitosis generalmente/ en número de 8 ó 10. Habitualmente se trata de mitosis atípicas.

El estroma de formas delgadas trenzas de tejido conectivo compuesto por fibras reticulares y colágena, dispuestas alrededor de grupos celulares ( Figura nº 6 ). Se encuentran vasos sanguíneos, de tamaño capilar, que frecuentemente están dilatados y sus paredes son finas. Las zonas de necrosis suelen ser grandes y numerosas. Es un hecho co

## FIGURA Nº 6

TUMOR DE YOSHIDA. SE OBSERVA LA INFILTRACION DEL TUMOR, CON OCASIONALES MITOSIS, ENTRE DOS FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS.

( 400 x).



nocido que en los tumores de rápida división, la necrosis/ se produce precozmente.

La perifería del tumor, invade el músculo, periostio, tejido óseo y membranas sinoviales de la extremidad en que crece.

A pesar de que la trama reticular de este tumor coincide con el de los carcinomas, la falta de un patrón histológico específico y el carácter indiferenciado de sus células tumorales, influenciaron la decisión de clasificarlo como neoplasia indiferenciada ( 22 ).

## 2.- METODOS

Hemos realizado estudios de inducción de tumores por medios químicos en 20 ratas Wistars Adultas y en 30 Syrians Hamsters adultos.

### Inducción de tumores en ratas Wistars.

A 20 ratas se les administró por vía intramuscular en/ la extremidad posterior izquierda 0.25 c.c. de una solución de 60 mg. de Metil-Colantreno en 5 c.c. de aceite de oliva.

A los 98 días, 15 de las 20 ratas presentaban tumoraciones palpables en el lugar de la inoculación. De las 5 ratas restantes, 3 permanecieron sanas y 2 de ellas presentaron tumoración a los 120 días de la administración del carcinógeno.

### Inducción de tumores en Syrians Hamster.

De los 30 Syrians Hamster, a 15 se les administró la solución de Metil-Colantreno anteriormente descrita (60 mg.



de Metil-Colantreno en 5 c.c. de aceite de oliva), inyectan doles por vía intramuscular en la extremidad posterior iz quierda 0.15 c.c. de dicha solución.

A los 95 días los 15 Syrians Hamster, presentaba tumores palpables, en la extremidad posterior izquierda, otros 5 Syrians Hamsters fueron tratados con la misma solución - de Metil-Colantreno, pero repitiendo la administración de la misma dosis de carcinógeno tres veces, según el esquema:

1ª inyección: ( 0. 15 c.c. de la solución de 60 mg. de Metil-Colantreno en 5 c.c. de aceite de oliva).

A los 9 días otra dosis similar, y a los 9 días de esta segunda dosis, una tercera.

Tratabamos de acelerar el tiempo de latencia de aparición de las tumoraciones, pero ésta no se modificó. Hasta/ los 90-95 días no se palparon tumoraciones en los 5 Syri-- ans Hamsters.

A los 10 Syrians Hamsters restantes les fué administrada

do Benzantraceno, inyectandoles por vía intramuscular 0.10 c.c. de una solución de 20 mg. de Benzantraceno + 5 c.c. - de Benceno + 10 c.c. de aceite de oliva, repitiendo la misma dosis ( 0.1 c.c.) a los 15 días. Quince o veinte días - después presentaban ulceraciones en el lugar de la inoculación que cicatrizaron. A los 90 días de la 2ª inyección se palpaban tumoraciones.

### METODOS DE TRANSPLANTE DE TUMORES EXPERIMENTALES.

Pasamos a describir nuestra técnica de transplantes -- del tumor de Yoshida en su forma sólida.

Hemos utilizado como receptores de estos transplantes 525 ratas de la variedad Wistar y 100 Syrians Hamsters.

Nuestra experiencia todavía corta, se centra en unos/ 425 casos de transplantes de tumor de Yoshida y 100 del tumor Metil-Colantreno inducido por nosotros, tanto en tejido celular subcutáneo como intramuscular. En estos momentos trabajamos en inducción y transplantes en Hamsters de tumores Metil-Colantreno y Benzantraceno inducidos.

Nuestra técnica continúa siendo fiel en algunos puntos fundamentales a la que NOVINSKY expuso en su Tesis Doctoral "Du probléme de la transplantation des tumeurs malignes".

nes, recherche expérimentale" en 1.877 ( 24 ). Estos puntos, en los que coincidimos son: El calibre del picado tumoral a transplantar, no debe sobrepasar los 3 ml. La incisión en la piel del receptor, debe reducirse a la mínima - extensión posible. ( Según NOVINSKY no debe sobrepasar los 5 cm.). La vitalidad del tejido a transplantar es condición "Sine quanon".

Descrito paso a paso, nuestra mecánica es la siguiente:

Es ideal disponer de un quirófano experimental. En su/ derecho debemos disponer de una habitación adecuada aislada de corrientes de aire, para mantener un ambiente lo menos séptico posible, con espacio suficiente para permitir/ moverse con libertad a cuatro personas, y con el resto de las condiciones propias de un laboratorio ( buena luz, instalación de agua corriente, etc.) Necesitaremos del siguiente material:

- Una campana de vidrio para anestesia de animales de experimentación.
- Un frasco de éter.

- Placas de Petri estériles.
- Un par de bandejas de congelador con hielo.
- Un equipo de paños estériles, para utilizarlos/ como "campos de quirófano", para cubrir el animal. Son ideales los paños de ojo.
- Un frasco de Merthilate o alcohol yodado.
- Una bolsa de gasas estériles.
- Tres pares de guantes de quirófano estériles.
- Mascarillas para todos los que se encuentren en el quirófano, donde se realiza el trasplante.
- Una rasuradora manual.

INSTRUMENTAL: ( todo él esterilizado)

- Cuatro cangrejos pequeños.
- Dos pinzas de trabajo sin dientes.
- Dos mosquitos curvos.
- Una pinza de Kogger.
- Unas tijeras rectas.
- Un mango de bisturí y hojas.
- Un número de trocares de mediano calibre (entre 2 y 2,5 ml.), igual al número de animales a inocular el tumor.

- Dos tijeras pequeñas, de punta fina, para el picado tumoral.
- Dos pinzas pequeñas (pinzas de cornea, por ejemplo de punta muy fina, para introducir el picado tumoral, en el interior de la punta del trocar.

Para mayor comodidad, en lugar de utilizar los servi--cios de esterilización habitualmente ( lo hacemos sólo con una frecuencia aproximada de una vez al mes), empleamos para la esterilización una "esterilizadora por pastillas de/formalina", que forma parte de nuestro equipo.

Consideramos que al guardar las mayores condiciones -asépticas posibles, es el único medio de tener la seguridad de un buen resultado.

Haciéndolo así, es innecesario el uso de lavados con +solución de antibiótica del material a inocular, procedi--miento en el que no confiamos y que como demuestra nuestros resultados, es absolutamente superflúo, si se esmeran las/condiciones de asepsia.

Aconsejamos no usar pinzas para sacar al animal de la jaula. Nosotros tampoco usamos guantes de protección, ya que, si no se han usado las pinzas, que al producirles dolor provocan agresividad en la rata, el uso de guantes de protección no es necesario. Sí usamos, guantes de un sólo/uso estériles (guantes para tacto rectal), para mantener limpias las manos, que después enfundaremos en los guantes quirúrgicos.

Una vez cogida la rata por el rabo, manteniéndola en alto, la introducimos en la campana de anestesia, donde previamente hemos vertido éter en cantidad abundante.

A los dos minutos aproximadamente, observaremos a través del cristal, que la rata deja de respirar. Solemos esperar al menos un minuto más, después de los últimos signos externos de vida, para asegurarnos que la rata ya no se reanimará durante la extirpación, ya que hemos observado, que se recuperan con gran facilidad, lo que dificulta el trabajo, siendo entonces necesario volver a introducirlo en la campana hasta la muerte, con las posibilidades de contaminación del tumor, quizá ya expuesto al exterior.

Una vez muerta la rata, la colocamos sobre la mesa a la que previamente hemos colocado encima 4 ó 5 papeles de filtro de laboratorio para protegerla de manchas. Pasamos a continuación a rasurar el área sobre la que vamos a escindir la piel. Una vez rasurada la pincelaremos con Merthiolate o simplemente alcohol yodado.

Hecha esta operación, tapamos el animal con paños estériles, dejando expuesto sólo el campo quirúrgico. El paño/ es fijado a la piel con los cangrejos.

Colocado el instrumental sobre un paño estéril, una vez puestos los guantes quirúrgicos, realizamos una incisión amplia, que sobrepase la eminencia de la tumoración en  $\frac{1}{2}$  cm. por cada extremo. La incisión, debe afectar sólo a la piel.

Fijamos los mosquitos en ambos labios de la piel, dejandolos caer a los lados con los que nos queda comodamente - expuesto el tumor en el centro. El tumor que no infiltra - la piel, se separa fácilmente de ella. En la zona más prominente del tumor colocamos la pinza de Kogger, cortando a su alrededor con el bisturí una pieza de unos 2 c.c., tra-



tando de evitar las zonas centrales, que suelen aparecer -necrosadas, de un característico color blanquecino-verdoso muy frías, ocupando el centro de la tumoración. Asimismo, hemos de evitar las zonas de cartílago articular, que/ pudieron estar englobadas.

Mientras realizabamos esta extirpación, un ayudante ha brá colocado una placa de Petri estéril, sobre la bandeja/ con hielo, en contacto directo con éste.

En esta placa de Petri, depositaremos la pieza extraída, que acto seguido comenzará a ser picada con una tijera fina.

Es importante, que el picado sea lo más fino posible, -llegando a conseguir un aspecto de pasta homogeneizada, no debiendo en cualquier caso, sobrepasar ninguna porción del picado tumoral, un calibre máximo de unos dos milímetros.

Un tercer ayudante, comienza a introducir la pasta del/ picado tumoral en los trocates, siendo suficiente con que sea rellenado aproximadamente medio centímetro a partir de

la punta del trocar. Con esta cantidad a los 3-4 días alcanza el tamaño de una almendra. Si el trocar se rellenara con mayor cantidad de picado tumoral, asistiríamos a un crecimiento más precoz. Una vez rellenado los trocares, van siendo colocados en otra placa de Petri, también en contacto con hielo.

Entre tanto, en la misma mesa que durante el transplante ocupaba la rata que portaba el tumor, vamos inoculando/ una a una a las ratas que teníamos preparados al efecto.

Nosotros no anestesiábamos a estas ratas, sino que usando la misma técnica que con la que portaba el tumor, la cogemos por el rabo sobre la mesa. Una vez allí, la rata tiende a huir o bien se queda quieta. En cualquiera de los dos casos, y siempre sin soltar el rabo, tapamos la rata con un paño grueso doblado, con nuestra mano izquierda, inmovilizándola fuertemente por detrás de la cabeza y aumentando entonces la tracción sobre el rabo. Un ayudante una vez inmovilizada la rata, pincelará con Merthiolate o alcohol yodado el lugar de la inoculación ( punto este que discutiremos seguidamente). Si éste es la extremidad posterior, el/

ayudante traccionará de su extremo distal con la mano izquierda, mientras que con la derecha introduce el trocar - en la masa muscular del muslo, comenzando a introducir el/ trocar justamente sobre la articulación, y no depositando/ su carga, hasta que la punta del trocar, haya realizado al menos un recorrido de dos centímetros dentro de la piel.

Con éste último punto, pretendemos alejar lo más posible el lugar de crecimiento del tumor del orificio de inoculación, para dificultar así la infección secundaria inmediata del tumor a partir de la solución de continuidad en/ la piel producida por el trocar.

A continuación vuelve a pincelarse la piel con Merthiolate o alcohol yodado y la rata pasa a otra jaula, donde - agruparemos a todas las inoculadas para su posterior distribución, según nuestro objetivo (conservación, tratamiento, control).

A partir, de una sólo rata donante, podemos conseguir una inoculación a un máximo de 17-18 ratas. No es aconsejable un número mayor, no sólo porque muy posiblemente no se

dispondría de suficiente cantidad de picado tumoral, sino/ porque no es aconsejable que entre la extirpación de la - pieza y la inoculación a la última rata, medie más de 20 minutos.

Recordaremos, que desde NOVINSKY ( 24 ), se sabe que la vitalidad de las células a transplantar, es un factor - fundamental, en el éxito de los transplantes.

En nuestras sesiones de transplantes, no transplantamos más de 13 ratas a partir de un sólo donante. Con ello, tenemos un buen margen de material a transplantar, y nunca hemos tenido problemas con que no prenda un transplante por desvitalización celular, ya que no se tarda más de 15/ minutos, aproximadamente con éste número de ratas.

El hacer en una misma sesión un transplante a un superior número de ratas, en dos tiempos, es decir, a partir - de dos donantes, conlleva la necesidad de doble instrumental, ya que recordaremos que las condiciones de asepsia son la clave del éxito.

En cuanto al lugar de inoculación, tras un período inicial en el que utilizabamos el trasplante en la zona muscular de la extremidad posterior ( más cómodo la izquierda) sólo para conservación del tumor, y el trasplante en tejido celular subcutáneo sobre la parrilla costal izquierda, para las destinadas a tratamiento y control, actualmente sólo empleamos el trasplante en la extremidad posterior; por su facilidad de inoculación, porque permite apreciar tan fácilmente como en tejido celular subcutáneo el crecimiento de la tumoración, porque es mucho más rápido de inocular evitándose así, en las sesiones de trasplante largas la desvitalización celular, porque se reduce al mínimo el riesgo de algún pinchazo del ayudante a sí mismo, porque se evitan el 3% de casos de muerte de la rata antes de los 3 días por accidente de inoculación, al lesionar el trocar algunos órganos torácicos o peritoneales.

Esta posibilidad, en la práctica es mayor de lo que pudiera parecer, ya que la rata a menudo realiza movimientos violentos o inesperados y además la consistencia de su parrilla costal y de los músculos intercostales, es despre--

ciable sí la comparamos con la dureza de su piel, que hay/ que vencer con el trocar.

Por todo ello, aconsejamos el transplante intramuscular en la extremidad posterior izquierda.

Es importante, que cada generación de tumores, a una - de las ratas inoculadas y que se destine a conservación, le sea extirpado el tumor y realizado estudio anatomopatológico para tener siempre la certeza histológica de que seguimos transplantando el tumor inicial y que no ha sufrido - cambios en su estructura.

Como más adelante expondremos, en nuestra experiencia el tumor no sufrió nunca cambios anatomopatológicos.

A pesar de que la imagen macroscópico coincida con la/ habitual del tumor, es obligado realizar estos repetidos - estudios histológicos, ya que abscesos bacterianos, granulomas crónicos por hongos e incluso crecimiento de tumores/ espontáneos próximos al lugar de inoculación, pueden confundirnos y perder así al transplantarlo una generación de -

transplantes y un tiempo precioso.

Este método de transplante mediante trocar, es el seguido con algunas pequeñas variaciones, en el Sloan-Kettering Center, donde cada semana son transplantados mil o más tumores experimentales, siguiendo este sistema. Según/STOCK ( 55 ) el "Solid tumor screening group" del Sloan - Kettering Institute for Cancer Research, ha transplantado/ en los últimos 7-8 años, una cifra aproximada de 375.000 - tumores.

METODOS DE TRATAMIENTO DE LOS TUMORES TRANSPLANTADOS  
CON BACILO DE CALMETTE Y GUERIN (B.C.G.) Y NEUROAMI-  
NIDASA DEL VIBRIO COLERAE (V.C.N.).

Hemos realizado cuatro experiencias de tratamiento con inmunoadyuvantes, de tumores químico inducidos en 132 ratas Wistar. En tres de ellas, hemos usado el tumor de Yoshida.

La cuarta experiencia de tratamiento, se realizó sobre tumores Metil-Colantreno- Inducidos.

Hemos usado como inmunoadyuvantes, dos sustancias: la/ B.C.G. (Bacilo de Calmette y Guerin) del Instituto IBYS y/ la V.C.N. (Neuroaminidasa del Vibrio Colerae). Aunque ya - hicimos referencia en otro apartado de este trabajo, descri- biremos aquí este inmunoadyuvante, menos conocido que la - B.C.G. (Bacilo de Calmette y Guerin).

La Neuroaminidasa empleada por nosotros, es un fermento aislado del cultivo filtrado del vibrio comma (Choleral).

Es un mucopolisacárido-N-Acetil-Neuroaminil hidrolasa/



3.2.1.18. Está preparado por el laboratorio BEHRINGWERKE A.G.

Con una actividad de 500 unidades de Neuroaminidasa -- por milímetro cúbico, vá disuelta en una solución tampón - de acetato de sodio 0.05 mol/l de pH 5.5 con el agregado/ de 9 mg./mEq de cloruro de sodio y de 1 mg./l de cloruro - de sodio.

La actividad de la Neuroaminidasa, se determina por me dio de la cantidad liberada de ácido N-Acetil-Neuroamínico con el reactivo BIAL, según el método de P. BOHM, St. DAUBER y L. BAUMEISTER, modificado por H.E. SCHULTZE.

La V.C.N. es inactivada por una temperatura de 65° C.-- durante 30 minutos o por 100° C durante 10 minutos.

Su mecanismo de acción, parece ser el de una acción di recta sobre la superficie celular, alternando en ella a - los residuos terminales de ácido sialico.

La alteración de estos residuos puede no sólo inducir/ a una inhibición esteárica ante la percepción antigénica - sino que además actúa reduciendo la carga negativa de la

célula ( 56 ), lo que contribuye a aumentar la deformidad celular ( 57 ) y aumenta en fin, la susceptibilidad de la célula para ser fagocitada ( 58 ) ( 59 ).

En las cuatro experiencias de tratamiento, designadas/ como A,B, C y D hemos seguido la misma técnica y ritmo de administración.

La experiencia A, se ha realizado sobre 36 ratas Wistar, portadoras de tumor de Yoshida en su forma sólida en la ex tremidad inferior izquierda. Se ha usado como coadyuvante, la :B.C.G. del Instituto Ibys.

Para tratar de reducir al mínimo el margen de error, y también para ajustarnos a las condiciones ideales del transplante (véase apartado anterior), esta experiencia A se ha realizado en tres tiempos sucesivos: En cada uno, se han - usado 12 ratas.

La técnica ha sido la siguiente:

- A los 5 días de transplantado el tumor a estas 12 ra tas, y cuando ya las tumoraciones alcanzaban un diámetro -

medio de 1.5 a 2 cm., se hacen dos grupos de 6 ratas cada/ uno, que se separan en dos jaulas contiguas. Las 6 ratas - de una de las dos jaulas ( escogidas al azar), son trata-- das ese día ( 5º día después del transplante), con una do-- sis intratumoral de 0.10 mm<sup>3</sup>, usando para su administración jeringas de insulina. Las dosis se repetirán cada 96 horas mientras existan ratas supervivientes. Las 6 ratas de la - otra jaula, permanecen como controles.

Una vez terminada la experiencia ( cuando las 12 ratas hubieran muerto), se repitió el experimento con 12 ratas - más y sucesivamente con otras 12, hasta alcanzar así el nú-- mero de 36, con un total de 18 tratadas y 18 usadas como - control. Figura nº 7

La experiencia de tratamiento B, sobre 38 ratas ha cum-- plido las mismas condiciones que la A: Ratas wistar, tumor de Yoshida en forma sólida en extremidad posterior izquier-- da. Tres experiencias sucesivas, sobre 12 ( 6 tratadas y 6 controles) 12 ( 6 tratadas y 6 controles) y 14 ( 7 trata-- das y 7 controles).

FIGURA Nº 7

ADMINISTRACION INTRATUMORAL DE IMMUNOADYUVANTE, EN UNA RATA WISTAR PORTADORA DE TUMOR DE YOSHIDA EN FORMA SOLIDA DE 14 DIAS DE EVOLUCION.



El tratamiento, también comenzado el 5º día tras el --  
transplante, ha consistido esta vez, en  $0.10 \text{ mm}^3$  de Neuro-  
aminidasa (V.C.N.) administrada intratumoral cada 96 horas,  
usando asimismo, jeringas de insulina.

La experiencia C, sobre 38 ratas, similar en todos sus/  
aspectos a las anteriores, salvo en que esta vez, hemos -  
usado como coadyuvantes (Bacilo de Calmette y Guerin)B.C.G.  
y (Neuroaminidasa del vibrio colerae) V.C.N., administrando  
a cada rata designada para tratamiento  $0.10 \text{ mm}^3$  de cada -  
coadyuvante, intratumoralmente, repitiendo las dosis cada/  
96 horas a partir del 5º día de transplante y usando una -  
jeringa de insulina distinta para cada sustancia.

La experiencia D, sobre 20 ratas ha sido realizada en/  
dos tiempos, de 10 ratas cada uno. En cada uno de ellos, -  
5 se trataron y 5 permanecieron como controles. Se trataba  
de 20 ratas Wistar con un miofibrosarcoma en su extremidad  
posterior izquierda, 2ª generación de transplante de un tu-  
mor inducido por nosotros, con 20-METHYLCHOLANTRENE, comer-  
cializado por la Chemical Company (Sigma).

Hemos usado Neuroaminidasa del *Vibrio Colerae* (V.C.N) como tratamiento.

También a dosis de  $0.10 \text{ mm}^3$  cada 96 horas, pero comenzando esta vez a los 16 días del trasplante, fecha en que los tumores alcanzaron el 1.5 cm. - 2 cm. de diámetro. (Por ser el miofibrosarcoma Metil-Colantreno inducido, de más - larga evolución que el Yoshida).

En el siguiente capítulo exponemos los resultados obtenidos con estas experiencias de tratamiento.

### III.- RESULTADOS

## RESULTADOS.

### A.- INDUCCION DE TUMORES

A 20 ratas se les inyectó parenteralmente 0.25 ml. de/ una solución de 60 mg. de Metil-Colantreno en 5 c.c. de - aceite de oliva. Figura nº 8

Dos ratas no presentaron tumoraciones; en otras 3 lo/ hicieron a los 120-125 días y en 15 de ellas a los 98 días se palpaban tumoraciones en el lugar de la inoculación del carcinógeno. Realizamos necropsias a los 30 días de aparecer las tumoraciones, evidenciándose neoformaciones del tamaño de una ciruela que invadían estructuras vecinas, incluyendo periostio y hueso. Los tumores presentaban abundante vascularización. En algunos de ellos se apreciaban cavidades quísticas con líquido hemático que no contenía células neoplásicas ( según informes del Departamento de Anatomía Patológica, Prof. Dr. Galera Davidson). No se evidenciaban metástasis. El estudio anatomopatológico lo iden



FIGURA Nº 8

RATA WISTAR PORTADORA DE UN TUMOR CON 35 DIAS DE EVOLUCION,  
2ª GENERACION DE TRANSPLANTE DE UN TUMOR METIL COLANTRENO IN  
DUCIDO POR NOSOTROS.



tificó como un "Miofibrosarcoma".

Tumores en Syrians Hamster:

A 15 Syrians Hamsters se les administró parenteralmente 0.15 c.c. de una solución de 60 mg. de Metilcolantreno/ en 5 c.c. de aceite de oliva.

Se les inyectó el día 8 de Noviembre de 1.976, apareciendo las primeras tumoraciones el día 16 de Febrero de 1.977, 4 días después ( 20 de Febrero), los 15 animales presentaban tumoraciones. El tiempo de latencia fué pues de 98 días  $\pm$  4.

Se realizaron necropsias y estudio anatomopatológico del tumor, que tenía el tamaño de una ciruela pequeña.

Al examen histopatológico presentaba una imagen de infiltración de fibrillas reticulares por una neoformación constituida por paquetes de células, de nucleos irregulares y escaso citoplasma claro.

Había abundantes atípicas y mitosis. El diagnóstico anatómopatológico fué: "Sarcoma de Estroma". No se evidenciaron metástasis.

Repitiendo en otros 5 Syrians Hamsters la misma dosis/ de carcinógeno a los 9 y a los 18 días no conseguimos acortar el tiempo de latencia que continuó siendo aproximadamente de 98 días.

Los 10 Syrians Hamsters tratados con Benzantraceno parenteralmente a dosis de 0.10 c.c. ( 20 mg. de Benzantraceno + 5 c.c. de Benceno + 10 c.c. de aceite de oliva) que se repitió a los 15 días, presentaron a los 15-20 días, de la 2ª dosis de Benzantraceno ulceraciones en la piel que cicatrizaron espontáneamente. A los 90 días eran palpables tumoraciones en el lugar de la inoculación. En las necropsias no se observaron metástasis y el diagnóstico anatómopatológico fué Miofibrosarcoma.

Como acabamos de ver en todas nuestras experiencias de inducción de tumores, el tiempo de latencia de aparición de las tumoraciones ha sido de  $90 \pm 8$  días independientemente

te de la especie del animal empleado, del carcinógeno y de la dosis del mismo, a excepción de 3 ratas inyectadas con/6 Metilcolantreno, que desarrollaron los tumores a 120-125 días de la administración del carcinógeno.

Es más frecuente la inducción de tumores con resultados positivos (87%) en ratas Wistar que en Syrians Hamsters - (30%).

#### B.- TRANSPLANTES DE TUMORES

Nuestra experiencia en este sentido es de 625 transplantes (525 en ratas Wistar y 100 en Syrians Hamsters).

En todos ellos, hemos seguido el método ya descrito en el apartado correspondiente.

Trabajamos habitualmente con ratas Wistars, no obstante describiremos en este apartado algunos datos de interés

respecto a nuestras experiencias de transplante en Syrians Hamsters.

Los tumores transplantados han sido sarcomas de Yoshida y tumores Metil- Colantreno y Metil-Benzantraceno inducidos.

En cuanto a nuestros trabajos de transplante con el tumor de Yoshida, hemos obtenido los siguientes datos:

- La rata Wistar con tumor de Yoshida en su forma sólida tiene una supervivencia media de 15.3 días, a partir del día del transplante. Las primeras bajas, nunca se producen antes del décimo día, siendo los días 12 y 14 a partir del transplante, los de máxima incidencia de bajas. Aconsejamos el 9º ó el 10º día, para seleccionar la rata que servirá como donante para el siguiente transplante.

La supervivencia máxima obtenida es de 32 días.

Con una experiencia de 425 trasplantes de tumor de Yoshida en forma sólida a ratas Wistars, siguiendo nuestra téc

nica habitual, hemos obtenido una casuística de 99.88% de éxito en el transplante. Figura nº 9

Sólo tuvimos dificultades, con un grupo de 25 ratas, en las que, motivado por deficientes condiciones de asepsia, el material a inocular resultó infectado por un enterobacter.

No conseguimos inducir el tumor en ninguna de las 25 ratas infectadas.

Los tratamientos con el antibiótico de elección según el antibiograma, erradicaron la infección pero el tumor no prendió. Realizamos un picado de las tumoraciones que presentaban algunas de las ratas en el lugar de la inoculación en las que se evidenciaba pus. Añadimos solución de Fosfocina en suero fisiológico a dicho picado, pero tampoco conseguimos que prendieran.

Realizamos estudio anatómo-patológico de estas lesiones demostrándose que no había células neoplásicas. Eran pues, abscesos.

FIGURA Nº 9

RATA WISTAR PORTADORA DE UN TUMOR DE YOSHIDA EN SU FORMA SOLIDA, 20<sup>ava</sup>. GENERACION DE TRANSPLANTE CON 18 DIAS DE EVOLUCION.



Así pues, en el único caso de infección del material a/ transplantar que hemos sufrido, no conseguimos con el uso/ de antibióticos ( por vía intramuscular y por lavado al ma/ terial a inyectar) el éxito del transplante.

En cuanto a los transplantes de tumores Metil-Colantreno inducidos, en ratas Wistar, con una experiencia de unos - 100 transplantes, hemos obtenido una positividad de un 80%.

La media de supervivencia es de unos 40 días. Las prime/ ras bajas, no se produjeron antes de los 16 días.

La supervivencia máxima observada es de 105 días.

Queremos reseñar aquí la obtención de un transplante he/ terólogo:

A pesar de que en otro apartado de este trabajo, recoge/ mos la obtención de algunos transplantes heterólogos a lo/ largo de la historia de los transplantes experimentales, - consideramos de interés el reseñar este hecho, ya que la - circunstancia de la ausencia de preparación inmunosupreso-



ra antes del trasplante, lo hace infrecuente.

Se trataba de un tumor de Yoshida en su forma sólida,-- que siguiendo nuestro método habitual, transplantamos de una rata Wistar adulta a un Syrians Hamster adulto, sin preparación inmunosupresora alguna.

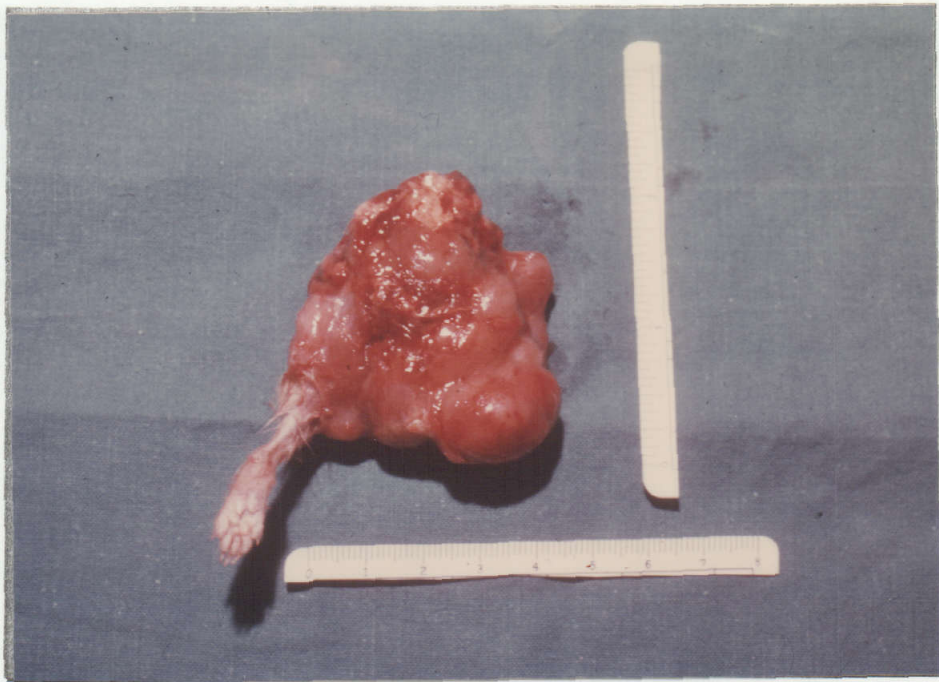
A la semana de la inoculación, y ante nuestra sorpresa el Syrian Hamster presentaba, en su extremidad posterior izquierda un tumor del tamaño de una "cereza" (Abril, 1.977). Figura nº 10.

Extirpado el tumor a los 9 días, el informe del Departamento de Anatomía Patológica, Prof. Galera Davidson, de nuestro Hospital Universitario, describía la preparación como correspondiente a una "sarcoma de Yoshida", indistinguible en todas sus características del resto, Figura nº 11 de las preparaciones estudiadas anteriormente en dicho departamento, correspondientes a las realizadas de rutina en nuestras ratas Wistar con Yoshida en forma sólida.

El picado tumoral realizado con la parte de la pieza -

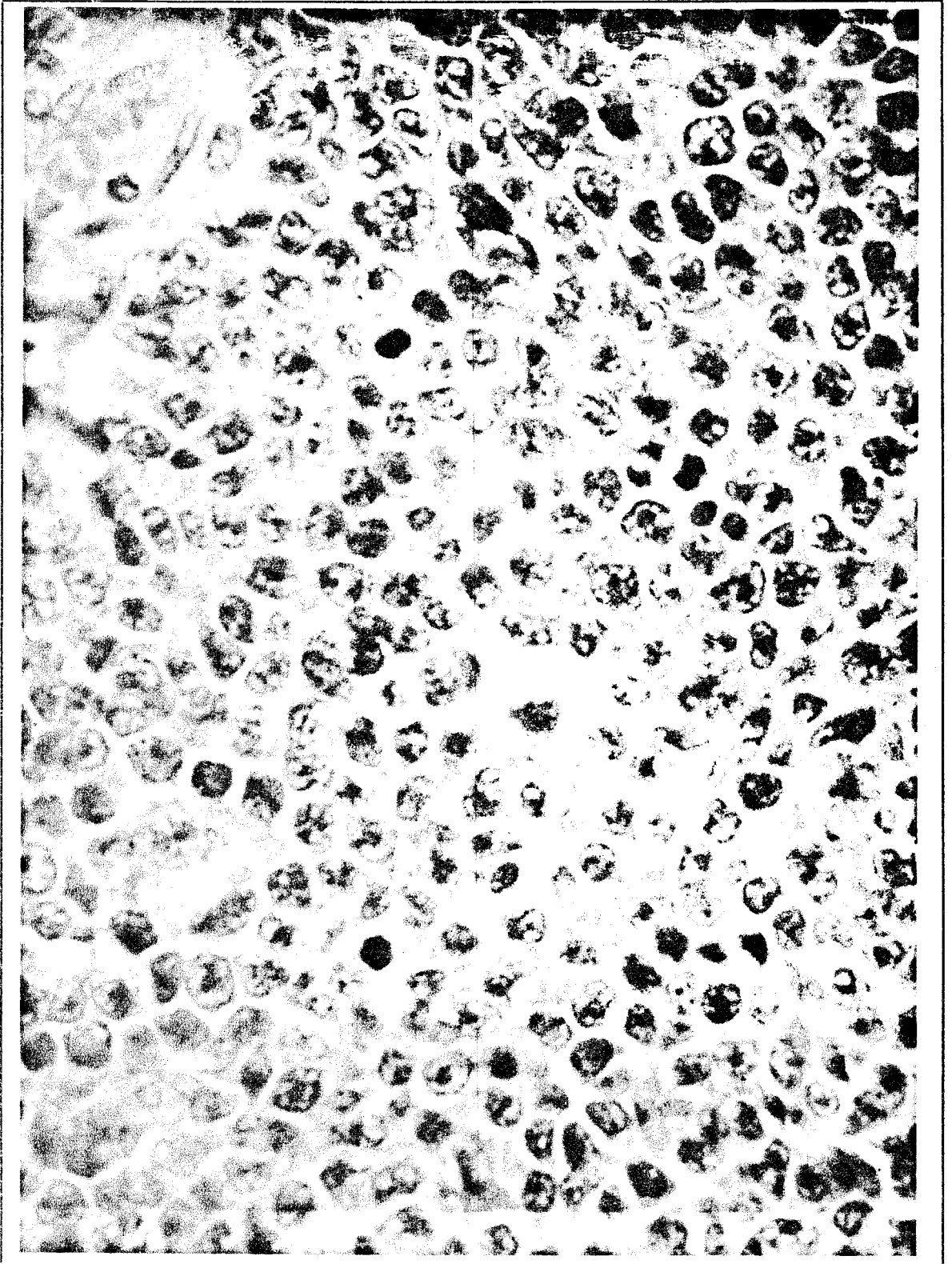
FIGURA Nº 10

EXTREMIDAD POSTERIOR IZQUIERDA DE UN SYRIAN HAMSTER ADULTO  
CON TUMOR DE YOSHIDA EN SU FORMA SOLIDA, SIENDO EL DONANTE  
DEL TRANSPLANTE UNA RATA DE LA VARIEDAD WISTAR.



## FIGURA Nº 11

MICROFOTOGRAFIA DE LA FORMA SOLIDA DE UN TUMOR DE YOSHIDA TRANSPLANTADO DE UNA RATA WISTAR A UN SYRIAN HAMSTER. LAS CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS DE ESTA PREPARACION SE CONSERVAN IDENTICAS A LAS DE LA FIGURA.5 SE OBSERVA CELULARIDAD UNIFORME, MITOSIS Y ESTROMA DE FIBRAS DE RETICULINA Y DE COLAGENO. (H.E. 400 x).



que no se envió a Anatomía Patológica, se inoculó a 15 Syrians Hamsters y no prendió en ninguno de ellos.

En la actualidad, continuamos trabajando en tumores - Metilcolantreno y Benzantraceno inducidos en Syrians Hamsters y en su día, se publicaran los resultados de transplantes y tratamientos.

### C.- TRATAMIENTOS

Hemos expresado los resultados de nuestras experiencias de tratamiento A,B,C y D en 4 cuadros y 4 gráficas.

Así pues, la experiencia A viene expresada en el cuadro T-1 y en la gráfica T-1

La experiencia B en el cuadro T-2 y en la gráfica T-2.

La experiencia C en el cuadro T-3 y en la gráfica T-3

La experiencia D en el cuadro T-4 y en la gráfica T-4

En los cuadros y gráficas, han sido "superpuestas" las distintas fases de cada experiencia ( ver Material y Métodos capítulo IX), mostrándose cada una de ellas, como una/ unidad.

La integración de datos parciales, en un sólo cuadro o/ gráficas, aporta mayor fiabilidad a la experiencia. En el/ siguiente capítulo, expondremos la valoración estadística/ de estos resultados.

En el caso de la experiencia A, en la que 18 ratas Wis- tar con tumor de Yoshida en su forma sólida, fueron trata- das con B.C.G. intratumoral a dosis de  $0.10 \text{ mm}^3$  cada 96 ho- ras a partir del 5º día del transplante y otras 18 ratas, - asimismo portadoras del tumor, permanecieron como contro- les sin tratamiento, hemos observado un retraso en la mor- talidad de las tratadas respecto a las controles ( con un/ valor de  $P < 0.05$ : así mientras en el día 12 a partir del/ transplante vivían 12 ratas, ese mismo día, de las ratas - controles no tratadas sobrevivían sólo 6.

El día 14 observamos como un número de ratas vivas tra

tadas es de 6 y sólo 3 el número de supervivientes de las/ controles. Sin embargo, el día 21 tras el trasplante, sólo sobrevivían una rata de cada grupo (tratadas y controles). Al valorar estas cifras, es necesario no olvidar la corta evolución del tumor de Yoshida.

El tratamiento no modificó en forma apreciable el tamaño de las tumoraciones, ni su velocidad de crecimiento.

La B.C.G. inyectada intratumoralmente a las dosis descritas no mostró toxicidad ni efecto indeseable alguno.

CUADRO T-1 y GRAFICA T-1.

La experiencia de tratamiento B: 19 ratas Wistar con tumor de Yoshida en forma sólida en extremidad posterior izquierda, tratadas con V.C.N. a dosis de  $0.10 \text{ mm}^3$  cada 96 horas a partir del 5º día del trasplante, y otras 19 ratas también portadoras de tumor, usadas como controles, ha mostrado unos paradójicos e interesantes resultados: Hemos observado una precocidad de la mortalidad en las ratas tratadas con V.C.N. con respecto a las controles.

Si observamos el cuadro T-2, vemos que hasta el día 12 a partir del trasplante, la mortalidad había sido para lela en las ratas tratadas y en las ratas controles. Sin embargo,, y a partir del día 13, asistimos a un rápido incremento de la mortalidad en las ratas tratadas con respecto a las controles. Así, por ejemplo observando el cuadro/ T-2, vemos que el día 14 tras el trasplante, continúan vi vas 13 ratas controles y sin embargo, sólo sobrevivían 7 ratas de las tratadas con V.C.N.

El día 16, vemos que frente a 13 ratas controles ( con tumor y sin tratamiento) tan sólo continúan con vida 5 ratas de las que recibieran tratamiento.

La velocidad de crecimiento y el tamaño de las tumora- ciones, no ofreció diferencias entre uno y otro grupo, du- rante la experiencia.

También es interesante, el hecho de que ninguna rata de las tratadas sobrevivió más allá del día 25 tras el trans plante, y sin embargo, el día 30 sobrevivían 2 ratas con-- troles.



La valoración estadística de estos resultados como veremos en el siguiente capítulo, fué altamente significativa, con un valor de  $P < 0.025$ .

Nos pareció indicado, descartar una posible toxicidad/ de la V.C.N. en las ratas que pudiera correlacionarse con los resultados de nuestra experiencia B.

Usamos para ello, un grupo de 20 ratas sanas, que durante dos meses fueron tratadas con V.C.N. : 5 de ellas, a las dosis habitualmente usadas por nosotros ( $0.10 \text{ mm}^3$  intramuscular, otro grupo de 5 ratas recibió  $0.20 \text{ mm}^3$ ; otras 5/ ratas a dosis de  $0.30 \text{ mm}^3$  y otro grupo de 5 que recibieron  $0.60 \text{ mm}^3$ , inyectándose además estas dosis cada 48 horas en lugar de cada 96 horas, como en nuestros tratamientos habituales.

No observamos ninguna alteración en la salud de las ratas. Sacrificamos una rata de cada grupo de 5, para realizar necropsia, no encontrando ninguna alteración anatomopatológica de interés. La Neuroaminidasa del *Vibrio Colerae*, no es pues tóxica, para la rata Wistar, a las dosis descri

tas.

Experiencia de tratamiento C: Esta experiencia, fué realizada sobre 38 ratas Wistar, portadoras de tumor de Yoshi da en su forma sólida en la extremidad posterior izquierda, de las que 19 recibieron tratamiento con  $0.10 \text{ mm}^3$  de B.C.G. y  $0.10 \text{ mm}^3$  de V.C.N., ambos inmunoadyuvantes por vía intratumoral, a partir del 5º día del trasplante, repitiendo la dosis cada 96 horas. Ver cuadro T-3 y Gráfica T-3.

En esta ocasión, observamos un constante paralelismo - con mínimas diferencias, en cualquier fecha que consideremos a partir del trasplante entre los dos grupos de ratas (tratadas y controles). Así, por ejemplo, el día 13: Sobreviven 10 ratas tratadas y 12 ratas controles. El día 19 viven 6 ratas tratadas y 7 controles, el día 22, 4 ratas tratadas y 3 controles, el día 24, 3 ratas tratadas y 2 controles. Curiosamente, el número de ratas tratadas es uniformemente inferior en una a dos unidades, con respecto a número de ratas controles que sobreviven. En cuanto a las supervivencia, vemos que se mantiene la uniformidad de este estudio: la última rata tratada, muere el día 27 y la úl-

tima control lo hace el día 26.

Consideramos importante resaltar de nuevo en este lugar que a cada experiencia de tratamiento ( A, B ó C) hemos llegado, sumando 3 experiencias parciales: en la A, 38 ratas/ se realizó estudiando consecutivamente 3 grupos de 6 en - tratamientos y 6 controles, y de igual forma procedimos en los casos B y C, y queremos destacar que los resultados obtenidos en cada tiempo de cada experiencia, fueron siempre concordantes.

Experiencia de tratamiento D: Realizada en dos tiempos/ sobre 20 ratas Wistar portadoras de un miofibrosarcoma en/ su extremidad posterior izquierda, 2ª generación de trans- plante, de éste tumor Metil-Colantreno inducido por noso-- tros, siguiendo la técnica ya descrita en otro apartado de este trabajo.

En cada tiempo, las 10 ratas, portadoras de tumores -- fueron divididas en 2 grupos de 5 ratas cada una. Uno de - los grupos recibió tratamiento con  $0.010 \text{ mm}^3$  de V.C.N., in tratumoral. Comenzaron a tratarse desde el día 16 tras el

transplante, repitiéndose esta dosis cada 96 horas. Ver -- cuadro T-4 y gráfica T-4.

La característica de más larga evolución de este tumor con respecto al Yoshida, justifica el retraso en el comienzo del tratamiento. Se comenzaron a tratar cuando las tumores median de 1.5 a 2 cm. de diámetro.

Sólo una ojeada superficial al cuadro T-4 y a la gráfica T-4, nos bastará para darnos cuenta que en este caso no existe diferencias apreciables entre el grupo de ratas tratadas con V.C.N. y las controles.

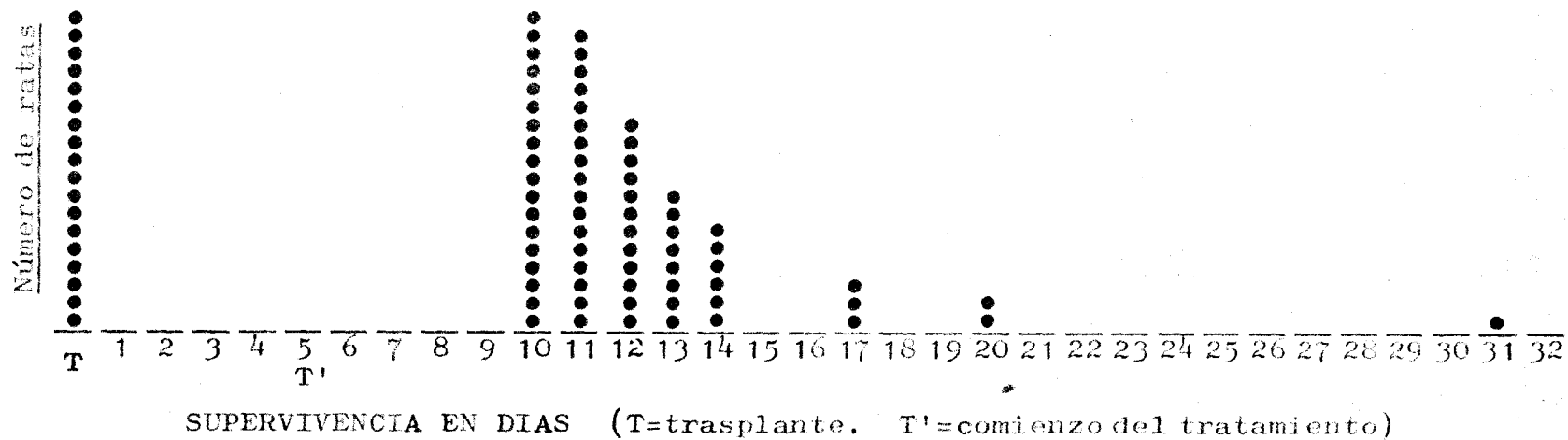
Un estudio más detenido nos permitirá observar que hasta los 40 días a partir del día del transplante la incidencia de mortalidad en ambos grupos es idéntica.

A partir de esta fecha la mortalidad en las ratas controles es ligeramente superior a las tratadas con V.C.N.

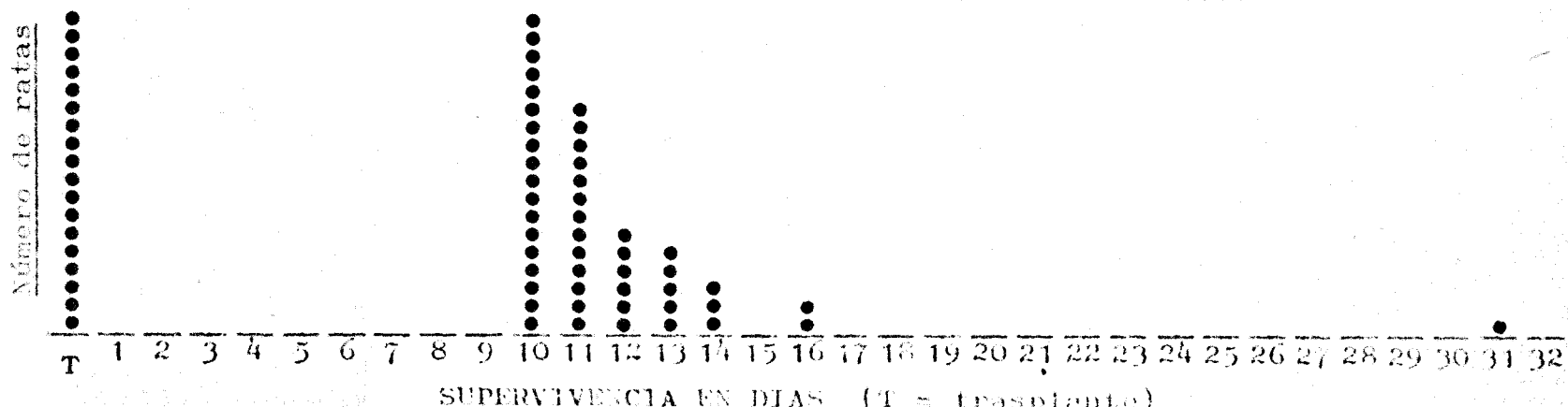
La última rata control muere a los 80 días del transplante y la última rata tratada a los 90 días.

No obstante, estas cifras, como más adelante veremos, no encuentran una significación estadística.

Cuadro 1º: 18 ratas Whistar con tumor de Yoshida en su forma sólida, tratadas con B.C.G. intratumoral a 0'10 mm<sup>3</sup> cada noventa y seis horas (cuatro días)



Cuadro 2º: 18 ratas Whistar con tumor de Yoshida en su forma sólida usadas como controles



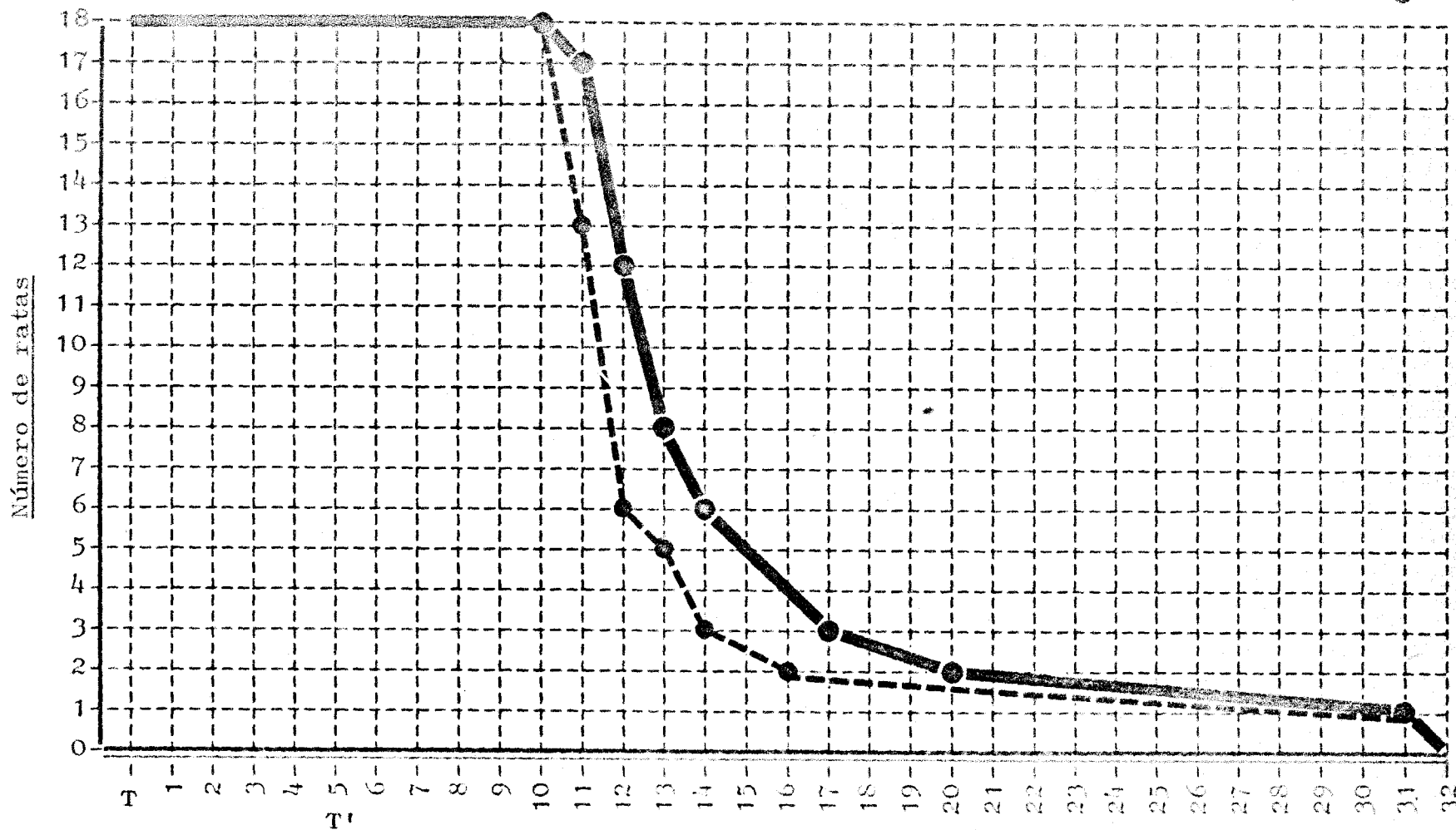
EXPERIENCIA DE TRATAMIENTO "A"

GRAFICA T-1

36 RATAS: (18 tratadas con B.C.G.  
18 controles, no tratadas.

Ratas tratadas con B.C.G.: —●—

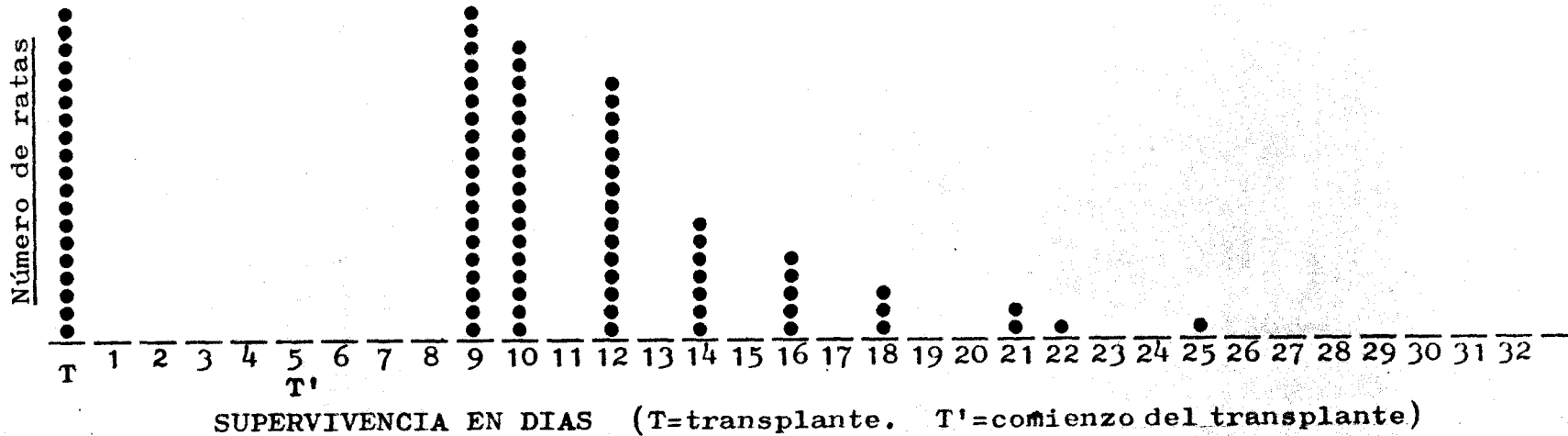
Ratas controles: - - -●-



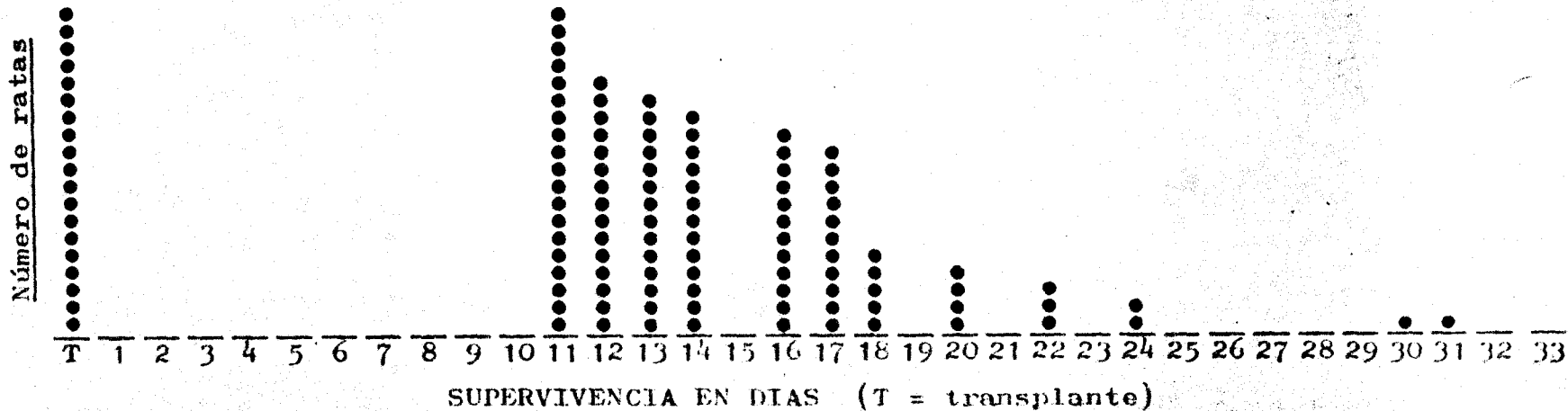
T = día del trasplante.

T' = comienzo del tratamiento.

Cuadro 1º: 19 ratas Whistar con tumor de Yoshida en su forma sólida, tratadas con Neuroaminidasa del Vibrio Colerae intratumoral a dosis de 0'10 mm<sup>3</sup> cada noventa y seis horas (cuatro días)



Cuadro 2º: 19 ratas Whistar con tumor de Yoshida en su forma sólida usadas como controles

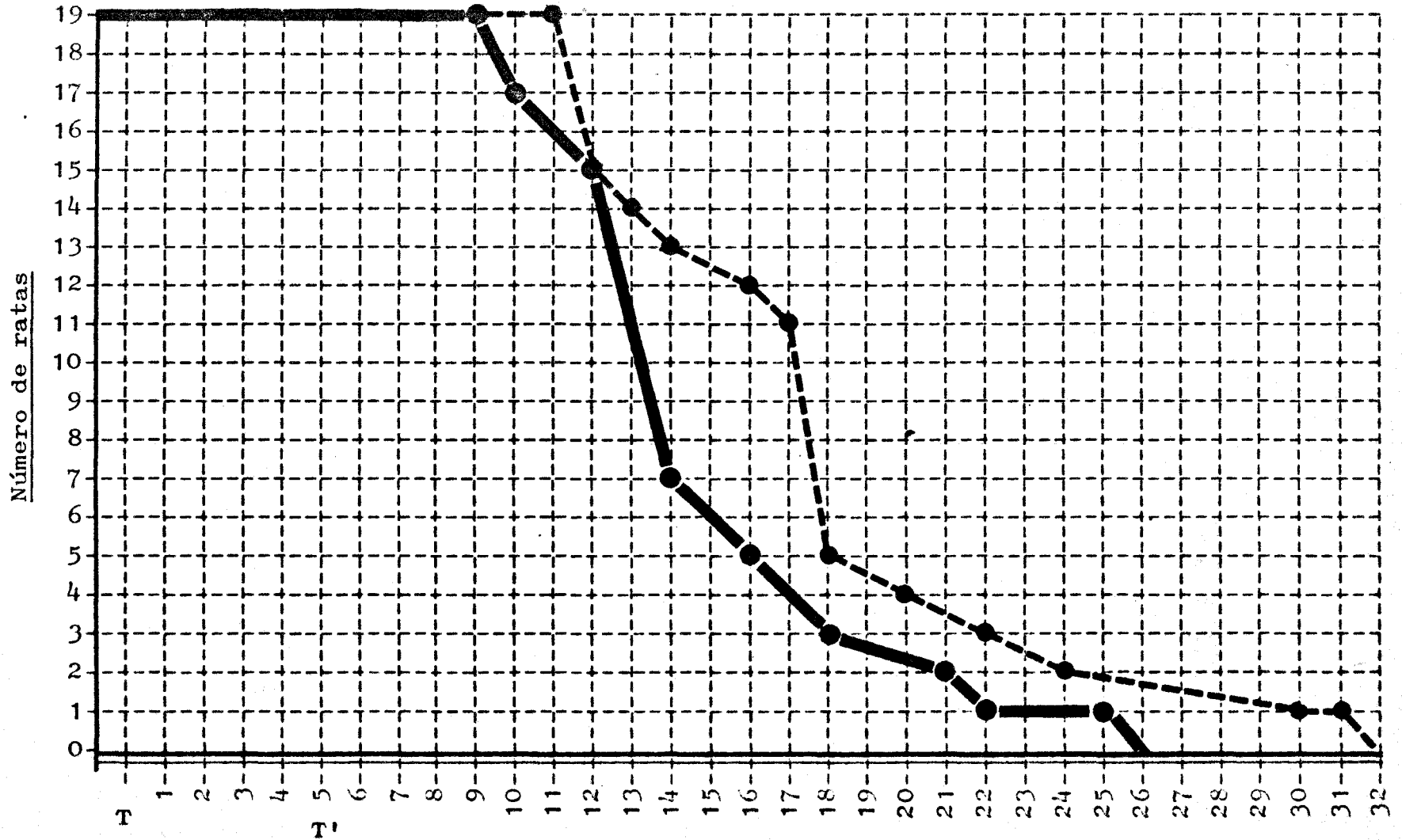




38 RATAS: 19 tratadas con Neuroaminidasa.  
19 controles, no tratadas.

Ratas tratadas con Neuroaminidasa: —●—

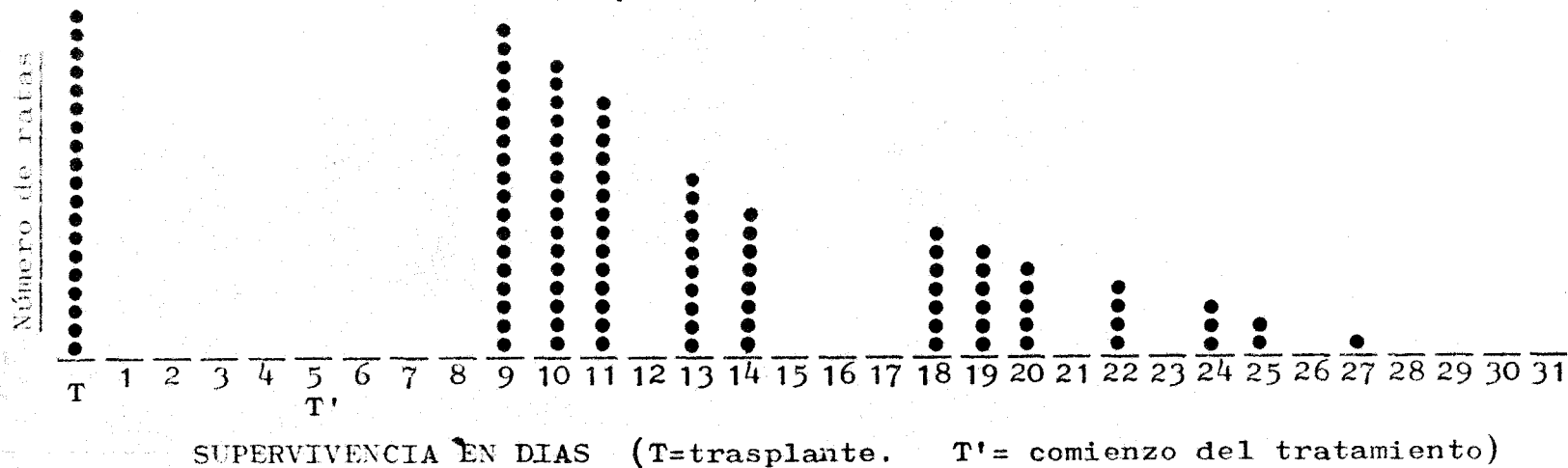
Ratas controles: - - -●- - -



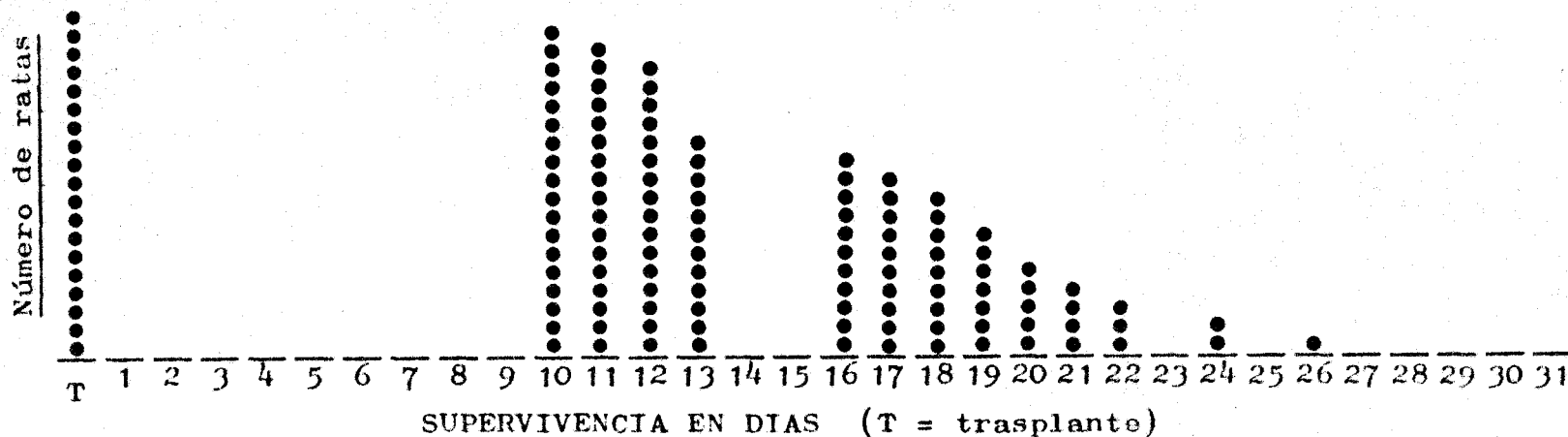
T = día del trasplante.

T' = comienzo del tratamiento.

Cuadro 1º: 19 ratas Whistar con tumor de Yoshida en su forma sólida, tratadas con B.C.G. más Neuroaminidasa, a dosis de 0'10 mm<sup>3</sup> de cada cead yudante, cada noventa y seis horas (cuatro días)



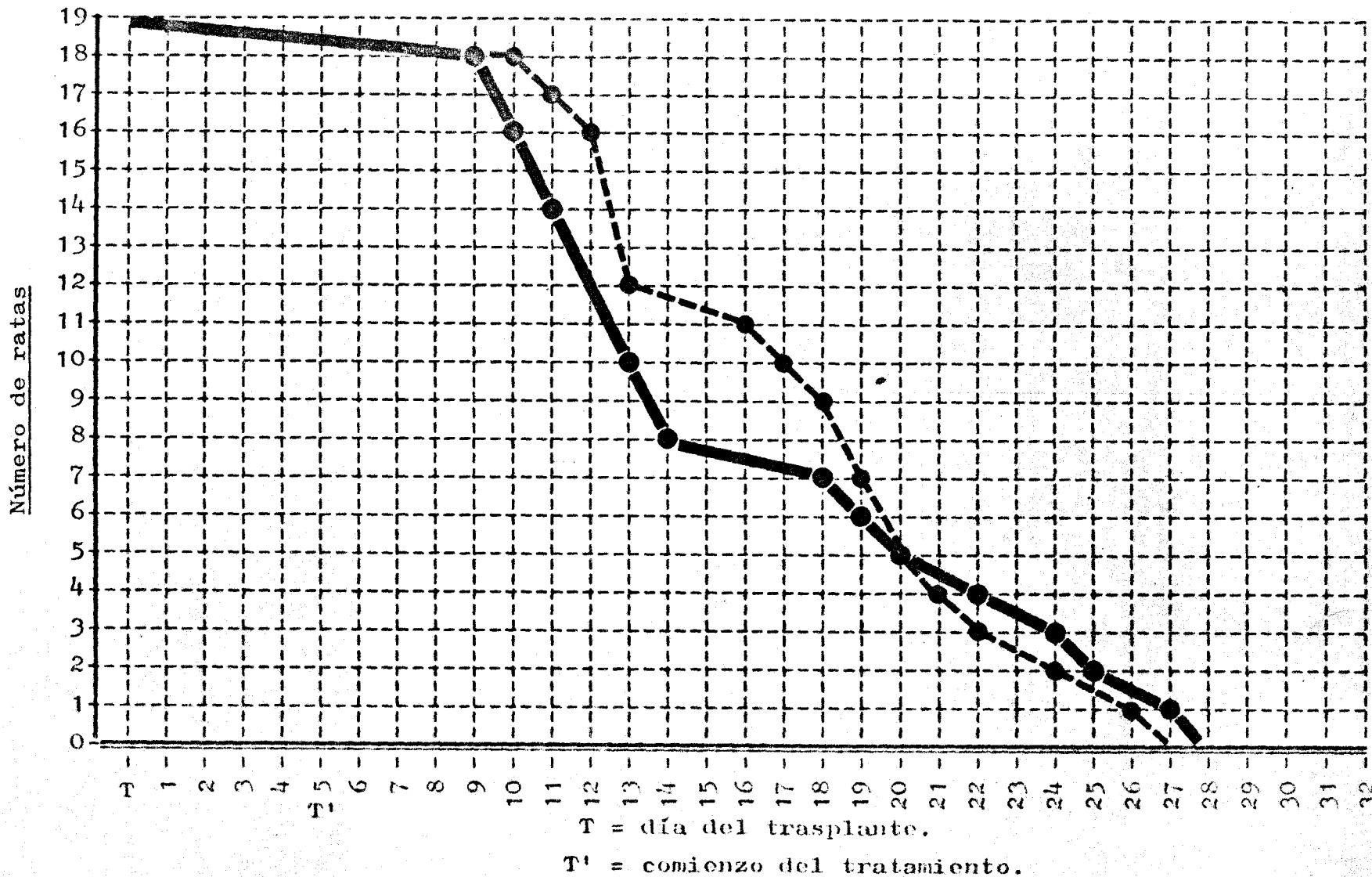
Cuadro 2º: 19 ratas Whistar con tumor de Yoshida en su forma sólida, usadas como controles



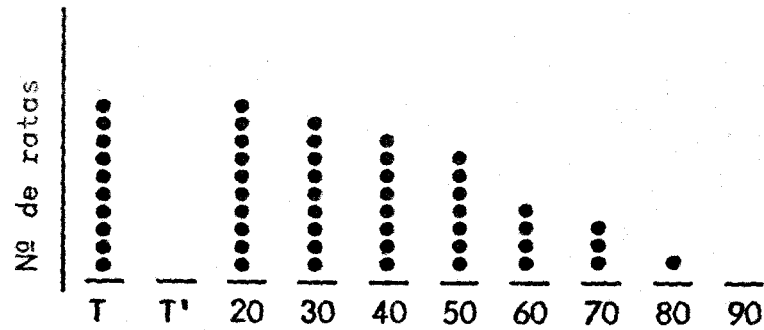
38 RATAS: ( 19 tratadas con BCG + Neuroaminidasa.  
19 controles, no tratadas.

Ratas tratadas con BCG + Neuroaminidasa: —●—

Ratas controles: - - -●- - -

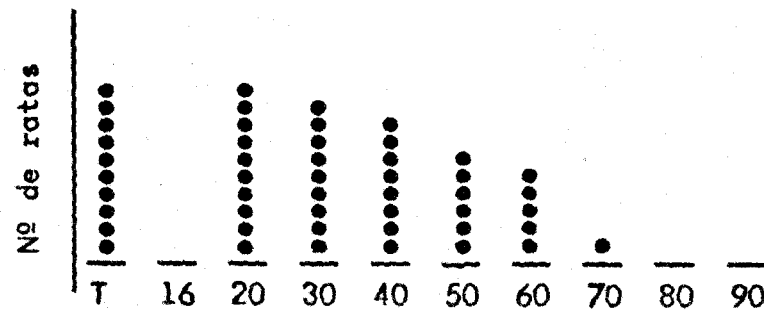


Cuadro 1º: 10 ratas Wistar con tumor Metil-Colantreno inducido, 2ª generación de trasplante, tratadas con Neuroaminidasa del Vibrio Colerae intratumoral a dosis de 0.10 mm<sup>3</sup> cada 96 horas ( cuatro días)



Supervivencia en días (T = Trasplante, T' = comienzo del trasplante)

Cuadro 2º: 10 ratas Wistar con tumor Metil-Colantreno inducido, 2ª generación de trasplante, - usadas como controles.

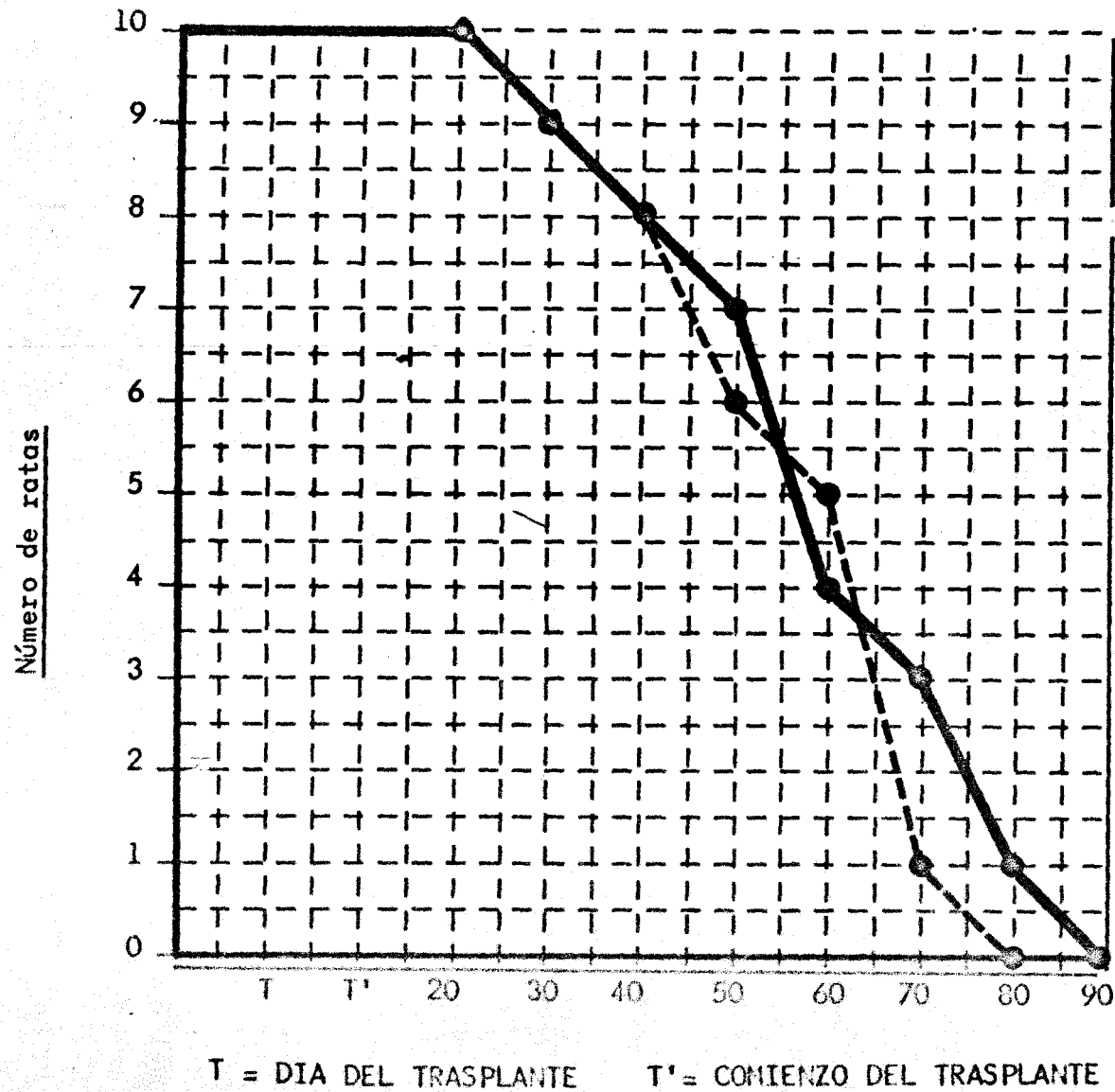


Supervivencia en días (T= trasplante)

RATAS: 10 tratadas con Neuroaminidasa.  
 10 controles, no tratadas.

Ratas tratadas con Neuroaminidasa: —●—

Ratas controles: - - -●- - -



INFORME REALIZADO POR LA SECCION DE BIOESTADISTICA  
TICA E INFORMATICA MEDICA DEL HOSPITAL UNIVER-  
SITARIO. FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA.

Realizado por: D<sup>ª</sup> M<sup>ª</sup> Luz Gómez Añón.

VALORACION ESTADISTICA

EXPERIENCIA DE TRATAMIENTO A

$$\chi^2 = 4 \quad \chi^2 ( 1.005 )$$

$$P < 0.05$$

EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

VALORACION ESTADISTICA

EXPERIENCIA DE TRATAMIENTO B

$$\chi^2 = 5.2157 > \chi^2 ( 1.0025)$$

$$P < 0.025$$

EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA



VALORACION ESTADISTICA

EXPERIENCIA DE TRATAMIENTO C

$$\chi^2 = 0$$

NO EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

VALORACION ESTADISTICA

EXPERIENCIA DE TRATAMIENTO D

$$\chi^2 = 0$$

NO EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

IV.- DISCUSSION

Para realizar nuestras experiencias de tratamientos con inmunoadyuvantes en tumores experimentales establecidos, - hemos tenido que aprender y adaptar, algunas técnicas especiales, como son, la inducción y el transplante de tumores.

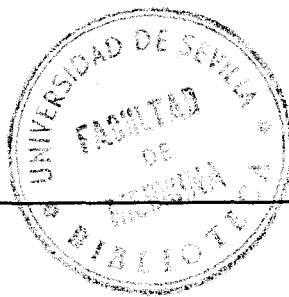
En otros capítulos, se describen ampliamente los métodos empleados por nosotros, y las condiciones necesarias - para obtener resultados positivos. Sólo hay un aspecto de/ estos apartados, que consideramos merece algún comentario/ más: Nos referimos a la obtención del transplante de tumor de Yoshida en su forma sólida, de una rata Wistar, a un Syrian Hamster, sin preparación inmunosupresora previa. Durante toda la ya larga historia de los trasplantes experimentales, la consecución de trasplantes heterólogos sin - preparación previa del nuevo huésped, ha sido por su rareza, objeto de la atención de las publicaciones especializadas. El primer intento de transplante heterólogo de que tenemos noticias, es el de PEYRILHE ( 22 ) que en 1.773, - inyecta por vía subcutánea a un perro material procedente/ de lesiones cancerosas de una mama humana. Su experimento,

no tuvo éxito, padeciendo el animal una infección por anaerobios en el lugar de la inoculación:

Desde estos trabajos de PEYRILHE, los intentos de transplantes heterólogos (generalmente tumores humanos en animales), fallaban sistemáticamente.

Quizás el primero en conseguirlo fué LEIDY, que en 1.851, transplantó tumores humanos bajo la piel de sapos. Existen un buen número de publicaciones recogiendo transplantes heterólogos, pero en animales en los que se ha bloqueado su sistema reticulo-endotelial por diversos métodos (exposición a Rayos X, tratamientos inmunosupresores, cortisona, etc.), así los de PUTNCKY (1.938) y DEBALOGH (1.940), describiéndose rechazos cuando el animal se recupera de su inmunosupresión. También se han aprovechado circunstancias de inmadurez inmunológica como en el caso de un trabajo de BULLOCK, que en 1.915 transplanta un carcinoma de un ratón a ratas recién nacidas.

Revisando estos datos y analizando nuestra experiencia



y su resultado, podemos afirmar que este transplante fué - posible, porque el Syrian Hamster que utilizamos como nuevo huésped, debía encontrarse en una situación de importante deficiencia inmunológica ( 60 ).

No pensamos, que en la obtención del transplante, ha-- yan jugado papel alguno los tan traídos y llevados mecanis mos de escape a la vigilancia inmunológica. Podríamos admitir la posibilidad de que factores bloqueantes consiguie-- ran, alterando a los antígenos de transplante tumor especí ficos (A.T.T.E.) ( 60 ), interferir la respuesta immuno- lógica de rechazo en un transplante homólogo, pero no están descritas, acciones bloqueantes, que sean capaces de encu- brir antígenas de histo-incompatibilidad y antígenos de - transplantes tumor-específicos.

Así pues, hemos llegado a la conclusión de que un estado de inmunodepresión en el Syrian Hamster, no provocado - por nosotros, sumado a las características de indiferenciación histológica y elevado índice mitótico del tumor de - Yoshida, fueron los responsables del éxito, en este caso -

de transplante heterólogo. De todas formas el estado general del Hamster no hacía presumir esta deficiencia, ya que carecía de enfermedad y el pelo era normal.

También resulta curioso, que no prendieran los transplantes de este tumor rata-hamster en 15 hamsters sucesivos; posiblemente, por no cambiar el tumor sus características/antigénicas.

Pasando a ocuparnos del tema central de nuestro estudio, el de los tratamientos con inmunoadyuvantes, hemos podido demostrar, que la evolución de las neoplasias se vé alterada por las condiciones inmunológicas propias del huésped o por modificaciones de ésta, inducida mediante tratamiento.

Comencemos comentando los tratamientos con B.C.G.

Ya hemos recogido en el capítulo de Resultados, cómo se produce un entorpecimiento de la vita natural del tumor cuando se trata con B.C.G., registrándose un leve retraso/

en la aparición en la aparición de las primeras bajas, siendo la  $P < 0.05$  ( CUADRO T-1 y GRAFICA T-1).

En nuestra opinión, los resultados que hemos obtenido con el uso de la B.C.G. intratumoral, no son en modo alguno, escasos. La gran agresividad de este sarcoma, evidente en las preparaciones anatomopatológicas que presentamos, - su elevado índice mitótico, y su gran celularidad, son condiciones, que junto con el avanzado estadio de implantación del tumor (lesión de 2 cm. de diámetro), imposibilitan teóricamente, una acción más erradicativa por parte de la inmunidad celular.

Debemos tener muy presente, las actuales teorías según las cuales, el ataque inmune contra la célula neoplásica - es cancerostática a veces, apenas cancerostática, y no cancericida como se pretendía ( 60 ).

Se especula actualmente, que los pacientes cancerosos, debieran proseguir la inmunoterapia por tiempo indefinido, perdiendo su característica de proceder terapéutico coadyvante, a corto plazo, destinado a obtener la "destrucción"



total de las células cancerosas.

Ideas que hace tan sólo dos o tres años, se tenían por ciertas, están hoy día en revisión. En 1.974, nos decía - MATHE, que sólo la inmunoterapia podía destruir la "última célula", que su indicación era el tratamiento de la enfermedad residual, que sólo era efectiva, si la población tumoral era débil, (menos de  $10^5$  células) ( 3 ). Sus conclusiones, eran corroboradas unos meses después en Inglaterra por POWLES y HALMITON ( 61 ), y por el South Eastern/ Cancer Study Group ( 62 ) en E.E.U.U. Sin embargo, actualmente, la evidencia experimental, STUTMAN, 1.979 ( 63 ) demuestra que el sistema inmunológico, no tiene la capacidad de detectar pequeños números de células, si no, que sólo las detecta, si el tamaño del tumor es suficientemente/ grande. Se han descrito actualmente recidivas tardías tras inmunización en el cáncer de mama del ratón ( 60 ), ya - se conocen casos de recurrencias tardías en lugar de curaciones en los ensayos con inmunoterapia, en casos humanos/ de leucemia mielógena aguda ( 60 ).

Por todo ello, encontramos muy interesante la conclu-

sión de BERTON ZBAR, que en su artículo de la Revista Cancer, en 1.974 ( 41 ), afirma que "La inyección intratule-sional de B.C.G., causa la regresión de los tumores intra-dérmicos y previene la existencia de nódulos linfáticos metastásicos". Nos habla en ese trabajo de curación total de sus cobayas con hepatomas diethyl-nitrosamina inducidos y transplantados, y de erradicación de metástasis.

Su trabajo, muy citado en las bibliografías de estos/años referentes al tema, contribuyó no poco a engrosar las filas de los entusiastas de la inmunoterapia. No dudamos - de la importancia de sus resultados, pero para nosotros es está fuera de toda duda, y sus experiencias posteriores lo - han demostrado, que debieron darse condiciones muy especiales de concentración de antígenos tumorespecíficos que han sido irrepetibles en muchos trabajos realizados posterior-mente.

En conclusión, repetimos que las características del/tumor ( índice mitótico) y su estadio, en el momento de comenzar el tratamiento, hace que nuestros resultados con la B.C.G. intratumoral ratifiquen la acción beneficiosa sobre

los tumores dentro de ciertos límites, en relación con el estadio de la enfermedad a tratar, y de la situación inmunitaria del individuo.

Vamos a comentar ahora nuestros resultados en la experiencia de tratamiento B.

Pensamos que sus características, justifican ampliamente este trabajo.

La Neuroaminidasa del Vibrio Colerae (V.C.N.), fermento aislado de un cultivo filtrado del Vibrio Colerae, cuyas características ya hemos descrito en otro capítulo, se nos ofrecía como un prometedora y todavía poco estudiado - inmunoadyuvante.

Decidimos por ello, incluirlo en nuestras experiencias de tratamiento inmunoterápicos.

Su acción sobre la superficie celular ( 56 )( 57 ), ( 58 )( 59 ), facilitaría por partida doble la función - de la inmunidad celular: de una parte, al reducir la carga negativa de la célula, contribuye a aumentar la deformidad

celular y aumenta la susceptibilidad de la célula para ser/fagocitada. De otra parte, crearía en la superficie celular, alterando las terminales del ácido siálico, mitógenos, que suplementarían a los antígenos en su enfrentamiento - con las células inmunoreactivas.

Los resultados concluyentes, de varias publicaciones de R.L. SIMMONS y A. RIOS y cols. ( 48 ) ( 49 ) ( 50 ) ( 56 ) ( 64 ), parecían, no dejar lugar a dudas respecto, a la posible eficacia de este nuevo inmunoadyuvante.

En uno de estos trabajos, describe la regresión total/de tumores MC-42, ya establecidos, tratando a las ratas con células tumorales tratadas con V.C.N., afirmando, que los/animales cuyos tumores desaparecieron, vivieron indefinidamente. Asistimos pues, a una acción cancericida y erradicativa de la enfermedad neoplásica establecida que difficilmente podemos explicarnos hoy a la luz de los últimos conocimientos sobre las posibilidades de acción de la inmunidad en las neoplasias.( 63 ).

Procedimos pues a usar la Neuroaminidasa del Vibrio Co

lerae, primero en nuestra experiencia B, como único coadyvante.

A lo largo de los 3 tiempos de la experiencia, observamos, en las jaulas de las ratas tratadas se producían las bajas con más precocidad. Cuando finalizamos la experiencia, el estudio resumen de los resultados no dejaba lugar a dudas ( CUADRO T-2 y GRAFICA T-2).

También fué concluyente el estudio estadístico, siendo la  $P < 0.025$ : Las ratas morían antes que las controles, - cuando eran portadoras de tumores y estaban tratadas con - V.C.N. Como ya comentamos en otro capítulo, realizamos estudio de toxicidad de la Neuroaminidasa, que nos demostró - tanto clínica como anatomopatológicamente su atoxicidad en ratas sanas.

Intuímos, que estos resultados podían estar muy relaciono nados con la teoría de los mecanismos de escape a la vigilancia inmunológica.

Revisando a fondo la bibliografía, muy escasa, sobre -

sobre este tema, tropezamos con un artículo de M.S. MARTIN y F. MARTIN ( 6 ) publicado en 1.975, en el que expone - sus resultados en el tratamiento inmunoterapico de tumores de colon, inducidos con el 1,2 dimethylhidracina en ratas/ Singénicas BD-IX. Su trabajo, se divide en 2 estudios de - tratamiento con células tumorales irradiadas y tratadas con V.C.N. En el segundo estudio las ratas recibieron también/ B.C.G.

El primer estudio, trataba de sorprender la posibilidad de un efecto profiláctico de estos tratamientos: El grupo/ de ratas tratadas, y el grupo testigo, recibían después una inyección subcutánea conteniendo  $10^6$  células tumorales DHB viables. El resultado es suficientemente expresivo: Se desarrollaron tumores a partir de esta inyección de célu-- las neoplásicas en 10 de los 17 testigos. Sin embargo, de/ las 18 ratas tratadas con inmunoadyuvantes, las 18 desarro llaron tumores. El peso medio de los tumores de las contro les era de 0.412 mg. y el peso medio de los tumores en las tratadas de 3.104 g.

Parecía objetivarse, una facilitación del crecimiento/

tumoral en este grupo de ratas.

En su segundo estudio, usando los inmunoadyuvantes como tratamiento y no como profiláctico administra a un grupo - de ratas que había recibido 10 días antes una inyección - subcutánea con células ( $10^6$ ) tumorales DHB viables, un tra - tamiento de 6 inyecciones ( una cada 2 días) dos células - DHB tratadas con mitomucina y neuroaminidasa (V.C.N.) + el Bacilo de Calmette y Guerin (B.C.G.). Siete de las 10 ra-- tas testigos ( sin tratamiento) habían desarrollado tumo-- res en el punto de inyección de las células viables y el - peso medio de estos tumores, era de 1.6 gr. En una rata - testigo aparecieron metástasis pulmonares. Las 10 ratas - tratadas, tenían tumores en el punto de inyección de célu- las viables, el peso medio de estos tumores era de 10.9 gr. y 8 ratas eran portadoras de metástasis pulmonares masivas. El análisis estadístico demostró también aquí, que el fenó - meno de facilitación era altamente significativo. El autor concluye expresando que estos resultados, le "incitan per- sonalmente, a una gran prudencia en la aplicación de la in - munoterapia en las neoplasias humanas" ( 6 ).

Es el único trabajo, en cierto modo paralelo al nuestro que hemos encontrado en la literatura.

Hemos decir que su hallazgo fué para nosotros muy importante, confirmandonos en nuestra idea de que la única explicación que existía para nuestros resultados con la V.C.N. en el tumor de Yoshida, había que buscarla recurriendo a la teoría de la Inmunoestimulación.

Por su rareza, son pocos los estudios experimentales - que sustentan esta teoría.

La primera observación en este sentido, publicada, se debe a KALISS, que en 1.958 ( 18 ) observa como dosis pequeñas de anticuerpos administrados paulatinamente logran el crecimiento progresivo de un injerto tumoral que de lo contrario hubiera sido rechazado.

PREHN y LAPPE, en 1.971 ( 4 ), publican su " An immunostimulation theory of tumor development", que será hasta nuestros días, el único trabajo que se plantea con extensión y seriedad, este interesante aspecto de la inmunología



tumoral.

Su conclusión, digamos global, es que el crecimiento - tumoral, puede verse más facilitado por una reacción inmune mínima, que por ausencia de inmunidad. Esta teoría trata de justificar, aquellos casos en que existiendo un cierto grado de inmunidad, y no habiendo fenómenos de tolerancia, y en ausencia de factores bloqueantes, se produce la/ implantación primero y más tarde el crecimiento tumoral. - Todo ello, además, de una manera mucho más elocuente, que/ en ausencia absoluta de inmunidad ( 4 ).

En su trabajo PREHN y LAPPE, relacionan esta teoría de la inmunoestimulación con la de la inmunovigilancia. Para/ ello, ambas teorías se complementan.

Estudian desde este punto de vista las relaciones mater no-fetales, considerando al feto como a un injerto natural (recordemos que el feto es portador de antígenos paternos). Parece ser, que la inmunización materna contra antígenos - paternos según GOODLIN y HERZENBERG, 1.964 ( 65 ), incrementa la fertilización comprobado más adelante en 1.966 -

por estos autores ( 66 ). Es curiosa, la observación de/  
BILLINGTON (1.964) ( 67 ). Según la cual, en el ratón, -  
las placentas híbridas son mayores que la media de las pla-  
centas que se desarrollan en las muestras endogénicas.

Parece ser, que respuestas inmunológicas pueden estimu-  
lar la división celular fetal. Pero cuando la inmunización  
con antígenos paternos, ha sido vigorosa y existe fuerte -  
incompatibilidad, la supervivencia fetal está comprometida.  
Cuando la inmunización es despreciable, no hay daño para el  
feto. Pero cuando existe, un cierto grado de incompatibili-  
dad, y consecuentemente un cierto grado de respuesta immuni-  
taria, hay facilitación para el crecimiento fetal, y son -  
numerosos los trabajos que lo demuestran. ( 67 ).

Dejar claramente expuesto este aspecto, ha sido el moti-  
vo, de que nos extendiéramos un poco en estos aspectos de/  
las relaciones materno-fetales desde el punto de vista de  
PREHN.

La facilitación se produce pués, sólo ante determina-  
dos niveles de inmunidad, pero ¿ Cómo sabemos con precisión

ante qué niveles inmunitarios nos encontramos en un enfermo determinado? Sabemos que la valoración de la inmunidad, tanto in vivo como in vitro, y por todas las técnicas actuales es poco fina. Y más aún: ¿Cómo podemos predecir, de qué forma vá a responder el sistema inmune del enfermo a nuestro tratamiento con inmunoadyuvantes?. ¿Se vá a elevar/ mucho ó poco su inmunidad? . ¿ Dáralugar una determinada/ elevación a un fenómeno de facilitación?. Estas preguntas, por ahora, nos tememos que no tienen respuestas.

Otros autores han sorprendido este fenómeno. JEEJEBHOY ( 7 ) hizo una valoración seriada de la respuesta inmune del huésped durante la oncogénesis química ( MCA), y de mostró, que la respuesta inmune inicial es estimuladora - cuando se la ensaya in vitro.

Esta compleja situación lleva a STUTMAN ( 1.979), Jefe de Inmunología celular del SLOAN-KATTERING INSTITUTE FOR - CANCER RESEARCH a manifestar que "son demasiadas las cosas que nosotros ignoramos en este momento sobre lo que podría mos llamar inmunidad tumoral, para diseñar una estrategia/ de inmunoterapia racional que se base en conocimientos y -

y no en hipótesis: ni siquiera en hipótesis, en corazonadas las llamaría yo".

Nosotros no sólo pensábamos como él, cuando en 1.977,- nos planteamos este trabajo, si no que ahora consideramos/ que es muy peligroso que sigamos usando la inmunoterapia - de la forma anárquica y empírica que viene haciéndose.

Necesitamos valoraciones muy precisas de la inmunidad/ celular de nuestros enfermos y necesitamos saber como y - cuanto responde su inmunidad a nuestro tratamiento estimu- lante.

Necesitamos conocer mejoes estos fenómenos de facilita- ción inmunológica...; necesitamos, en fin tanta investiga- ción básica en este campo, que creo que es aquí, donde to- dos deberíamos volver nuestros esfuerzos.

Sólo podemos afirmar que con toda seguridad, nuestros resultados en esta experiencia B de tratamiento, correspon- den a un fenómeno de facilitación inmunológica, que la im- portancia de esta teoría viene avalada por escasos, pero -

serios trabajos de importantes autores, y que es una posibilidad de respuesta a tener presente, mientras manejemos/ como hasta ahora los inmunoadyuvantes.

Repetimos la experiencia (Experiencia C) añadiendo BCG al tratamiento con Neuroaminidasa, sin obtener resultados/ valorables ( ver capítulo de Resultados).

En nuestra experiencia D, nuestra segunda generación / del tumor Metil Colantreno inducido, no respondió al tratamiento con Neuroaminidasa en ningún sentido.

A pesar de todas estas consideraciones, sería nuestro/ deseo que quién leyera estas líneas conservara, acrecentada si es posible su fé en que la inmunoterapia tiene un impotante papel que cubrir todavía en el tratamiento del cáncer. Es además, el tratamiento antineoplásico de más finas raíces etiopatogénicas.

Sólo hemos querido con estos estudios una vez bien sentada su indudable influencia en la vida natural del tumor/ y esto en cualquier sentido, estimularla investigación bá-

sica sobre este tema, único camino de llevarla a la clínica con las garantías necesarias.

V.- CONCLUSIONES.

## CONCLUSIONES

1.- La Neuroaminidasa del *Vibrio Colerae* administrada por vía parenteral a dosis de hasta  $0.6 \text{ mm}^3$ / 48 horas, no ha provocado toxicidad en las ratas Wistars sanas manejadas/ por nosotros.

2.- Las ratas Wistars portadoras de un tumor de Yoshida - del tipo sólido ya establecido, responden al tratamiento/ realizado con Neuroaminidasa del *Vibrio Colerae* intratumoral según dosis descritas, con un acortamiento de la vida media respecto a las ratas controles no tratadas, con una diferencia estadísticamente significativa, siendo la -  
P < 0.025.

3.- Las ratas Wistars portadoras de un tumor de Yoshida - del tipo sólido ya establecido, responden al tratamiento/ realizado con el Bacilo de Calmette y Guerin (B.C.G.) in-tratumoral, según dosis descritas, con un alargamiento de la vida media respecto a las controles no tratadas, con -  
una diferencia estadísticamente significativa, siendo -



P <0.05.

4.- El uso conjunto del Bacilo de Calmette y Guerin (B.C.G.) y de la Neuroaminidasa del Vibrio Colerae (V.C.N.) como tratamiento de los tumores de Yoshida del tipo sólido ya establecidos, no produce aumento ni disminución de la longevidad en las ratas tratadas respecto a las controles/no tratadas.

5.- El Bacilo de Calmette y Guerin (B.C.G.) parece comportarse en esta experiencia de tratamiento, como neutralizadora de los efectos indeseables observados con la Neuroaminidasa del Vibrio Colerae (V.C.N.).

6.- Hemos observado que es posible el desarrollo de un fenómeno de facilitación inmunológica en el curso de tratamientos con inmunoadyuvantes de tumores sólidos ya establecidos.

7.- Curiosamente, conseguimos una vez, sin previa preparación inmunosupresora el trasplante de un tumor de Yoshi-

da en su forma sólida de una rata Wistar adulta a un Syrian Hamster adulto.

8.- El tumor Yoshida, a pesar del pase rata-hamster, continua conservando sus características inmunológicas como lo/ demuestra el rechazo que vimos en 15 trasplantes sucesi--vos sobre hamster.

VI.- RESUMEN.

## RESUMEN

En la introducción de esta Tesis Doctoral, se revisa/ la cuestión de la inmunoterapia en oncología, recayendo - sobre el comportamiento de las neoplasias en diferentes - situaciones inmunológicas y datos históricos sobre las re laciones inmunidad-tumor, oncogénesis experimental, trans plante experimental de tumores e inmunoterapia en oncolo- gía.

El material empleado en la Tesis Doctoral, ha sido - 570 ratas Wistars adultas y 130 Syrians Hamsters.

De las 570 ratas Wistar, 5 tenían un Sarcoma de Yoshida inducido con O-Amino-Azotoluol parenteralmente y pincela- ciones de arseniato potásico, las cuales han servido para obtener trasplantes del citado tumor a 425 ratas Wistars. De las otras 120 ratas restantes, en 20 de ellas se indu- jo un tumor con Metil-Colantreno, obteniéndose la tumora- ción en 15 ( en 2 ratas no se obtuvo el tumor y en 3 apa- reció tardíamente). Desde estas 15 ratas se hizo transplan

te del tumor a las 100 restantes ratas Wistars. Las 20 ratas restantes, fueron empleadas para un estudio de toxicidad de la Neuroaminidasa del *Vibrio Colerae*.

Por otra parte, se manejó un grupo de 130 Syrians Hamsters de los cuales se indujo a 20 de ellos un tumor con Metil-Colantreno y a otros 10 con Benzantraceno. Una vez conseguido el tumor Metil-Colantreno o Benzantraceno inducido en estos Hamsters, se transplantó a otros 100 animales de la misma serie sanos.

. Entre el material usado, señalamos la singularidad de un transplante conseguido de un Sarcoma de Yoshida en rata Wistar adulta a Hamster adulto sano.

Para tratar los sarcomas de Yoshida transplantados y los tumores Metil-Colantreno inducidos en las ratas Wistars, se utilizó el Bacilo de Calmette y Guerin (B.C.G.) y la Neuroaminidasa del *Vibrio Colerae* (V.C.N.), como inmunoadyuvantes a las dosis de 0.10 c.c. cada 96 horas, como se describe en el capítulo correspondiente.

Los resultados de la Tesis se refieren a los siguientes

puntos:

a) Tiempo de latencia para la obtención del tumor inducido con Metil Colantreno y Benzantraceno en las 100 ratas Wistars y en los 30 Syrians Hamsters, que fué similar para ambos animales experimentales con un promedio de 90 - días  $\pm$  8 días.

b) Incidencia de trasplantes positivos con las diferentes técnicas usadas. Así, el trasplante del tumor de Yoshida en ratas Wistars se consiguió en el 99.8% de los casos, mientras que ese mismo trasplante de tumores inducidos con Metil-Colantreno, bajó a un 80%. Nuevamente citamos aquí, el caso singular del trasplante heterólogo desde una rata Wistar con tumor de Yoshida a un Syrian Hamster.

c) Tratamiento con los inmunoadyuvantes citados en el capítulo de "Material y Métodos", de las neoplasias experimentales anteriormente descritas. Vimos que el inmunoadyuvante Neuroaminidasa del Vibrio Colerae (V.C.N.) determina facilitación inmunológica en un grupo estudiado, de manera que, en ese grupo existía un acortamiento de la vi

da media muy significativo estadísticamente ( $P < 0.025$ ),-  
Por el contrario, el inmunoadyuvante Bacilo de Calmette y  
Guerin (B.C.G.), determinó una mayor longevidad de las -  
tratadas con el mismo, de manera que la vida media de es-  
te grupo de ratas Wistars se alargó con una significación  
estadística positiva, pero sólo de  $P < 0.05$ .

Los resultados de tratamiento de las neoplasias químico  
inducidas con ambos inmunoadyuvantes (B.C.G. + V.C.N.) no  
modificó la longevidad de los animales así tratados.

A la vista de estos resultados, se discuten los mismos  
en relación con la literatura sobre la cuestión, y espe--  
cialmente en relación con la Tesis de Inmunoestimulación/  
(PREHN y LAPPE, 1.971), lo que nos hace ver la respuesta/  
al tratamiento con Neuroaminidasa del *Vibrio Colerae* como  
desarrollo del fenómeno de facilitación inmunológica.

Estos resultados han sido observados por algún otro,  
pero los estudios en la materia son muy escasos, de mane-  
ra que es nuestro deseo continuar esta investigación bási  
ca como hecho fundamental para aplicar en la Clínica este

este tipo de inmunoterapia.

Sin embargo, los resultados con inmunoadyuvante B.C.G. son relativamente halagüeños en nuestras condiciones experimentales, ya que además del gran tamaño del tumor y de su gran malignidad, así como ausencia de otra terapéutica, observamos un alargamiento de su vida media algo significativo estadísticamente.

De lo anterior, se deducen unas conclusiones, que son expuestas en el capítulo correspondiente y que en síntesis reflejan la hipótesis de trabajo de que la inmunoterapia en tumores experimentales por sí sola, es capaz de modificar, en uno y otro sentido la evolución de tumores establecidos.



## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- HELLSTROM, I., HELLSTROM, K.E., SJOGREN, J.O. and WARNER, G.A.  
Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasma of various histological types.  
Inst. J. Cancer 7:1, 1.971.
  
- 2.- MATHE, G., POVILLART, P.; SCHWARZENBERG, L.; AMIEL, J.L.; SCHENEIDER, M.; HAGAT, H.; DEVASSAL, F.; JARMIN, C.; ROSENFELD, D.; WEINER, R.; RAPPAPERT, H.  
Attempts at immunotherapy of 100 acute lymphoid leukaemia patients some factor influencing results.  
Nat. Cancer Inst. Monograph. 35:361, 1.972.
  
- 3.- MATHE, G.  
L'immunotherapie des cancer humains. Leucemies, hemato sarcomes et tumeurs solides.  
Nouvelle Press Medicale, 1.333 Paris, 1.975.
  
- 4.- PREHN, R.T.; LAPPE, M.A.  
An immunostimulation theory of tumor development transplant.  
Rev. 7:26, 1.971.

5.- MARTIN, M.S. et MARTIN, F.

Immunothérapie d'un cancer colique expérimental: facilitation immunologique de la croissance de greffes  
Biol. Gastroenterologie. 7:249, 1.974.

6.- MARTIN, M.S. et MARTIN, F.

Resultats immunologiques obtenus avec un système expérimental de tumeurs coliques greffables. Applications possibles de ces resultats aux tumeurs intestinales/humaines.

Bulletin du Cancer. n° 4, 439, 1.975.

7.- JEEJEEBHOG, H.F.

Stimulation of tumor growth by the immune response.  
Int. J. Cancer 43:665, 1.974.

8.- FOLEY, E.J.

Antigenic properties of methylcholantrene induced - tumors in mice of the strain of origin.  
Cancer Res. 13:835, 1.953.

9.- PREHN, R.T., MAIN, J.M.

Immunity to methylcholantrene induced sarcomas.

- 9.- J.Natl. Cancer Inst. 18:769,1.957.
- 10.- OLD,L.J. and BOYSE,E.A.  
Antigens of tumors and leukaemias induced by virus.  
Fed. Proc. 24:1.009,1.965.
- 11.- SJOGREN,S.J.; HELLSTROM,I. and KEIN,G.  
Transplantation of polyoma virus-induced tumors in mice.  
Cancer Res. 21:329,1.961.
- 12.- TRENTIN,J.J.; YABE and TAYLOR, G.  
The quest for human cancer viruses.  
Science. 137:835,1.962.
- 13.- MARTON,D.L.; WELLS,S.A. Jr.  
Inmunobiología de las enfermedades neoplásicas.  
Tratado de Patología Quirúrgica- Davis Christopher.  
Cap. 20 -décima edición 1.974, Edt. Interamericana.
- 14.- OLD,L.J., BOYSE,E.A. and STOCKERT,E.  
Antigenic properties of experimental leukaemias. I -  
serological studies in vitro with spontaneous and ra-  
diation induced leukaemias.

14.- J. Nat. Cancer Inst. 31:497,1.963.

15.- OLD,L.S.; BOYSE,E.A.; CLARK,D.A. and CARSWELL,E.A.  
Antigenic properties of chemically-induced tumors.  
Am. N.Y. Acad. 101:80, 1.962.

16.- ROSENAU, W. and MORTON, D.L.

Tumor-specific inhibition of growth of methylcholantene-induced sarcomas in vivo and in vitro by sensitized - isologous lymphoid cells.

J. Nat. Cancer Inst. 36:825,1.966.

17.- HELLSTROM, I., HELLSTROM,K.E.; SJOGREN,J.O. and WARNER G.A.

Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasma of various histological types.

Int. J. Cancer 7: 1,1.971.

18.- KALISS, R.T.; LAPPE,M.A.

An immunostimulation theory of tumor development transplant.

Rev. Cancer Res. 18:902,1.958.

19.- PREHN, R.

The immune reactions as a stimulator of tumor growth.  
Science 176, 1.972.

20.- PREHN, R.

The immune reaction as of tumor growth.  
Science 186, 1.972.

21.- HOLMES, E.C., KAHAN, B.D. and MORTON, D.L.

Soluble tumor-specific transplantation antigens from -  
methylcholantrene induce quinea-pig sarcomas.  
Cancer 25:373, 1.970.

22.- L. STEWART, H.; SNELL, K.; DUNHAM, L.; SCHYEN, S.

Transplantable and transmissible tumors of animals.  
Armed Forces Institutes of Pathology. Washington, D.C.  
1.959.

23.- SHABAD, L.M.

Novinsky founder of experimental oncology.  
URSR Academy Medical Sciences Editorial House.  
Moscow, 1.950.

## 24.- NOVINSKY, M.

On the problem of transplantation of malignant tumours (experimental investigation). Thesis St. Petersburg. 1.877 ( In Russian) Tomado de Bulletin de Cancer 63: 305, 1.976.

## 25.- SHABAD, L. GRICIUTE.

Le centenaire de la première transplantation de tumeur. Bulletin du cancer, 63:305, 1.976.

## 26.- WEHR, WEITERE MITTELUNG, U.B.D.

Positive ergebnisse der carcinomüberimpfung von Hund - an hund. Langebeck's.

Arch. Für Chirurgie. 39:226, 1.889.

Tomado de Bulletin du Cancer nº 63:305, 1.976.

## 27.- HAVAN.

Erfelgreiche experimentale ubertragung von carcinome.

Langebeck's Arch. Klin. Chir. 39:678, 1.889.

Tomado de Bulletin du Cancer 63:305, 1.976.

## 28.- MURILLO- FERROL, F.L., VILLAR LACILLA, J. M.

Avances de los resultados experimentales del cloruro

- 28.- de prospidio sobre las células tumorales humanas.  
Departamento de anatomía y embriología. Facultad de  
Veterinaria, 1.976 Monograf. Zaragoza.
- 29.- YOSHIDA, T., MUTA, Y. and SADAHI, Z.  
Studies uber das "Ascitis sarcoma".  
Proc. Imp. Acad. (TOKYO) 20: 611, 1.944.
- 30.- YOSHIDA, T.  
Studies on an ascites. (retículo-endothelial cell).  
Sarcoma of the rat.  
J. Nat. Cancer Inst. 12:947, 1.952.
- 31.- SATO, H.  
Intraperitoneal transplantation of the Yoshida ascites  
sarcoma and the ascites hepatoma to various american -  
strains of rats.  
J; Nat. Cancer Inst. 15: 1367, 1.955.
- 32.- SATO, H.  
On the chromosomes of Yoshida sarcoma. Studies with tu  
mor cells proliferated in the peritoneal cavity of the



- 32.- rat in transplanted with a single cell.  
Gamm. 43,1.952.
- 33.- CALMETTE, A.  
Tubercle bacillus infection and tuberculosis in man -  
and animals.  
Baltimore, Williams & Wilkins, 1.923.
- 34.- LEWIS, P.A. and LOOMIS,D.  
Allergic irritability theoformation of antisheep hemo-  
lytic amboceptor in the normal an tuberculous quinea -  
pig.  
J. Exp. Med. 40:503, 1.924.
- 35.- DUBOS,R.U. and SCHAEGLER,R.W.  
Effects of celular constituyents of mycobacteria on -  
resistance of mice to heterologue infection. I protec  
tive effect.  
J. Exp. Med. 106: 703, 1.957.
- 36.- BIOZZI,G.; BENACERRAF,B., GRUMBA, C.K., HAPEN,B.N. -  
LEVADITE,J. and RIST,M.  
Etude de l'activité granulopecique du systema reticu-

- 36.- loendothelial au cours de l'infection tuberculeuse ex  
perimentale de la souris.  
Ann. Inst. Pasteur Lille. 87:291,1.954.
- 37.- BALNER, H., OLD,L.J. and LARKE,D.A.  
Accelerated rejection of male skin isografts by female  
C57Bl mice infected with bacillus calmette-guerin (BCG).  
Proc. Exper. Biol. Med. 109, 58,1.962.
- 38.- BIOZZI,G., STIFFEL,C., HALPEN,B.N. and MOUTON,D.  
Effect d l'inoculation du bacille de Calmette-Guerin,  
sur le developpment de la tumeur ascitique d'Ehrlich -  
chez le souris.  
C.R.Soc. Biol. (Paris) 153:987,1.959.
- 39.- OLD,L.J., BENACERRAT,B., CLARKE,D.A., CARSWELL,E.A.  
and STOCKENT,E.  
The role of the reticuloendothelial system in the host  
reaction to neoplasia.  
Cancer Res. 21: 1.281,1.961.
- 40.- ZBAR, B., BERNSTEIN,I. and RAPP,H.J.  
Supression of tumor growth at the site of injection -

- 40.- with living bacillus calmette-guerin.  
J. Natl. Cancer Inst. 46:831,1.971.
- 41.- ZBAR,B., RAPP,H.J.  
Immunotherapy of Guinea Pig cancer with B.C.G.  
Cancer 34: 1.532, 1.974.
- 42.- MACKANESS,G.B.  
Delayed hypersensitivity and the mechanism of cellular  
resistance to injection. In progress in immunology.  
New York. Academic Press. 413,1.971.
- 43.- METZER,M.S. and BARTLETT,G.L.  
Citotoxicity in vitro by products of specifically -  
stimulated spleen cells-susceptibility of tumor cells  
and normal cells.  
J. Nat. Cancer Inst. 40:1.439,1.972.
- 44.- CLEVELAND,R., MELTZER,M.S. and ZBAR,B.  
Tumor cytotoxicity in vitro by macrophages from mice -  
infected with mycobacterium bovis strain B.C.G.  
J. Natl. Cancer Inst. 52: 187, 1.974.

- 45.- EVANS,R., ALEXANDER,P.  
Mechanism of immunologically specific killing of tumor cells by macrophages.  
Nature, 236: 168, 1.972.
- 46.- HIBBS,J.B., LAMBERS,L.J. and KEMINGTON,J.S.  
Possible role of macrophage mediated nonspecific cytotoxicity in tumor resistance.  
Nature (New York) 235: 48,1.972.
- 47.- HAMMA,M.G. Jr., ZBAR,B. and RAPP,H.J.  
Histopathology of tumor regression after intralesional injection of mycobacterium bovis. I. Tumor growth and metastases.  
J. Natl. Cancer Inst. 48:1.441,1.972.
- 48.- SIMMONS,R.L.; RIOS,A; LUNDGREN,G.; RAY,P.K.; MCHAUM,C. G. and HAYWOOD,G.R.  
Immunospecific regression of methylcholantrene fibrosarcoma using neuroaminidase.  
Surgery 70:38, 1.971.

49.- SIMMONS, R.L. and RIOS, A.

Immunotherapy of cancer; Immunospecific rejection of -  
tumors in recipients of neuroaminidase treated tumor  
cell plus BCG.

Science 174: 591, 1.975.

50.- RINGDON, R.H., NEAL, J. and AMOGSTEOM, D.Y.

Neoplasmas in mice neonatally inoculated with rat thy-  
mus antiserum and set benzo (a) pyrene.

Cancer Res. 27: 2.318, 1.967.

51.- RICHARD, L.; SIMMONS, M.D. and ANGELYN RIOS.

Cell surface modification in the treatment of experi-  
mental cancer: Neuroaminidase or concanavalin A. Can-  
cer.

A. Cancer, 34:541, 1.974.

52.- RIOS, A. and SIMMONS, R.L.

Immunospecific regression of various syngenic mouse  
tumors in response to neuroaminidase treated tumor -  
cells.

J. Natl. Cancer Inst. 51: 637, 1.973.

54.- RUPERT,F., BILLINGHAN.

Concerning the laboratory carrier of mesocricetus auratus with special reference to transplantation.

Fed. Proc. 37 nº 7 2.024, 1.978.

55.- STOCK,C.C.

Personal communication Armed Forces Institutes of Pathology.

Fascicle 40,1.959.

56.- SIMMONS R.L., REUS, I., COOK,C.M.W., SEAMEN,C.V.F., -  
HEARD,D.

Electrophoretic studies on some type of mammalian tissue cells cancer.

Cancer Res. 24: 2.038, 1.964.

57.- WEISS,L.

Studies on cell deformability. I effect of surface charge.

J. Cell Biol. 26:735, 1.965.

58.- LEE,A.

Effect of neuroaminidasa on the phagocytosis of hete-

- 58.- homologous red cells by mouse peripheral macrophages.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128:891, 1.968.
- 59.- WEISS, L., MAHEW, E. and ULRICH, K.  
The effect of neuroaminidase on the phagocytic process in human monocytes.  
Lab. Invest. 15:1.304, 1.966.
- 60.- MASTRANGELO, M.J., LAUCIUS, J.F. and OUTZEN, J.C.  
"Conceptos fundamentales de inmunología tumoral".  
Tumor Immunology.  
Seminars in Oncology. Ed. Panamericana pp 7. Argentina, 1.976.
- 61.- POWLES, R., KAG, H.E., McELWAIN, T.J. and ALEXANDER, P.  
CROWTHER, D., HALMILTON-FAIRLEY, G., PILE, M.  
Immunotherapy of acute myeloblastic leukemia in man.  
In cc Investigación and stimulation of immunity in cancer patients.  
Edited by G. Mathé and R. Weiner 1 vol. Springer Verlag Heidelberg 1.974. CNRS. Edit. Paris, 1.974.

62.- VOGLER, W.R., CHAN Y.K.

Effect of bacillus. Calmette-Guerin (B.C.G.) in pro-  
longation of remissions in acute myeloblastic leuke-  
mia (ANL) Abstract nº 723.

Proc. Amer ASS. Cancer Press 15:164, 1.974.

63.- STUMAN, O.

Cáncer e inmunología.

Rev. Jano nº 335:20, 1.979.

64.- SIMMONS, R.L. and RIOS, A.

Immunospecific regression of methylcholanthrene fi-  
brosarcoma using neuroaminidase-III Synergistic effect  
of BCG and neuroaminidase-treated tumor cells.

Amm. Surg. 176:188, 1.972.

65.- GOODLIN, R.C., HERZENBERG, L.A.

Pregnancy induced hemagglutinins to paternal H-2 anti-  
gens in multiparous mice.

Transplantation 2:357, 1.964.

66.- GOODLIN, R.C., HERZENBERG, L.A.

Further studies on the mechanism of pregnancy induced



- 66.- isoinmunization in mice.  
Amer. J. Obstet. Gynes. 95:133, 1.966.
- 67.- BILLINGTON, W.D.  
Influence of immunological dissimilarity of mother and fetus on size placenta in mice.  
Nature (Lond.) 202:317, 1.964.
- 68.- ED. JOHN WILEY & SONS INC. PHILADELPHIA. PENNSYLVANIA.  
Animals for medical research. Brig. N., Nutryja. Howard Dr. Rawns Leu, Dharam V. Vadehra, 1.976.
- 69.- MATHE, G., WEINER, R.  
Investigation of immunity in cancer patients.  
Proceeding of the T.N.R.S. Colloquium Paris, 1.972.  
1 vol. Springer Verlag Heidelberg, 1.974 y T.N.R.S. -  
Edit. Paris, 1.974.
- 70.- BARTLET, G.L., ZBAR, B. and RAPP, J.  
Suppression of murine tumor growth by immune reaction to the bacillus calmette-guerin strain of mycobacterium bovis.  
J. Nat. Cancer Inst. 48:245, 1.972.

Fé de erratas

Por error mecanográfico de enumeración hemos omitido las páginas 5 y 142.