

## EFFECTO DE LA VITAMINA "E" EN LA SUPERVIVENCIA DE RATONES BALB/c RETADOS CON CÉLULAS L5178Y

LUZ MARÍA LÓPEZ DE LA ROSA y  
HÉCTOR GÓMEZ ESTRADA

Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. y Laboratorio de Inmunología, Departamento de Investigación en Medicina Experimental, Unidad Oblatos. Guadajalajara, Jalisco, México.

### RESUMEN

Se inmunizaron ratones BALB/c con células congeladas (hasta el momento de inmunizar), del linfoma L5178Y y tratadas en las siguientes formas: (1) grupo testigo, sin tratamiento, (2) fijadas con glutaraldehído, (3) radiación gamma, (4) vitamina E, (5) vitamina E y fijadas con glutaraldehído, (6) vitamina E y radiación gamma. Los ratones inmunizados con dichas células fueron retados en cada caso por la inoculación intraperitoneal de células L5178Y viables y observados en su supervivencia. El tratamiento de las células L5178Y con vitamina E e irradiación gamma produjo una protección significativa de la supervivencia de los ratones transplantados con dicho linfoma. La protección contra la letalidad también fue significativa en los animales inmunizados con células tratadas con vitamina E.

En otro experimento, un grupo de ratones transplantados con el tumor fueron inoculados con vitamina E por vía intraperitoneal sin observarse inducción de resistencia contra la neoplasia.

### ABSTRACT

BALB/c mice were immunized with frozen L5178Y cells and treated as follows: (1) control group without treatment, (2) fixed with glutaraldehyde, (3) irradiated with gamma radiation, (4) with vitamin E, (5) with vitamin E added to the cells and fixed with glutaraldehyde, (6) with vitamin E and irradiated with gamma radiation. Mice immunized with each group of cells were challenged by intraperitoneal transplant of viable L5178Y cells and the survival rate was recorded in each case. The immunization with cells pretreated with vitamin E and irradiation produced the longest survival rate after the mice were challenged. Protection against the lethal effects was also significant in the animal immunized with cells treated with vitamin E. In another experiment, a group of mice transplanted with the tumor were inoculated intraperitoneally with vitamin E. Resistance against the neoplasia was not observed under this treatment.

### INTRODUCCION

En las últimas décadas se ha generado un gran interés biológico-médico sobre los agentes que intervienen en todos los siste-

mas enzimáticos en las células y, por consiguiente, son los reguladores del metabolismo del organismo multicelular.

Las vitaminas de la serie soluble en lípidos (A, D, E, K) son derivados de polímeros isoprenoides parcialmente cíclicos, similares a las sustancias intermediarias en la síntesis del colesterol. Dichas vitaminas actúan probablemente por su solubilidad en lípidos sobre las membranas celulares afectando la permeabilidad y los sistemas del transporte; asimismo, en virtud de que los grupos químicos que contienen pueden clasificarse como agentes redox (A, E y K), como coenzimas o como activadores de enzimas (D, K, A) o como inhibidores de enzimas (E). Se siguen descubriendo continuamente aspectos biológicos muy variados e interesantes de las diferentes vitaminas y en especial de la vitamina E. Jaffe (1946) demostró que dicha sustancia es uno de los factores de la dieta que afecta a la respuesta carcinogénica pues redujo esta respuesta cuando posteriormente a una inyección de metilcolantreno, agregó aceite de germen de trigo que contiene alfa tocoferol o vitamina E a la dieta de las ratas. Asimismo, Harber y Wissler (1962) encontraron que la vitamina E administrada oralmente a ratones con tumores inducidos con metilcolantreno disminuyó el número de tumores del lote experimental.

Harman (1961) anticipó experimentalmente el papel tan importante que ejercen los radicales libres provenientes de fuentes enzimáticas y no enzimáticas en la degradación de los sistemas biológicos.

Al encontrar que la incidencia de cáncer mamario en ratones hembras de la cepa C3H aumenta en relación con el grado de insaturación y la cantidad de los lípidos integrados en la dieta de estos animales, Harman puntualizó que las reacciones endógenas que involucran radicales libres pueden contribuir al desarrollo tumoral.

Gamal *et al.* (1968) observaron que la incidencia de carcinoma mamario inducido en hembras de ratas blancas con 7,12 dimetilbenzantraceno es mayor cuando su dieta contiene 20% por peso de aceite de maíz en comparación con la misma cantidad de un lípido saturado que se incluyó en el alimento de otro lote. Los resultados experimentales se interpretaron en función del incremento de la peroxidación de lípidos en los animales alimentados con el aceite de maíz. En un experimento similar, Harman (1969) mantuvo a un lote de ratones con una dieta base con un contenido del 20% en peso de aceite de maíz al que se agregaron de 5 a 20 mg de acetato de tocoferol por cada 100 gramos de alimento; los animales así alimentados tuvieron menor cantidad de tumores que los testigos alimentados con la dieta normal para ratas.

El objetivo del presente trabajo fue el examen de algunos de los efectos que exhibe la vitamina E sobre la supervivencia de ratones BALB/c retándolas con células cancerosas denominadas L5178Y.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c cuyos antígenos tisulares son compatibles con los de la cepa DBA/2 que dio origen al linfoma murino L5178Y dado que sus genomas respectivos contienen el locus H-2D productor del antígeno.

El modelo experimental empleado incluye al linfoma L5178Y en fase ascítica establecido por Fisher (1957) como cultivo *in vitro*. La transferencia de  $8 \times 10^7$  células L5178Y a ratones adultos por vía intraperitoneal, causa invariablemente el

desarrollo del tumor que a su vez conduce a la muerte de los receptores a los diez días posteriores al trasplante. Cada receptor contiene 8 a 10 ml de líquido ascítico con  $2.4 \times 10^8$  células malignas por ml.

Las células neoplásicas procedentes del lote de ratones donadores se dividieron en alícuotas de  $4 \times 10^6$  células. Algunas alícuotas se trataron con 0.5 mg de vitamina E en 10 ml de medio de cultivo de Mc Coy 5A (Grand Island Laboratories). La mezcla se incubó durante cuatro horas a  $37^\circ\text{C}$ .

Para seguir el diseño experimental anticipado se integraron seis grupos de 10 ratones cada uno según el tratamiento que se dio a las células tumorales previamente a la inmunización. Todas las células fueron previamente congeladas a  $-70^\circ\text{C}$  y descongeladas en el momento de la inmunización, constituyéndose los grupos: 1) células L5178Y congeladas y descongeladas (grupo testigo); 2) células tratadas con glutaraldehído al 1.5% durante 30 minutos, a  $37^\circ\text{C}$ ; 3) células congeladas por 24 horas y tratadas posteriormente con una dosis de 3,000 rads (R) irradiación gamma proveniente de una bomba de cobalto 60; 4) células tratadas con vitamina E; 5) células tratadas inicialmente con vitamina E y posteriormente con glutaraldehído al 1.5% durante 30 minutos, a  $37^\circ\text{C}$ ; 6) células tratadas con vitamina E, congeladas a  $-70^\circ\text{C}$  durante 24 horas e irradiadas con 3,000 R de rayos gamma.

Se inmunizaron varios grupos de 10 ratones machos de la cepa BALB/c a los dos meses de edad, cuyo peso promedio era 23 g. La inmunización se hizo por vía intraperitoneal (I.P.) una vez por semana, durante cuatro semanas, inyectando en cada caso  $4 \times 10^6$  de células L5178Y modificadas en todos los individuos de ca-

da grupo. Los resultados están resumidos en la Tabla I. Los ratones de los grupos inmunizados con células L5178Y modificadas, fueron inyectados por vía IP con  $8 \times 10^7$  células L5178Y viables, suspendidas en medio de cultivo de Mc Coy 5A, diez días después de terminada la última inmunización, procedimiento al que se le ha denominado reto. A partir del reto, se inspeccionaron los grupos de ratones diariamente, registrándose tanto la supervivencia, cuanto el desarrollo del tumor hasta el fallecimiento de cada individuo.

Para probar el efecto que la vitamina E pudiera tener sobre el animal con su propio desarrollo tumoral, se procedió al trasplante del tumor a un lote de diez ratones. En el mismo día del trasplante se iniciaron las series de seis inyecciones por vía subcutánea de 0.06 mg/g de alfa tocoferol en 0.2 ml de suspensión oleosa (Ephynal de Roche) administrando una inyección cada tercer día; por consiguiente, cada individuo recibió una dosis total de 0.36 mg de alfa tocoferol. A los ratones del grupo testigo se les transplantó también el tumor,  $8 \times 10^7$  células L5178Y, inyectándoles el mismo día del trasplante 0.2 ml de aceite de cártamo con objeto de comparar su efecto con el de la suspensión oleosa adicionada de alfa tocoferol sobre el desarrollo tumoral.

Los resultados se sometieron a la prueba de *t* de Student para la comparación de la media de cada grupo experimental con la media del grupo testigo.

La vida media (V.M.) se obtiene dividiendo la vida media de cada grupo entre la del testigo y el porcentaje de supervivencia (P.S.) es la relación entre la supervivencia media de cada grupo experimental y la supervivencia media del grupo testigo después del reto. Asimismo, se hizo la comparación de los 11 puntos so-

bre las curvas de supervivencia del grupo testigo y de algunos de los grupos experi-

mentales mediante la distribución de  $\chi^2$  (Félix, 1972).

## RESULTADOS

Como puede concluirse según los datos contenidos en la Tabla I y en la Figura 1, los ratones del grupo 1 inmunizados con las células L5178Y congeladas y desafiados posteriormente con las células tumo-

rales viables, son los que mostraron un periodo de supervivencia menor en comparación con los otros cinco grupos. La inmunización con células tumorales tratadas con vitamina E y glutaraldehído o

TABLA I

TRATAMIENTO DE LAS CELULAS L5178Y EMPLEADAS EN LAS INMUNIZACIONES Y COMPARACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA DE LOS RATONES INMUNIZADOS Y RETADOS CON CELULAS L5178Y NO TRATADAS

Grupos	Tratamiento de las células inyectadas para inducir inmunizaciones	Media de la supervivencia en días DE	Comparaciones*	
			t	P
1	Congelación	17.3 ± 0.49		
2	Congelación y glutaraldehído	17.3 ± 0.36	3.75	< 0.01
3	Irradiación	28.1 ± 1.78	5.99	< 0.001
4	Vitamina E	28.9 ± 1.88	6.62	< 0.001
5	Vitamina E y glutaraldehído	18.2 ± 0.22	3.75	< 0.01
6	Vitamina E e irradiación	31.0 ± 2.55	5.03	< 0.01

\* En relación al grupo I.  
D.E. Desviación estándar.

CELULAS L5178 Y CONGELADAS Y TRATADAS CON

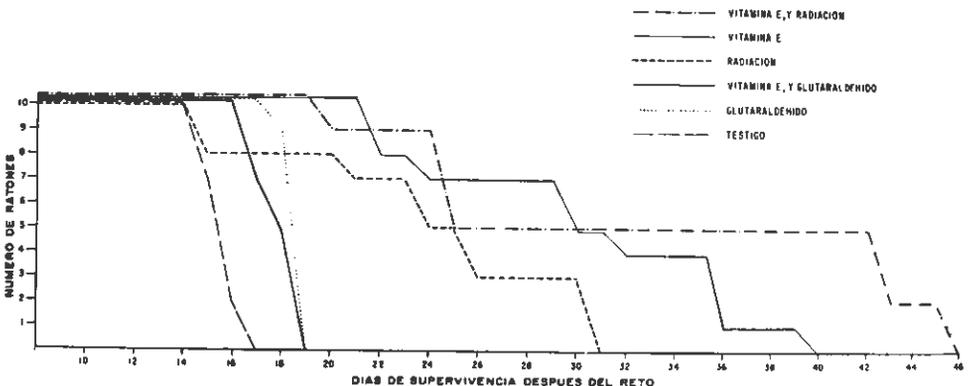


Fig. 1. Supervivencia de los ratones inmunizados con células L5178Y tratadas con vitamina E y testigos.

TABLA II

SUPERVIVENCIA MEDIA Y PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA MEDIA  
DE LOS GRUPOS INMUNIZADOS CON CÉLULAS L5178Y  
DESPUÉS DEL RETO

<i>Grupos</i>	<i>Tratamiento de las células inyectadas para producir inmunizaciones</i>	<i>P.S.M.*</i>	<i>S.M.**</i>
1	Testigo (células congeladas)		15
2	Glutaraldehido	1.1	19
3	Radiación	1.5	23
4	Vitamina E	1.9	29
5	Vitamina E y glutaraldehido	1.1	19
6	Vitamina E e irradiación	1.7	35

\* P.S.M. Por ciento de supervivencia media.

\*\* S.M. Supervivencia media.

bien con células tratadas únicamente con glutaraldehido, no aumentó la supervivencia de ratones retados con las células tumorales. Por otra parte, los animales inmunizados con las células L5178Y que se trataron con vitamina E, congelación y radiación o con vitamina E y congelación o únicamente irradiadas, mostraron una mayor supervivencia que los grupos 1, 2 y 5.

Del examen de los datos contenidos en la Tabla II se deduce que la inmunización con células neoplásicas modificadas con vitamina E e irradiación, fue la más efectiva en prolongar la supervivencia que tuvo lugar en los individuos después del reto. La vida media de la población aumentó en tres de los seis grupos inmunizados: los que recibieron células tratadas con vitamina E e irradiación, que tuvieron una supervivencia media de 35 días después del reto, los ratones inmunizados con células tratadas con vitamina E mostraron una supervivencia media de 29

días y el lote de animales inmunizados con células irradiadas excluyendo los otros tratamientos, cuya supervivencia media fue de 23 días, después del reto.

Al hacer las comparaciones de los 11 puntos de las curvas de supervivencia del grupo testigo y de los grupos experimentales, se encontraron diferencias altamente significativas mediante el método de  $X^2$  en los siguientes grupos: inmunizados con células tratadas con vitamina E e irradiación ( $X^2 = 49$ ,  $P < 0.001$ ), inmunizados con células tratadas con vitamina E ( $X^2 = 25$ ,  $P < 0.001$ ).

Finalmente, el grupo transplantado con células tumorales y posteriormente tratado intraperitonealmente con vitamina E no mostró diferencia significativa en la supervivencia de los ratones ( $X = 16.9 \pm 0.43$ ) con relación al grupo testigo que no recibió tratamiento con vitamina E ( $X = 15 \pm 0.45$ ).

## DISCUSIÓN

Varios autores (Jaffe, 1946; Harber y Wissler, 1962; Harman 1968) reconocieron que la vitamina E adicionada a la dieta de animales con cáncer inducido con metil-colantreno, reduce la malignidad aunque no explicaron los mecanismos probables mediante los que la vitamina E conduce a la inhibición del crecimiento tumoral.

En el presente informe el grupo inmunizado con células tratadas con vitamina E tuvo una supervivencia de  $28.9 \pm 1.98$  que comparada con la del grupo testigo dio una *t* de 6.62 que es el valor más significativo entre los tres encontrados, por lo cual es de considerarse que la vitamina E de alguna manera modifica a las células, prolongando la supervivencia de los ratones inmunizados con éstas.

De la comparación de la supervivencia del grupo inmunizado con células irradiadas y tratadas con vitamina E con el testigo, se deduce que dicho tratamiento aumentó significativamente la supervivencia de los ratones así inmunizados. Sin embargo, el grupo inmunizado con células neoplásicas irradiadas tuvo una supervivencia también significativamente mayor con respecto al testigo que recibió células cuyo tratamiento se limitó a la congelación.

El glutaraldehido aumenta la rigidez de las moléculas de los antígenos debidos a la formación de enlaces cruzados entre los grupos amino de las proteínas y el glutaraldehido (Richard y Knowles, 1968). Al tratar de esta manera a algunos antígenos membranales se produce la polimerización de las moléculas y el aumento de la inmunogenicidad sin pérdida de los determinantes antigénicos originales (Parish, 1971).

Sanderson y Frost (1974) señalaron que la inmunización de ratones BALB/c con células tumorales modificadas con glutaraldehido producía un alto grado de protección contra el crecimiento del tumor P1798, la inmunización con células L5178Y modificadas con glutaraldehido y vitamina E no prolongó la supervivencia de los ratones. Como los resultados fueron semejantes a los observados cuando se inmunizó con células L5178Y modificadas únicamente con glutaraldehido, es posible que este reactivo inhiba el efecto de la vitamina E.

Pryer (1971) señaló que la vitamina E es un antioxidante que disminuye las reacciones de radicales libres en cadena que dañan a las células y enfatizó asimismo, que la mitocondria que es el organelo celular en el que tiene lugar un índice de oxidación mayor, contiene en sus membranas vitamina E.

Harber (1969) indicó que la incidencia de carcinomas mamarios aumenta en función del contenido de lípidos no saturados en el alimento ingerido por ratones hembras: la incidencia de carcinomas es mayor en la dieta con lípidos no saturados en relación con la que contiene lípidos saturados adicionados con vitamina E. Partiendo de la suposición de que el poder antioxidante de la vitamina E podría actuar en alguna forma en contra de las células tumorales, se procedió a inyectar vitamina E a un grupo de ratones, comparando la incidencia del desarrollo tumoral L5178Y con la incidencia en el grupo que sólo recibió el vehículo (aceite de cártamo).

En estas condiciones la vitamina E no tuvo efecto, ya que sólo 4 de los 10 animales inyectados sobrevivieron entre 18 y

24 días después del trasplante y estos tiempos no difieren significativamente de los obtenidos en el grupo testigo, de los cuales el 50% sobrevivió hasta el día 18 después del trasplante.

En conclusión, el trasplante de las células L5178Y y la inyección posterior con vitamina E a los receptores del tumor no

produjo en ellos una mayor resistencia contra la neoplasia.

#### AGRADECIMIENTO

Se agradece al Dr. Rodolfo Félix Estrada sus valiosas sugerencias, así como la corrección crítica del manuscrito.

#### LITERATURA

- FÉLIX, E. R. (1972). Alargamiento de la vida media de *Drosophila melanogaster* por la adición de compuestos antioxidantes al medio de cultivo. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 33, 201-209.
- FISHER, G. A. (1957). Studies of the culture of leukemia cells in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 76, 673-675.
- GAMAL, E. B., CARROL, K. K. y PLUNKET, E. R. (1967). Effect of dietary fat on mammary carcinogenesis by 7,12 dimethylbenzanthracene in rats. *Cancer Res.* 27, 1737-1742.
- HABER, S. L. y WISLER, R. W. (1962). Effect of vitamin E in carcinogenicity of methylcholanthrene. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 774-775.
- HARMAN, D. (1961). Prolongation of the normal life span and inhibition of spontaneous cancer by antioxidants. *J. Gerontol* 16, 247-254.
- (1968). Dibenzanthracene induced cancer: inhibition effect of dietary vitamin E. *Clin. Res.* 17, 125-126.
- JAFFE, W. (1946). The influence of wheat germ oil in production of tumors in rats by methylcholanthrene. *Exp. Med. Surg.* 278, 213-214.
- PARISH, C. R. (1971). Response to chemically modified flagellin by acetoacetylated derivatives on the protein. *J. Exp. Med.* 134, 1-19.
- FRYOR, W. A. (1971). Free radical pathology. *Chem. Engin. News* 34, 34-51.
- RICHARD, F. M. y KNOWLES, J. R. (1968). Glutaraldehyde as a cross linking reagent. *J. Mol. Biol.* 37, 231-233.
- SANDERSON, C. J. y FROST, P. (1974). The induction of tumor immunity in mice using glutaraldehyde treated tumor cells. *Nature* 248, 690-691.