

246

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



CELULAS SUPRESORAS DE LA
RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

VIRGINIA ALVARADO MARTINEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

U N I V E R S I D A D N A C I O N A L A U T O N O M A .

D E

M E X I C O

FACULTAD DE CIENCIAS

" CELULAS SUPRESORAS DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA:

VIRGINIA ALVARADO MARTINEZ

México, D. F. .

1980

C O N T E N I D O

	Pág. No.
INTRODUCCION	1
CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES DEL SISTEMA INMUNE	2
RELACION ENTRE NEOPLASIA E INMUNIDAD	6
LOS MACROFAGOS COMO CELULAS SUPRESORAS	8
LINFOCITOS T COMO CELULAS SUPRESORAS	10
LINFOCITOS B COMO CELULAS SUPRESORAS	18
ALGUNAS TECNICAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACION DE CELULAS SUPRESORAS	31
IMPLICACIONES DE LAS CELULAS SUPRESO- RAS EN LA INMUNOTERAPIA HUMANA	34
DISCUSION	38
BIBLIOGRAFIA	44

INTRODUCCION

En la República Mexicana las enfermedades neoplásicas ocupan el 5º lugar como causa de mortalidad (1). Dentro de ellas - leucemia, linfomas y cáncer cervico uterino constituyen las causas más comunes de mortalidad (2).

Los procedimientos de cirugía, quimioterapia y radiación, sólo prestan utilidad limitada para el tratamiento del cáncer. Desde hace 90 años, se han hecho intentos para destruir las células malignas por métodos inmunológicos; pero los resultados han sido infructuosos. La inmunoterapia intenta erradicar el crecimiento tumoral mediante la inducción en el organismo de una respuesta inmune de rechazo contra las células tumorales.

La teoría de la vigilancia inmunológica postula que las células tumorales continuamente surgen en el organismo, pero en virtud de ser consideradas "extrañas" son eliminadas en forma eficiente por el sistema inmune y el cáncer desaparece.

La respuesta inmune está gobernada por una serie de factores negativos y positivos. En muchos sistemas la transición final de linfocitos B a células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas sólo se hace en presencia de linfocitos T y macrófagos. En otras condiciones, estas mismas células inhiben la transformación de linfocitos B a células plasmáticas. (5)

Se denominan células supresoras aquellas que deprimen una serie de fenómenos inmunológicos como: la competencia antigénica, la hipersensibilidad retardada, la regulación genética de las respuestas inmunes, determinan la perpetuación de supresión de alotipos y la tolerancia inmunológica.

La regulación que ejercen las células supresoras en la respuesta inmune, involucra una red intrincada de diferentes sistemas, los linfocitos B, los monocitos y especialmente las células T (4), que tienen un papel supresor en las diferentes fases de la inmunidad.

Algunas funciones supresoras son específicas de la respuesta celular del sistema inmune como: la inhibición de los linfo-

citos T efectoras, y otras son no específicas como la supresión de la síntesis del DNA en las células normales de bazo, la proliferación de los linfocitos T. A nivel de la respuesta humoral, las funciones supresoras no específicas están implicadas en la inmunodeficiencia policlonal asociada al mieloma múltiple y las infecciones por hongos (5).

Las células T supresoras regulan la producción de diferentes clases de inmunoglobulinas (6), de una sola clase de inmunoglobulinas (7) o de un sólo tipo de ellas (8).

El objetivo del presente trabajo fué: Analizar las implicaciones de las células supresoras de inmunidad en la respuesta antitumoral según lo publicado de 1970 a 1979.

CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está constituido por una serie de órganos y tejidos más o menos bien conformados del cuerpo humano.

Los órganos importantes del sistema inmune son la médula ósea roja, el timo, el bazo, ganglios linfáticos, amígdalas y las placas de Payer. En estos órganos se producen los linfocitos T, B, macrófagos y polimorfonucleares que circulan en todos los tejidos a través de la corriente sanguínea. Estas células constituyen el substrato anatómico-histológico de la respuesta inmune celular y humoral.

La respuesta humoral del sistema inmune se manifiesta en la producción de anticuerpos, los cuales son producidos por linfocitos B y células plasmáticas.

La producción y la renovación de los linfocitos y anticuerpos es continua, ya que cada minuto se producen aproximadamente 10 millones de linfocitos y millones de moléculas de anticuerpos con diferentes configuraciones. La maduración de los linfocitos procedentes de la médula ósea se puede realizar de dos formas: - aquellos que maduran en el timo se denominan linfocitos T y los que maduran en la médula ósea roja (o en la Bursa de Fabricius en las aves) se llaman linfocitos B (10).

Los linfocitos B son los precursores clonales de las células plasmáticas, especializados en producir anticuerpos.

Los anticuerpos son moléculas de proteínas globulínicas que constan de aproximadamente 20.000 átomos y a los que según su composición química reciben diferentes nombres: las inmunoglobulinas G (IgG), las A (IgA), las M (IgM), las D (IgD), y las E (IgE).

La estructura de las inmunoglobulinas es la siguiente: cuatro cadenas de polipéptidos de dos tipos por unidad: las cadenas H que son cadenas pesadas con un peso molecular de 50.000 y las cadenas L, con un peso molecular aproximado de 20.000.

Un antígeno o inmunógeno es toda molécula capaz de producir una respuesta inmune celular o humoral.

Los antígenos son en su mayoría proteínas, aunque puede haber ciertos polisacáridos bacterianos, ácidos nucleicos, lipopolisacáridos, glucoproteínas altamente polimerizados que pueden provocar la respuesta inmune.

Las moléculas de los anticuerpos en conjunto, pueden contener unos 100 000 sitios o receptores de antígenos en espera de encontrarse con éstos por diversos mecanismos de acción inmunológica.

Los linfocitos están comisionados genéticamente para codificar la producción de un número determinado de anticuerpos, los que se expresan funcionalmente fuera de la membrana del linfocito.

Cuando el antígeno hace contacto con el linfocito, éste, puede estimularse y responder positivamente, o paralizarse y por lo tanto responder negativamente.

Rowe (1977), sugirió que la diferencia entre las respuestas negativas y positivas de los linfocitos, pueden encontrarse en sitios receptores de éstos, y que puede deberse a varias condiciones:

- a) Como son presentados los antígenos al linfocito (si es sobre las moléculas o es sobre la superficie de las células)
- b) a los sitios de combinación de los receptores y
- c) a la ausencia o presencia de otros linfocitos que pueden ayudar o suprimir dicha respuesta.

Los linfocitos se originan de células precursoras de la médula ósea roja: que por una parte producen las células T que pasan a diferenciarse en el timo, pasando luego al torrente sanguíneo y por otra las células B que secretan moléculas de anticuerpos; las células T tienen un papel muy importante por que reconocen a los antígenos debido a que también poseen receptores de antígenos en su superficie.

Bach, et al (1979) demostraron in vivo que el timo produce hormonas tímicas compuestas por péptidos, las cuales intervienen en la maduración de los linfocitos T, incluyendo los linfocitos supresores. Estos investigadores extirparon el timo de ratones y observaron que las hormonas tímicas, una de ellas el factor tímico circulante, no induce la diferenciación de los linfocitos T. Esta función reaparece después que el timo es trasplantado.

Por su morfología las células T y B aparentemente son iguales y es difícil reconocerlas al fotomicroscopio, sin embargo, las pruebas morfológicas y citoquímicas realizadas por Parker, et al (11) revelan que existen diferencias específicas entre los linfocitos B y T.

Entre las pruebas citoquímicas se encuentran las siguientes: los linfocitos T presentan núcleos de configuración irregular, además de que los nucleolos son pequeños y algunas veces están ausentes, la heterocromatina tiene la apariencia de ser punteada el citoplasma es escaso y se tiñe con ácido periódico de Schiff (PAS) además de ser basófilo. Los linfocitos B tienen distribuída en la periferia la heterocromatina y el citoplasma es abundante y pironinofílico; éstas células no se tiñen con PAS y el citoplasma es basófilo.

Las pruebas con el microscopio electrónico revelan que los linfocitos T presentan una membrana irregular con prolongaciones externas, digitiformes. Las células B son más redondeadas con la apariencia de vesículas en la membrana; los núcleos son pequeños con vesículas y los nucleolos son prominentes (63).

La maduración de las células T se debe a la estimulación de los linfocitos indiferenciados por las hormonas del timo e influyen en la liberación y producción de linfocinas en presencia de un antígeno.

Las células T maduras dejan el timo a través de los vasos sanguíneos y rara vez regresan a éste, se encuentran especialmente en ganglios linfáticos y en el bazo.

Las reacciones mediadas por células T son las de inmunidad celular como por ejemplo la hipersensibilidad cutánea tardía, - la reacción injerto contra huésped y la producción de linfocinas, asimismo la cooperación con los macrófagos en la eliminación de los organismos patógenos.

Las células B producen los anticuerpos secretando hasta - 2000 moléculas idénticas por segundo. En muchos sistemas, la transición final de células B a células plasmáticas que secretan las inmunoglobulinas, requiere la cooperación de las células T y de los macrófagos.

Bajo ciertas condiciones, la última transición de células B a células plasmáticas puede ser inhibida por células supresoras T y macrófagos (12).

Recientemente se ha introducido el término células supresoras para describir a las células que participan en diversas funciones del sistema inmune, por ejemplo tolerancia inmunológica, control de las reacciones de hipersensibilidad retardada o bien limitan la respuesta de los anticuerpos a determinados antígenos.

En las fases diversas de la inmunidad ciertas clases de - linfocitos B, de monocitos y especialmente de linfocitos T pueden tener un papel supresor y en otras fases promover la respuesta inmune. (5)

RELACION ENTRE NEOPLASIA E INMUNIDAD

En el caso de las células neoplásicas que provienen del propio organismo, es muy difícil que el sistema inmune las reconozca como extrañas.

Debido a que las células neoplásicas pueden aparecer durante toda la vida de un organismo, se han postulado varias teorías acerca del origen de las células cancerosas. Conheim (1970) (13), propuso que las neoplasias se originaban por la proliferación de las células embrionarias que habían quedado "en reposo" en los tejidos normales, otros investigadores (14) han informado que hay antígenos en las células neoplásicas con características semejantes a las células embrionarias y fetales y que estos antígenos "están presentes en los tejidos normales.

Poley y Pæhn (1963) (14), demostraron que las células de las neoplasias trasplantables, son portadoras de antígenos neoplasia específicos (ANE) en animales singénicos.

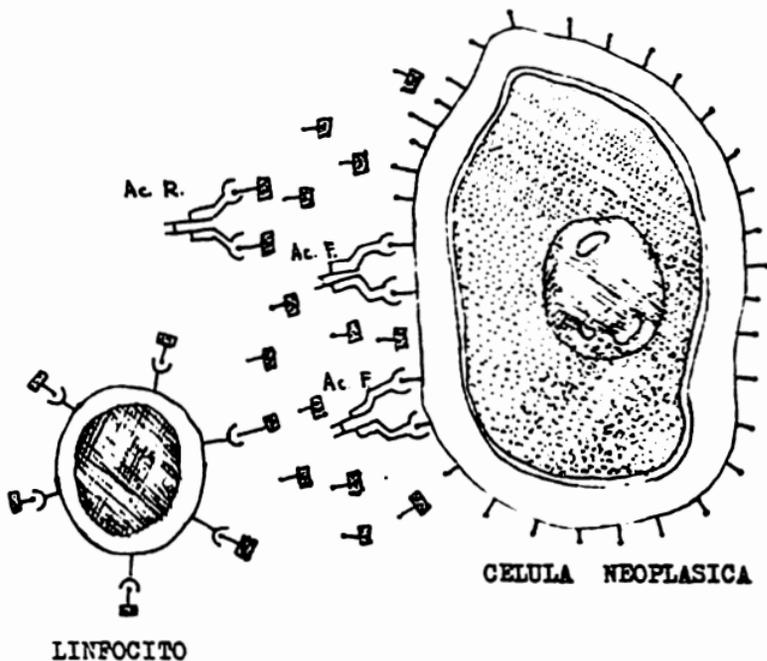
Las células tumorales experimentan una expresión anormal de los genes que da como resultado cambios antigénicos y el desarrollo del cáncer. Burnett (1967) (17), postuló que el sistema inmune puede eliminar cualquier célula maligna bajo ciertas condiciones, para ello es necesario que este sistema este in contacto.

En el cáncer se pierde la vigilancia inmunológica por varias razones:

- 1) Por el mecanismo de "facilitación inmunológica", el cual favorece el crecimiento tumoral y es mediado por los mismos anticuerpos. En este proceso los antígenos neoplasia específicos que están presentes en el glicocálix de la célula tumoral, son liberados a los líquidos extracelulares, los cuales se unen a los anticuerpos de rechazo o a los anticuerpos de facilitación formando complejos solubles, además los ANE solubles se unen también a los sitios de reconocimiento de los linfocitos y los anulan para desarrollar efecto citotóxico contra las células cancerosas (18,19,20). Ver figura 1.

FIGURA 1.

MECANISMOS DE INHIBICION DE LA INEJUNIDAD HUMORAL Y
CELULAR HACIA CELULAS NEOPLASICAS .



Ac. R. - ANTICUERPOS DE RECHAZO

Ac. F. - ANTICUERPOS DE FACILITACION

2a. Por efecto de las células supresoras que pueden influir sólo en las respuestas inmunes celulares sin un efecto apreciable sobre la inmunidad humoral; otras células supresoras pueden influir sobre las ramas aferentes o eferentes de la respuesta inmune (linfocitos T y B). Y la rama eferente del sistema inmune es propiamente la respuesta de éstas células contra el antígeno creado.

Recientemente se ha propuesto que las células supresoras y sus factores pueden debilitar la respuesta inmune, lo que ocasiona una distorsión en la vigilancia inmunológica.

Sin duda, existen situaciones en las cuales la inmunosupresión produce una elevada incidencia de la neoplasia. La inmunosupresión puede preceder al desarrollo tumoral o puede acompañarlo en este último caso, es de gran importancia para explicar el hecho de que el tumor no puede rechazararse a pesar de poseer los antígenos neoplasia específicos (ANE).

ANALISIS DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE SUPRESION DE INMUNIDAD ANTITUMORAL

LOS MACROFAGOS COMO CELULAS SUPRESORAS

En varios casos en los que se presentan tumores espontáneos en humanos y en animales, acompañados por deficiencias en el sistema inmune, se desconoce si preceden al crecimiento tumoral o si son de naturaleza secundaria a éste. El trabajo de Kirchner y asociados (21) fué muy importante porque hizo análisis funcional de las células del sistema inmune en modelos tumorales experimentales, para definir las alteraciones inmunológicas asociadas con el desarrollo del tumor. Estas fueron detectadas especialmente con pruebas de inmunocompetencia. El uso de mitógenos en cultivo, tales como la fitohemaglutinina (PHA), constituyó una técnica útil para evaluar la reactividad de los pacientes con tumor y observaron una respuesta baja de la PHA en bazos de ratones con tumor. La hipótesis que propusieron es que la reactividad baja a la PHA que se debe a un defecto intrínseco de supresión que corresponde a células diferentes a los linfocitos T.

Estos investigadores estudiaron bazos de ratones C57BL/6N que tenían tumor inducido por virus del sarcoma de Moloney (MSV) y encontraron en éstos que había cuatro veces del número normal de células mononucleares que desarrollaban una elevada síntesis espontánea de DNA independiente del mitógeno PHA. El número de macrófagos aumentó tres veces y hubo una ligera reducción en el número de linfocitos -T. La respuesta a la fitohemaglutinina en las células de los bazos de ratones con tumor disminuyó en un 90% cuando se comparó a la de los ratones normales. La formación de rosetas con eritrocitos de carnero también disminuyó a niveles inferiores a 10% en relación con los grupos testigo.

Pudo recuperarse la respuesta ala PHA cuando se purificaron las células del bazo de ratones con MSV a través de la columna de nylon y al quitar a las células fagocíticas con imanes de fierro. La actividad de las células supresoras en ratones con MSV tuvo un marcado deterioro a la respuesta a la PHA, lo que se demostró en mezclas de células de bazo de ratones con

tumor con células de bazo de ratones normales singénicos.

Las células de bazo de ratones normales a las que se trató con suero antitheta y complemento, totalmente sin reacción a la PHA, no tuvieron esa reacción. Las células supresoras presentes en bazos con MSV fueron insensibles a la activación con el suero antitheta y complemento pero podían removerse con la columna de nylon. Estos datos sugieren que estas células supresoras corresponden a la serie monocito-macrófago. Hubo evidencias de que las células supresoras pertenecen a la población proliferativa en bazos con MSV.

El significado de éstos datos es que aunque los tumores - estimulan al sistema inmune a actuar pueden ser supresores - en ciertas funciones por medio de la activación de las células supresoras.

LINFOCITOS T COMO CELULAS SUPRESORAS

Guillespie y Rusell (1978) (25), realizaron una investigación donde los linfocitos T desarrollan actividad citotóxica contra tumor, cuando este se encontraba en diferentes estados, es decir, tanto en regresión como en progresión.

Se obtuvieron linfocitos T intratumorales después de inducir en ratones BALB/C, el sarcoma de Moloney y extraer de éstos durante la progresión y la regresión del tumor, los linfocitos T.

Se probó la capacidad de éstos linfocitos para matar a las células del sarcoma de Moloney, mediante la incorporación del ^{51}Cr que en este caso fué de un 80-95%.

Los sarcomas en progresión y en regresión, mostraron dos perfiles cinéticos semejantes en la actividad supresora en amplitud y duración pero separados por cuatro días. es decir, los tumores en progresión se manifestaron en los primeros diez días post-inducción y después de cuatro días se manifestó la regresión del tumor.

En contraste, la actividad citolítica de los linfocitos de los tumores en regresión llegó a niveles elevados cuando se inició esta fase.

Se vieron cambios semejantes en la actividad citolítica de los linfocitos T drenados de los ganglios linfáticos de estos ratones.

La actividad de los linfocitos T citolíticos es más efectiva en los tumores en progresión (primeras etapas del tumor) que en regresión realizadas in vivo.

Cuando se cultivaron in vitro por cuatro días los linfocitos T no citotóxicos de los ganglios linfáticos de sarcomas en progresión necesitaron de altos niveles de citotoxicidad.

La restitución sin embargo, era disminuída si el cultivo se agregaban lisados celulares de tumor de Moloney, macrófagos

o macrófagos alimentados con lisados de células tumorales. Los resultados demostraron que los linfocitos T y su toxicidad se pierde durante el crecimiento tumoral como consecuencia de la supresión in vivo debida quizá a la acción de los macrófagos o a la de un antígeno soluble.

Para definir el efecto del crecimiento tumoral in vivo en las interacciones que ocurren entre los macrófagos y los linfocitos T en cultivo, Elgert y Connolly (1978) (26), realizaron una investigación para detectar los cambios entre estos tipos celulares.

Se emplearon ratones BALB/C a los que se indujeron tumores con metilcolantreno. Estos animales fueron sacrificados para extraer en forma aséptica el bazo. De este se obtuvieron suspensiones celulares de linfocitos libres de eritrocitos a los que se fraccionó en columnas de nylon para obtener suspensiones de linfocitos T. Estas suspensiones se marcaron como linfocitos reaccionantes o de respuesta obtenidos de ratones cepa BALB/C y los linfocitos estimuladores se obtuvieron de ratones cepa C3H (alógena) pero tratadas con mitomicina C.

Se hicieron cultivos mixtos de linfocitos T reaccionantes y de linfocitos T estimuladores para hacer ensayos de blastogénesis por medio de la incorporación de timidina. También se probó la viabilidad de los linfocitos con la técnica de exclusión del azul de tripán.

Se obtuvieron macrófagos de la cavidad peritoneal de los ratones, se colocaron en placas de cultivo y se inactivaron con mitomicina C.

Después de 45 minutos de incubación y a 37°C se lavaron y se agregaron a las poblaciones de linfocitos, entre 2×10^3 células en 0.05 ml. (poblaciones de linfocitos al 1%) hasta 1.6×10^4 células en 0.05 ml. (poblaciones de linfocitos al 8%).

Por otro lado, se preparó sobrenadante de macrófagos y se agregaron a microplacas de cultivo.

Se diseñó un experimento para determinar de qué manera el crecimiento tumoral afecta la capacidad de las subpoblaciones esplénicas para la blastogénesis en tres condiciones:

- 2.- Poblaciones no adherentes (células que se separan de las columnas de nylon después de lavado ligero)
- 3.- Poblaciones adherentes a la columna de nylon.

La reactividad a la PHA de las células no adherentes (linfocitos T) a la columna de nylon fué marcadamente alta (5%) por sobre la reactividad de los linfocitos normales, en cambio las células adherentes (linfocitos supresores) a la columna presentaron una estimulación baja a la PHA)

Las poblaciones totales de bazo con tumor de una semana aumentaron en un 80% la blastogénesis comparadas con las poblaciones celulares de bazo normales, mientras que hubo una depresión del 55% en la blastogénesis en las poblaciones de bazo con tumor de dos semanas. Las poblaciones celulares de bazo adherentes de dos semanas tanto normales como con tumor, no tuvieron blastogénesis apreciable, en cambio los linfocitos T de una semana con tumor, tuvieron un aumento del 25% en el desarrollo de la -blastogénesis.

La reactividad de los linfocitos T en presencia de macrófagos se manifestó así: sin macrófagos, los linfocitos T normales y de dos semanas de tumor presentaron una respuesta muy baja (blastogénesis deprimida), en cambio cuando los linfocitos-T normales y de una semana de tumor reaccionan en presencia de macrófagos no hay depresión en la blastogénesis.

Los linfocitos no adherentes de la cepa BALB/C con tumor, -reaccionaron contra las células alogénicas de ratones C3H en ausencia de macrófagos. Este hecho, fué interpretado como debido a la activación que los macrófagos producen sobre las células T in vivo, lo que además coincide con lo propuesto por Paranjpe et al (27), Batnagar et al 928) y Jurdin y Suit (29).

Los macrófagos de ratones normales y con tumor tratados con suero antiheta y complemento en concentraciones hasta del 24%, no lograron inhibir a las poblaciones de linfocitos T no adherentes al nylon.

Durante la fase inicial del crecimiento tumoral, se aumentó mucho la reactividad de las células T con la presencia de macró-

fagos normales o procedentes de ratones con tumor. .

En la fase final del crecimiento tumoral, se observó muy poca reactividad antitumoral en los linfocitos T expuestos a macrófagos de ratones normales y con tumor. Este hecho es atribuido a la activación in vivo de las células T provocada por los macrófagos del tumor. Varios investigadores encontraron que las células T pierden su reactividad en ratones que tienen tumores de Moloney, y que este, está regulado por macrófagos - (Holden et al , Veit y Feldaman y Kirchner y Fembart 30,31,32).

En este trabajo se encontraron inhibición in vitro de las células T por macrófagos, sin embargo, los autores proponían desarrollar una investigación para determinar hasta que punto están involucrados los macrófagos en reducir la respuesta inmune de las células T durante las últimas etapas del crecimiento tumoral.

En esta última parte, Elgert y Connolly (26) coinciden ampliamente con la investigación de Gillespie (25). y ambos opinan que los macrófagos influyen en la generación de la respuesta de los linfocitos efectores T.

En un estudio de Argyris, et al (1977) (33), las células de bazo de un mastocystoma (p-815) en ratones cepa C57Bl/6, tuvieron una respuesta baja en presencia de linfocitos mezclados en cultivo y se sugirió que la inhibición de esa respuesta fue debida a células supresoras.

Posteriormente Argyris, et al (1978) (34), trataron de demostrar la naturaleza de esas células supresoras y que, la mezcla de células tumorales de bazo en ratones sensibles con linfocitos normales, suprime la proliferación de las células efectoras o inhibieron in vivo la formación de células citotóxicas. - Además las células supresoras correspondieron a la línea celular de los linfocitos T.

Se utilizaron ratones DBA/2 (donde el tumor fue mantenido) y transplantado el tumor a ratones C57BL/6; éstos fueron sacrificados 15 días después de la inoculación. El bazo y ganglios linfáticos fueron extirpados asepticamente y las células

sanguíneas se obtuvieron por centrifugación, se lisaron y se probó su viabilidad con azul de tripan.

Los linfocitos obtenidos se mezclaron con mitomicina C - en una dosis adecuada para inhibir la mitosis y la incorporación de ^3H timidina; los resultados se expresaron en la relación existente entre los linfocitos de animales singénicos y alogénicos.

La prueba de lisis se realizó cinco días después del cultivo in vitro en contra de células blanco tumorales marcadas con Cr^{51} .

Además de utilizarse el método de separación celular por la columna de nylon, de donde se obtuvieron linfocitos T y a las células separadas se les adicionó mitomicina y una mezcla de linfocitos normales.

La primera prueba consistió en inmunizar ratones C57BL/6 con el mastocystoma y después de quince días, las células de bazo y ganglios linfáticos se probaron con linfocitos tratados con mitomicina, obtenidos de ratones DBA/2 normales. En presencia de cultivos mixtos de linfocitos hubo una respuesta muy baja contra las células tumorales: en ganglios fue del 48% y en bazo del 0%, lo que demuestra la presencia de células supresoras T.

Ahora bien, la actividad citotóxica regresa a lo normal después de 75 días de la inmunización con el tumor y además hay una alta incorporación de timidina debida a que el tumor sigue creciendo activamente en el bazo.

Para demostrar que la actividad supresora varía según la cantidad de células tumorales, se adicionaron diferentes concentraciones de estas células a cultivos inactivados de linfocitos normales tratados con mitomicina. La citotoxicidad disminuye mientras más baja es la concentración de la mezcla de linfocitos

Al implantarse células tumorales a bazo sensibilizados durante el primero y segundo día de cultivo, la reactividad de los linfocitos se suprimió totalmente y al adicionarse células supresoras al tercero y cuarto día hubo una variación, primero del 14% y al cuarto día no hubo efecto, lo que sugiere que las célu-

las supresoras tienen mayor actividad en los primeros estadios de proliferación tumoral. Por otro lado se aumentó el número de células estimuladoras de bazo a los bazos antes sensibilizados con tumor, dando como resultado un aumento de la actividad supresora, dato que permitió pensar en la posibilidad de que las células supresoras se activan en presencia de células estimuladoras, sin embargo, la actividad permanece aún cuando las células estimuladoras son eliminadas del cultivo.

Se obtuvieron subpoblaciones de bazo inmunizados con el tumor para conocer la naturaleza de las células supresoras. Primero se demostró que eliminando las células adherentes al vidrio de los bazos de ratones inmunizados con el tumor, éstos no pierden actividad supresora y que las células que son adherentes - tienen menor actividad supresora.

Además al separar las células por la columna adherente al nylon, se observó que no hay pérdida de actividad supresora. En cambio al tratarse las células de bazo de tumor con anti suero theta y complemento, si se eliminó la actividad supresora tanto con linfocitos mezclados, como la prueba in vitro, y con anti-inmunoglobulinas no hubo efecto aparente.

De acuerdo a los datos obtenidos de la prueba de adherencia al nylon, se demostró que las células supresoras pertenecen a la misma subpoblación de linfocitos citotóxicos T.

Por otro lado, en las células de bazo de ratones C57BL/6 sensibles al tumor P-815, mediante un proceso de adsorción sobre monocapas de células de bazo de ratones DBA/2 tratadas con mitomicina C, se observó que hay una marcada reducción de la actividad citotóxica, y en los controles (sobre monocapas C57 BL/6) permaneció la actividad citotóxica.

Al probar las poblaciones celulares de bazo sensibles al tumor tratadas con cortisona, se observaron resultados muy interesantes: hay una respuesta baja cuando estas células de bazo - son mezcladas con linfocitos en cultivos mixtos y la actividad citotóxica disminuye considerablemente, por lo que se deduce que las células citotóxicas son sensibles a la cortisona y son resis-

tentes a las células supresoras. Sin embargo Scheter y Feldman (1978) (56) mencionan que la cortisona es capaz de eliminar células supresoras cuando éstas no están maduras.

Algo similar ocurrió cuando las mismas células de bazo sensibles, son irradiadas con rayos X. Tanto in vitro como in vivo la actividad citotóxica disminuye.

- Se ha señalado en este estudio, las siguientes conclusiones:
- 1) Hay una marcada inhibición de las células citotóxicas cuando son puestas en cultivos de bazo con tumor y tratadas con mitomicina.
 - 2) Las células supresoras que causan esta inhibición pueden separarse de las mismas células citotóxicas que corresponden ambas a la misma línea celular.
 - 3) La actividad supresora es más alta en los bazo de ratones con tumor que en los ganglios linfáticos, mientras que en timo no se detectó actividad supresora. Sin embargo no se conoce con certeza a que se deba dicha supresión.

Se ha señalado por otros autores (3/), que en algunos tumores la supresión puede ser causada por la acción de virus o al rechazo in vivo de los trasplantes alogénicos: esto no sucede en este experimento, debido a que los tejidos de los ratones no tuvieron igual inhibición. Hay una tendencia a considerar que la inhibición de los linfocitos efectores se debe a factores bloqueadores (Helström et al 1976 (36), que son producidos por las células supresoras, que en este caso el tumor P-815 liberó productos celulares que activaron a las células supresoras. Así también en el caso del sarcoma de Moloney la inhibición se produce por productos liberados al exterior (extracelularmente) según Kirchner, et al (21).

La actividad de las células supresoras in vivo se demostró en tumores alogénicos donde se inhibió el efecto de linfocitos mixtos de células de bazo normales, resultados similares a los obtenidos por Rich y Rich, 1976 (37), donde hay activación de células supresoras T in vivo por células alogénicas no malignas.

También se ha experimentado con células de bazo de ratones DBA/2 con tumor P-815 singénicos y que tienen hiperrespuesta a los cultivos de linfocitos mixtos, además con el trabajo de Takei, et al (38) se notó la presencia de células supresoras en estados avanzados de tumor.

Con base a los datos cinéticos obtenidos: sensibilidad a la cortisona, sensibilidad a los anticuerpos, y los resultados de adsorción, se concluye que las células supresoras corresponden a los linfocitos derivados del timo que son diferentes a los linfocitos derivados también de timo.

Además se sabe que existen otra clase de linfocitos llamados células asesinas, que juegan un importante papel en la resistencia a los tumores in vivo. Estas tienen receptores para la porción Fc de las moléculas de las IgG, que pueden ser células T, B o corresponden a una tercera población celular (Hellstrom, 1974, 36).

Lo importante de estos hallazgos es que en los seres humanos se han encontrado células asesinas naturales contra células tumorales demostrables por diferentes mecanismos. (61).

Kaplan, et al 1978 (42), utilizaron dos antisueros heterogéneos que son citotóxicos para linfocitos sanguíneos, el HTLA (antígeno linfocítico humano T) y HBLA (antígeno linfocítico humano B), de tal manera que las células asesinas normales reaccionan contra los antisuero. Esta técnica la utilizaron con el propósito de facilitar el trabajo.

Los antisueros fueron obtenidos de conejos inmunizados con linfoblastos T o con linfoblastos B hasta obtener los antisueros que posteriormente se probaron con la línea celular opositora. La especificidad de las células T y B, fué probada de acuerdo al efecto del complemento y a la citotoxicidad medida contra células mononucleares sanguíneas, timocitos y las células linfoblastoides. La citotoxicidad se expresó como porcentaje de viabilidad celular

Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica y se mantuvieron con anti-HTLA+C ó HBLA+C para permanecer inactivos

Las células testigo se incubaron sólo con suero normal de conejo.

Las células tumorales se obtuvieron de un paciente con leucemia mielógena crónica de la línea celular K562; posteriormente el ensayo de citotoxicidad fué probado con la técnica de liberación del Cr^{51} para determinar el porcentaje de lisis celular.

De los resultados obtenidos para conocer el efecto de las células asesinas contra tumor se concluyó lo siguiente: los experimentos se realizaron por separado, en uno se probaron los linfocitos periféricos sanguíneos, en otro los timocitos y en otros dos las células T y B; cada uno de estos experimentos con los antígenos linfocíticos humanos B y T. Sólo hubo actividad con el antisuero T para todas las pruebas utilizadas, por lo que concluyen que las células asesinas (NK) son células T.

A las subpoblaciones celulares T humanas se les han distinguido receptores Fc así, las células Tm que llevan receptores Fc para IgM tienen actividad cooperativa. Las células Tg llevan receptores Fc para IgG y tienen actividad supresora (Moretta, et al 1977 (43). Esto indica que las células naturales asesinas (NK) pertenecen a la subpoblación celular Tg. Ahora bien, este hecho permite afirmar que las células asesinas y las células supresoras son idénticas. Queda por investigar cómo y cuando se genera la diferencia en la actividad de estas células (efectoras y supresoras) si es según la edad, tejido, afinidad, etc. de las personas, o bien puede responder a otra circunstancia.

Las células de baxo de animales inmunizados al tumor murino rindieron un alto número de linfocitos citolíticos (CTL) después de incubarlos in vitro con células tumorales irradiadas en un cultivo singénico secundario con mezcla de leucocitos y células tumorales (Sec-MLTC). Siete días después de iniciado el cultivo se notó la actividad citolítica máxima, que disminuyó después lentamente.

Se ha sugerido la existencia de un mecanismo de memoria en los estados de respuesta inmune para tumores inducidos por sarcomas murinos. Se encontró que la respuesta de los linfocitos citolíticos T, generada en cultivos secundarios con mezcla

de leucocitos y células tumorales (Sec-MLTC), con células de bazo de animales que tuvieron rechazo a tumor murino, fué diez veces mayor que la respuesta generada de células normales de bazo bajo condiciones similares. La mayor actividad citolítica fué al séptimo día de iniciado el cultivo. Esto sirvió para conocer la naturaleza de las células precursoras T en un gran período de inactividad y puestas en un segundo cultivo.

Un trabajo realizado por Plata y Jongeneel (1978) (44), tuvo como objetivo mostrar la gran actividad de los linfocitos citolíticos T que se generaron en estimulación singénica MLTC terciaria y cuaternaria, con antígenos tumorales específicos.

Se utilizaron ratones cepa BALB/C (H-2^d) a los cuales se les trasplantó el sarcoma murino por inyección intramuscular. Una vez que las células de bazo entraron en la fase proliferativa, los leucocitos fueron extraídos para preparar los cultivos Sec-MLTC junto con células estimuladoras tumorales.

Los cultivos sec-MLTC fueron preparados con células de bazo viables en regresión con células tumorales. Los cultivos terciarios se cultivaron células reaccionantes de los cultivos secundarios de 14 a 20 días después de la iniciación del cultivo. Los cultivos cuaternarios se iniciaron con células viables de los cultivos terciarios.

Esto indica que en los cultivos terciarios se van obteniendo linfocitos citolíticos de los cultivos anteriores con una mayor capacidad citotóxica.

En cambio cuando los cultivos terciarios son puestos con cultivos tumorales que previamente fueron irradiados, la actividad citolítica de los linfocitos aumentó a $10 \text{ Lu}/10^6$ células (Lu= Unidades líticas), actividad mucho más elevada que en los cultivos anteriores.

Además se notó que las células inmunes al tumor murino, cuando se cultivaron células normales de bazo C57BL/6, fueron no activos en todas las veces que se probaron.

La actividad citolítica fué mejor en los cultivos secundarios donde la cantidad de antígenos tumorales necesarios fué menor que en los cultivos terciarios. Esto pudiera interpretarse que la naturaleza de las células precursoras de CTL pre-

entes en los bazo^s inmunes al tumor y en los cultivos secundarios son diferentes.

Se obtuvieron suspensiones celulares libres de células T por medio de la incubación con suero anti θ y complemento de conejo. La liberación del ^{51}Cr se utilizó para marcar a las células blanco (tumora^les) en términos de unidades líticas.

Se probaron células de bazo de animales inmunes al tumor murino in vitro para estimular la generación de los linfocitos citotóxicos cuando hubo reestimulación con células del linfoma RBL-5. La estimulación MLTC secundaria se estableció cuando se pusieron en contacto células de bazo respondedoras inmunes al tumor e irradiadas con células estimuladoras RBL-5. A estos cultivos se les probó el máximo de actividad citolítica alcanzada al séptimo día, pero además esta generación citolítica cuando se desarrolla en los cultivos secundarios, depende de la presencia de antígenos tumorales asociados al sarcoma de Moloeny obteniéndose una actividad citolítica no muy alta.

Cuando los cultivos secundarios fueron recultivados con células normales de bazo singénicos, se obtuvo también poca actividad de los linfocitos citolíticos, en cambio cuando fueron incubados con células irradiadas RBL-5, se notó una actividad detectable de los linfocitos citolíticos (CTL).

Las células T aumentan en número cuando los cultivos secundarios son estimulados con células del linfoma RBL-5, aumentando también su citotoxicidad.

De todo lo anterior se pudo concluir que los linfocitos citolíticos T pueden ser generados in vitro en presencia de antígeno asociados al tumor murino y que esta actividad aumenta cuando las células de cultivos mixtos MLTC son estimulados periódicamente con células tumorales (cultivos secundarios, terciarios y cuaternarios).

Hay que resaltar aquí la actividad específica y selectiva de los linfocitos T que ocurrió en los cultivos secundarios, es decir, los linfocitos T están dotados de una "memoria" que los hace mucho más activos bajo ciertas condiciones, debida quizá a la naturaleza de los precursores de linfocitos presentes en los cultivos. Para los cultivos secundarios, las células -

efectoras actuaron con altas dosis de antígeno tumoral. Este también parece indicar que hay células diferentes a las precursoras, pero también con propiedades proliferativas que tienen un efecto supresor, comparando con los cultivos terciarios y -cuaternarios.

Se reportó anteriormente (Plata, et al (45), que los linfocitos CTL específicas pudieron ser generados en los cultivos primarios (MLTC), pero las células recuperadas de estos cultivos ya no pudieron responder a una estimulación secundaria in vitro con antígenos tumorales, lo que sugiere que existen células supresoras que modifican la actividad esperada, pero también puede ser la pérdida de una ayuda esencial celular como la reporta H ñes, et al 1974 (46).

Se conoce a las células supresoras por su actividad en - multitud de reacciones inmunes como: contacto con agentes químicos, la respuesta a las Ig, como células implicadas en la - tolerancia a antígenos solubles y en la supresión de su actividad como células efectoras.

Se han encontrado también células supresoras en los ensayos realizados in vitro en sistemas tumorales siagénicos como los sarcomas murinos y adenocarcinomas mamarios en ratón.

De las investigaciones realizadas con células supresoras T, también se han encontrado factores solubles producidos por estas mismas células. El factor soluble es un antígeno específico que no es una inmunoglobulina, es además extractable del timo de animales sometidos a una cierta inmunización, tiene identidad genética al ser asociado con las subregiones I-A e I-B del - complejo Ir (Taniguchi, et al 1976 (47).

Ya Kirchner (21), estudiaron precisamente el efecto supresor soluble de un factor en-los sistemas tumorales murinos, que por algún mecanismo particular liberan estos factores a los líquidos extracelulares de los sistemas en cuestión.

Takei, et al (1978) (48), estudiaron precisamente el efecto supresor de ese factor soluble sobre la generación de células citotóxicas in vitro del tumor P-815.

Usaron ratones DBA/2 inoculados con el mastocistoma P-815, de los que se extrajo el bazo, doce días después del contacto con las células tumorales.

Para los ensayos de citotoxicidad se incubaron células de bazo y células inmunes con células tumorales tratadas con mitomicina C in vitro, probándose la citotoxicidad por medio de la liberación del Cr⁵¹.

También se obtuvieron los timos de ratones normales y de ratones con tumor para obtener los extractos respectivos, y aislar a las células supresoras. El extracto tímico supresivo de los ratones con tumor fué preparado por la inyección de células tumorales P-815 ocho días antes de la extracción.

En uno de los experimentos realizados con extractos de timos crudo normal y extracto de timo llevando tumor P-815, sometidos a varias concentraciones de células linfoides inmunes, se notó que en el timo con tumor decreció la generación de células citotóxicas contra tumor, es decir, hubo efecto supresor y no efector de dichas células. Debido a esto se planteó la pregunta: los factores solubles son específicos para suprimir la respuesta de las células citotóxicas. Se observó que los extractos suprimen la generación de las células citotóxicas del tumor P-815 pero no de otro tumor, además de que es más supresivo el efecto durante los primeros días del cultivo.

Para conocer algunas propiedades del factor soluble, se realizó una prueba con inmunoabsorbentes. Las columnas de inmunoabsorbentes, se hicieron con membranas de células P-815 y células del tumor L210. Los extractos normales y con tumor fueron parcialmente purificados por medio del electroenfoque isoelectrico y fueron pasados a través de esas columnas. Se probó la actividad supresora del material que se trasladó de inmediato, obteniéndose que casi no hay actividad supresora, sólo un poco en la columna con membranas de células L210, de lo que se dedujo que quizá exista especificidad antigénica para esta prueba.

Los resultados que encontraron Takei et al(48), muestran algunas de las propiedades de lo que es un factor soluble encontrado en los timos de ratones con mastocistoma P-815 según las distintas pruebas utilizadas.

El extracto de timo se obtuvo al octavo día de la inocula-

cuón de células tumorales, cuando los tumores son palpables.

Sin embargo, aunque el factor soluble resultó efectivo para suprimir la generación de células citotóxicas del mastocistoma P-815, no lo fué para las células leucemias L1210, se nota una especificidad en la actividad del factor soluble supresor.

Otro hecho que destaca es que el factor soluble tiene mayor actividad en los estados tempranos del cultivo, lo que significa que hay un efecto supresor sobre la proliferación y diferenciación celular de las células citotóxicas. Por otro lado se promueve la respuesta secundaria, es decir, es más efectiva la respuesta de las células citotóxicas después de dos días de cultivo, en donde sí hay generación de células citotóxicas.

La naturaleza de las células supresoras se ha estudiado en multitud de sistemas tumorales. Así in vivo se han podido realizar algunos trabajos para conocer más detalladamente el funcionamiento de tales células.

Elgert y Farrar en 1978 (49), determinaron las características de las células supresoras durante el crecimiento tumoral y el efecto de los productos solubles de dichas células supresoras. Para esta investigación, utilizaron ratones BALB/C, a los que les fué inoculado un fibrosarcoma (MBF-1) para trabajar en sistemas in vivo e in vitro una vez que los tumores alcanzaron un centímetro de diámetro.

Las células linfocíticas se obtuvieron por extirpación del bazo, ganglios y timo. Estas células fueron sometidas a centrifugación para separar linfocitos de otros grupos celulares. También se usó la columna de naylon para separar a las células supresoras que son adherentes a la columna y linfocitos T no adherentes.

El antisuero theta-1, se utilizó para eliminar la respuesta de la fitohemaglutinina (PHA), se utilizó para la generación de linfocitos T; este antisuero mató a los linfocitos T de los cultivos de bazo, pero no a los B.

Se compararon bazos de ratones normales y con tumor en cuanto a su población celular y se encontró que en los bazos de ratones con tumor, el porcentaje de macrófagos fué quince veces mayor que en el de bazos normales. En igual proporción se

encontraron células mononucleares. La síntesis de DNA aumentó un 50% en los bazo de los ratosens con tumor, y cuando estos bazo fueron estimulados con PHA, se redujo la síntesis de DNA no así en los bazo normales.

Es notorio que cuando aumenta el tamaño y peso del tumor, aproximadamente 30 días después de la inoculación, hay una - respuesta mayor para la concanavalina A (Co A) no así para la PHA.

Las poblaciones celulares no adherentes a la columna de - nylon (linfocitos T), mostraron mayor estimulación a la PHa, - que las poblaciones adherentes (células supresoras). Se notó que conforme crecía el tumor, el número de macrófagos esplénicos aumentaba progresivamente.

Durante las primeras etapas del crecimiento tumoral, los linfocitos T son sensibles a la acción de la PHA, sin embargo, cuatro días después de la inoculación, baja considerablemente su actividad celular. Esto sugiere según Elgert y Farrar (49) que hay cierta hiperactividad de las células T en los estados tempranos del tumor, y que al progresar dicho tumor, hay un - bloqueo originado por la presencia de células supresoras cuando el tumor progresa..

La actividad de la PHA baja considerablemente en los estados avanzados de tumor; sin embargo, esta respuesta de la PHA empeoró cuando las células de bazo con tumor fueron mezcladas con células de bazo normales en presencia de la PHA.

De acuerdo a lo anterior, se trató de conocer aún más el efecto supresor del mitógeno, para esto se mezclaron células no adherentes con células tumorales y macrófagos con células de bazo normal en presencia de la PHA todas tuvieron inhibición de la respuesta del mitógeno.

Pero además se probó que los macrófagos normales y de origen tumoral, mantienen de forma óptima las condiciones in vitro para no dejar actuar al mitógeno sobre las células de bazo normales y con el tumor. Sin embargo, los macrófagos tumorales en presencia de suero antitheta -1, mostraron una estimulación notoria para la PHA in vitro. Lo mismo se observó cuando los macrófagos de ratones con tumor se adicionaron a las poblaciones de linfocitos normales y con tumor.

Para conocer la relación existente entre linfocitos T y macrófagos, se realizó otra prueba en la que se mezclaron linfocitos T normales y de tumor con macrófagos, con respecto a la activación con PHA, se observó inhibición en la -- actividad de ésta, misma que fué erradicada con la acción del suero antitheta-1. Esto señala la presencia de una interrelación supresora entre los linfocitos T y macrófagos presentes en los bazo de ratones con tumor. Sin embargo, los macrófagos no son las únicas células que se comportan como inhibitorias para la activación de la PHA, así lo demostraron Elgert y Farrar al quitar de los cultivos normales y con tumor a los macrófagos, notando que los linfocitos supresores T tienen también un efecto inhibitorio.

Al tratar a los linfocitos con tumor con hidrocortisona en dosis que son líticas para tímocitos y para las células T también eliminan la actividad supresora, pero sólo cuando los sistemas estuvieron libres de macrófagos.

Elgert y Farrar demostraron la presencia de dos tipos celulares supresores: linfocitos supresores T y macrófagos en sistemas bien caracterizados in vitro. Estas células pueden actuar independientemente una de la otra en condiciones similares o diferente. Un dato muy importante es que el experimento con hidrocortisona, nos conduce a pensar que los linfocitos T llegan a ser resistentes a la inactivación del esteroide por los cambios de madurez que ocurren tiempo, por ejemplo los tímocitos corticales son más sensibles que los de la médula (49). Además Schechter y Feldman (56) realizaron un trabajo donde la hidrocortisona afecta a los linfocitos supresores T cuando estos se encuentran en estados tempranos de formación celular.

La falta de desarrollo de la inmunidad contra tumor, no se debe exclusivamente a la pérdida total de la respuesta inmune del huésped, sino a la presencia de mecanismos que inhiben de hecho esta inmunidad.

Entre los mecanismos inhibitorios, ha destacado la presencia de linfocitos supresores T, factores bloqueadores formados por los propios tumores.

Fujimoto, et al 1978 (50), realizaron una investigación que trató de describir las propiedades de las células supreso-

ras T y las citotóxicas contra los tumores singénicos, en la rama aferente de la respuesta inmune.

Utilizaron ratones A/J de doce semanas, a los que se les indujo sarcomas L1117, además se trabajó con los tumores S1509 y SaI. Se extirpó el bazo y los ganglios linfáticos para realizar cultivos con células linfoides tratadas con mitomicina C. Las células estimuladoras tumorales también se trataron con mitomicina C y las células linfoides se usaron como células efectoras citotóxica.

La citotoxicidad fué medida por medio de la liberación e incorporación de Cr^{51} en términos de lisis celular. También se utilizó el antisuero theta 1-2 para los ensayos de actividad supresora. En un primer experimento, las células del bazo y ganglios linfáticos de ratones A/J se cultivaron por cinco días con mitomicina C y con células tumorales L1117, observándose una citotoxicidad marcada de linfocitos T contra las células tumorales L1117. Además las células de bazo con tumor L1117 son supresoras para la acción del Cr^{51} . Es decir, se bloquea la liberación de éste cuando se mezclan en un cultivo con células T citotóxicas y recuperan su actividad con anti theta 1-2 y complemento. Ahora bien, según Fujimoto, et al las células de bazo con tumor reaccionaron de forma específica, esto es, que los linfocitos citotóxicos T se ven inhibidos por efecto de los linfocitos T supresores, pero sólo para este tumor (L1117). Con otros tumores no se da esta reacción (S1509 y SaI). Dicho de otra manera, las células supresoras T del tumor L1117 reconocen determinantes antigénicos y suprimen específicamente la reacción citolítica para este tumor.

En el caso de los sarcomas S1509 y SaI que son muy parecidos en función de su origen celular, tienen distintos tipos de determinantes antigénicos. El primero es reconocido por las células citotóxicas T contra el tumor y el otro sólo es reconocido por las células supresoras.

Por otro lado se ha observado que las células T supresoras, actúan sobre la rama aferente de la respuesta inmune. Así, en otros estudios, se ha demostrado que las células del bazo y de timo con tumor inhiben el rechazo de un segundo injerte tumoral.

Además, la interacción de células citotóxicas y supresoras tiene un papel específico en los estados tempranos de la fase efectora de acción citotóxica, es decir, la reacción se verifica dentro de los primeros diez a veinte minutos después de la exposición a las células citotóxicas T.

Una propiedad de los linfocitos citotóxicos T, es la recuperación funcional de éstos cuando previamente estuvieron sometidos a altas temperaturas. (43°C).

Mc.Donald, et al en 1978 (54), experimentaron con linfocitos citotóxicos T de bazo con tumor murino in vitro a los que sometieron periódicamente a temperaturas más altas que 37°C, notando que a medida que la temperatura aumentaba, los linfocitos se inactivaron. Esta actividad se recuperó cuando se expusieron a la temperatura de 37°C, sin sufrir cambio aparente. Un dato más es que el efecto a temperaturas altas (hipertermia) actúa según el estado de diferenciación de los linfocitos citotóxicos T.

LINFOCITOS B COMO CELULAS SUPRESORAS

Gorczyński (1974) (24), realizó una serie de investigaciones con el objeto de demostrar la actividad supresora en el crecimiento tumoral ejercido por poblaciones celulares con características de linfocitos B. Para esto, empleó bazo inoculados con el virus del sarcoma de Moloney. Las poblaciones de bazo fueron centrifugadas a diferentes velocidades que las separó de acuerdo a sus diferentes tamaños: las células grandes - y las pequeñas reaccionaron positivamente al ser sometidas a pruebas definidas de inmunidad migración-inhibitoria de macrófagos, ensayos con fitohemaglutinina (PHA), tratamiento con suero antitheta y anti Ig. Estas poblaciones celulares coincidieron con características con las descritas en un trabajo previo de Miller y Phillips (1969).

La población de células de tamaño intermedio suprimió la síntesis de proteínas inducidas mediante la fitohemaglutinina en la superficie de estas células supresoras, donde se encontraron moléculas de inmunoglobulinas, lo que indica que son linfocitos B.

Cuando la población de células supresoras se sometió a suero antitheta y a suero anti Ig se obtuvieron resultados que sugieren que la supresión se debe a células con inmunoglobulinas en su superficie. Además, se demostró que la inducción en la síntesis de proteínas en las células T en respuesta a la fitohemaglutinina, también es suprimida por células B.

De acuerdo a lo anterior, Gorczyński sugiere que las células B también se pueden comportar como células supresoras de la respuesta inmune antitumor.

En los tumores mamarios inducidos por virus murino (MuMTV), se ha destacado la presencia de linfocitos capaces de crear inmunidad específica contra dichas células tumorales in vitro, - debida a la formación de antígenos específicos contra los tumores murinos. Sin embargo, también se han encontrado células supresoras que bloquean el efecto de los linfocitos, atribuyéndose esto a la acción supresora de células pertenecientes

a la serie monocito-macrófago (49,21), a células B (24) y células T (50).

Rudczynski y Mortensen 1978 (51), realizaron un trabajo cuya finalidad fué conocer el tipo de células supresoras que se encuentran en sistemas tumorales mamarios murinos.

Para esto, se utilizaron ratones C3H, con el tumor MuMTV, a estos ratones se les adicionó altas cantidades de antígenos tumorales en su dieta y las células tumorales se hicieron reaccionar con antisuero específico MuMTV de conejo por inmunofluorescencia indirecta.

Los linfocitos se extrajeron y se cultivaron, posteriormente se separaron por la técnica de fraccionamiento sobre lana de vidrio obteniéndose poblaciones adherentes y no adherentes a este material. También se determinó las poblaciones de células T y B, a sí como de macrófagos.

Con base a que los linfocitos T presentan una respuesta baja a los antígenos tumorales y a los mitógenos como la conca-
navalina A (Co A), en algunos estados de tumor, se probaron los linfocitos T pero en bazo con tumor MuMTV, para conocer la naturaleza de su actividad en donde se encontró que la respuesta es similar que en otros estados tumorales. También como antecedentes, sabes que la actividad de los linfocitos T supresores se recupera al pasarlos por la columna de nylon (51).

Al pasar los linfocitos supresores de los tumores MuMTV por dicha columna, se recuperó en 11% la cantidad de linfocitos no adherentes (linfocitos T), en los bazo con tumor y en un 30% de los ratones con tumores libres, al evadir a los linfocitos adherentes (células supresoras) de tal maenra que sí se recuperó la actividad de los linfocitos T al reaccionar con la CoA. Esto sugiere que las células supresoras ejercen una actividad bloqueadora para los linfocitos efectores T en gran número o llegan a activarse en ratones con tumor MuMTV.

Se mezclaron células de bazo no fraccionadas de ratones con tumor murino con linfocitos de bazo normal en presencia de CoA, notándose que la respuesta de la Co A bajó marcadamente comparada con la blastogénesis de los controles.

También Rudczynski y Mortensen, analizaron el porcentaje de células T, B y macrófagos en los bazo no fraccionados de los ratones con tumor en las poblaciones adherentes como en las no adherentes.

Para las poblaciones no fraccionadas y no adherentes a la columna de nylon, de ratones con tumor, la proporción de células T y B es más o menos igual. En las poblaciones celulares adherentes se observó que las células que se encontraron en mayor cantidad fueron linfocitos B.

De lo que los autores concluye que las células supresoras que actúan en los tumores MuMTV pertenecen a la línea celular linfocitos B.

ALGUNAS TECNICAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACION DE LAS CELULAS SUPRESORAS.

El efecto de los mitógenos estimuladores de linfocitos en la actividad citolítica contra tumor, ya ha sido discutido anteriormente (Kirchner, 1974 , Gorzynski 1974).

En otro trabajo realizado por Réme et al en 1978 (59), se utilizó a la concanavalina A (Co A), para reacción citolítica contra antígenos asociados al sarcoma de Moloney, la cual produce de manera específica una respuesta secundaria co-ntra tumor mediada por linfocitos T.

Se notó que la actividad citolítica de los linfocitos T - fué más efectiva en ratones alogénicos que en ratones singénicos que habían sido inmunizados previamente.

Para este experimento se utilizaron tres diferentes cepas de ratones: C57BL/6 (B6), B10A (4R), B10A (5R), HTI y BALB/C a las cuales les fué inducido el sarcoma murino para posteriormente extirparles el bazo y obtener poblaciones de linfocitos.

Los mitógenos utilizados fueron la fitohemaglutinina (PHA), la concanavalina (Co A), y lipopolisacaridos (LPS).

Se probó la lisis celular por medio del marcaje de las células tumorales con ^{51}Cr .

Los mitógenos señalados anteriormente, estimularon las células de bazo con tumor murino de ratones B/, observándose lo siguiente: la actividad citolítica es mayor cuando los linfocitos estan en presencia de PHA en una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$., siquiendo en efectividada la COA con una dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sin embargo, se hizo un segundo experimento para medir el efecto de recuperación celular siendo más satisfactorio con la Co A (22%) con la PHA (14%), además la actividad citolítica fué anulada por suero anti theta 1-2 y complemento.

Se realizó ina curva de dosis de respuesta que mostó la - concentración más eficaz y el timpo para lograr la mejor activación de los linfocitos T en presencia de CoA, concluyéndose que la concentración óptima es de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. al séptimo día de reestimulación de los linfocitos T de bazo con tumor murino in vivo.

La prueba anterior constituyó básicamente la respuesta primaria in vivo, es decir, después de 9-10 días de la inoculación del tumor. Ahora bien, reestimulando con CoA, a los linfocitos T citolíticos in vitro, aproximadamente hasta 50 días después de la respuesta primaria, se observó una gran actividad citolítica de los linfocitos T, óptima al día 17 - postinoculación, decreciendo conforme el tiempo transcurría.

Para probar la especificidad de la CoA, se probó - in vivo, con linfocito T inmunizados, siete días después de la estimulación del tumor. Se observó lo siguiente: cuando el combinante antigénico es H-2, se observó una restricción en - la actividad de CoA, de tal manera que la CoA no es un estimulador igual para todas las cepas, en las que el combinante es - distinto.

Se encontró una respuesta primaria inmune anti-tumoral cuando se cocultivaron linfocitos de bazo no inmunes (cepa B6), con células del linfoma viral B6 irradiadas y en presencia de CoA con células del tumorales singénicas. Sin embargo, se demostró que la CoA indujo una respuesta secundaria de los linfocitos contra el tumor, probablemente debida a una mayor especificidad antigénica promovida por la CoA al darse la respuesta secundaria.

De esta manera la conclusión de este trabajo es que los mitógenos fihemaaglutinina y concanavalina A son específicos - según la cepa de ratones con la que se este experimentando.

Los macrófagos como células citotóxicas contra el tumor han sido estudiados recientemente, sin embargo, todas las pruebas realizadas in vitro necesitan de largos periodos de cultivo para obtener resultados evidentes.

Sharma, et al 1978 (60) utilizaron una técnica que requiere de un período corto de tiempo (seis horas) in vitro para - observar la citotoxicidad mediada por macrófagos.

Se utilizaron reactivos con características especiales, uno de ellos la prolina (H³), que actuó junto con la línea tumoral llamada hepatoma, se mezcló con células efectoras que - fueron linfocitos tratados para activar a los macrófagos dando un factor activador de macrófagos (MAF).

Para este estudio se utilizaron cobayos, y como reactivos a la prolina (H^3), leucina y iodoxiuridina (IudR).

El factor MAP se obtuvo por medio del sobrenadante de los ganglios linfáticos estimulados con CoA.

Los resultados fueron los esperados, el factor activador de macrófagos se comportó citotóxicamente contra las células tumorales, pero como las células tumorales fueron premarcadas con prolina, los resultados se obtuvieron de seis a veinticuatro horas después de iniciado el cultivo.

Hay marcadores radiactivos que se han utilizado en otras pruebas de citotoxicidad como El ^{51}Cr , iodoxiuridina y timidina. Sin embargo, el uso de la prolina (H^3), en este estudio tiene varias ventajas: una es que las células tumorales absorben en gran cantidad el radioisotopo sin ocasionarle toxicidad.

En otro ensayo se utilizó timidina para marcar células - blanco junto con macrófagos efectores, obteniéndose resultados similares con la prolina, pero sólo cuando se alcanzaron las primeras seis hora, después la prolina fué más efectiva.

IMPLICACIONES DE LAS CELULAS SUPRESORAS EN LA INMUNOTERAPIA HUMANA.

El conocimiento de las células supresoras puede ser en determinados casos una ayuda para la inmunoterapia.

La quimioterapia, radiación y cirugía pueden en ciertos casos beneficiar a los pacientes con tumor, debido a que tienen un efecto indirecto sobre las células supresoras.

En la quimioterapia algunos agentes químicos limitan el efecto de las células supresoras, y por lo tanto, aumenta la inmunidad humoral del huésped; tal es el caso con 6-mercaptopurina y la ciclofosfamida (62).

Las radiaciones ionizantes pueden aumentar in vivo la respuesta inmune por medio de la eliminación de la depresión inmune de las células supresoras.

Como se ha mencionado anteriormente (25), algunas células supresoras pueden ser relativamente de vida corta en algunos sistemas tumorales. En algunos casos las células supresoras pierden su actividad funcional o mueren rápidamente después de extirpar quirúrgicamente el grueso del tumor. La extirpación otorga beneficios al huésped como es alterar el balance de la inmunoregulación sin erradicar completamente la neoplasia.

Las células supresoras tienen un papel muy importante en el desarrollo del tumor, de manera que su estudio desde el punto de vista terapéutico es de suma importancia. Así, el conocimiento de los marcadores antigénicos de las células supresoras T, los I-J, productos codificados en ratones BALB/C promueve el desarrollo de los anticuerpos dirigidos contra la actividad I-J por lo que son capaces de eliminar la actividad supresora de las células T en humanos.

Se ha observado que el factor tímico circulante que está compuesto de péptidos ayuda en la restitución de los linfocitos T. Además que este producto es eficaz en la eliminación de ciertos cánceres de pulmón y en algunas infecciones virales, cuando es usado en forma natural de extractos de timo de ratones y de productos sintetizados en el laboratorio (61).

Los agentes inmunoteráuticos como Corynebacterium parvum o BCG, pueden aumentar la vigilancia inmune y la citotoxicidad en pacientes con cáncer, sin embargo, no es útil en todos los casos, por ejemplo Kirchner et al (21), menciona que el uso de la BCG deprime la inmunidad celular contra tumor acompañada de la actividad de los macrófagos como células supresoras. Esto se puede explicar como la reacción propia del organismo a eliminar microorganismos extraños y por lo tanto agravar un estado tumoral existente.

La BCG se ha utilizado en casos donde hubo que combatir infecciones virales y bacterianas, pero también en estudios recientes, su uso se ha extendido a la función que tiene para desarrollar resistencia a tumores en ratones con sarcomas FSI y FS6.

Esta resistencia de los ratones, una vez que fueron inoculados con BCG y cuyo efecto, se detectó tres días después - para alcanzar un máximo de dos a cuatro semanas, se ha atribuido a cuatro causas:

- 1) Presencia de macrófagos en la cavidad peritoneal, la que desencadena actividad citotóxica contra tumor sin forma específica.
- 2) Formación en la cavidad peritoneal de granulomas inducidos por la BCG.
- 3) Aumento en la circulación de los "factores bloqueadores" inducidos por el sistema reticuloendotelial.
- 4) Aumento en el número de células citotóxicas efectoras formadas por los antígenos tumorales.

Parr, et. al. 1978 (55), inyectaron el BCG a los ratones B57BL/6, previamente e inmunizados con sarcomas FSI y FS6 por - vía intraperitoneal, observándose que el efecto contra el tumor es más eficiente de esta forma que por otra vía donde sólo se obtuvo reacción local.

En esta investigación, las células que manifestaron mayor capacidad citotóxica contra tumor, fueron los linfocitos T, eliminando la posibilidad efectora a los macrófagos que no la manifestaron.

Así el pretratamiento con BCG en ratones inmunizados con

comparando tanto con otros ratones no pretratados con BCG - pero sí inmunizados con el sarcoma, y comparando también la citotoxicidad de los linfocitos T con otras células con propiedades citotóxicas contra tumor.

Ahora bien, existen agentes bloqueadores de la respuesta inmune antitumoral de dos tipos:

- 1) A nivel humoral, anticuerpos, antígenos y complejo - antígeno-anticuerpo.
- 2) Las interacciones celulares en los linfocitos que producen supresión de la respuesta inmune celular y humoral, de tal manera que los linfocitos pueden llegar a suprimir de manera parcial o total la respuesta inmune contra tumor.

En pruebas preeliminares, se observó que en receptores sin génicos, después de la inoculación de linfocitos T precursores de células supresoras, se convirtieron a linfocitos T supresores promoviendo el crecimiento tumoral.

Schechter, et al 1978 (56), realizaron un trabajo donde se buscó la posibilidad de eliminar a los precursores de los linfocitos supresores que en apariencia pudieran ser citotóxicos con la subsecuente inhibición del crecimiento tumoral.

Trabajaron con hidrocortisona (HC), la cual afecta alos precursores de linfocitos supresores T, y no a las células en etapa de maduración, Además, tiene un efecto diferencial en las subpoblaciones de linfocitos y crea una reacción del huesped contra el tumor.

Estos investigadores usaron ratones cepas C57BL/6 y C3H a los que les fué trasplantado el carcinoma de Lewis, un tumor con propiedades de metástasis.

Se utilizó el bazo para la obtención de las suspensiones celulares mediante centrifugación.

Además los ratones fueron tratados con radiaciones gamma, para después ser sometidos a la inyección de células tumorales.

Se hizo además un ensayo de citotoxicidad, mezclando células tumorales y células de bazo experimentales, en el cual las células tumorales se marcaron con leucina.

De este experimento se obtuvieron resultados evidentes en relación a la actividad de la HC. Cuando la hidrocortisona (HC), se va agregando poco a poco a bazos de ratón experimentales, se observó que el crecimiento tumoral se redujo en un 24. % comparándolo con el testigo que fué de un 13%, deduciendo que hay actividad citolítica debida a la deficiencia de células supresoras.

Una prueba que mostró el efecto transitorio de la hidrocortisona fué cuando se aplicó esta a donadores de linfocitos normales y con tumor, en un lapso de dos a catorce días dando como resultado lo siguiente: en los primeros días sólo hay un aumento ligero de la citotoxicidad, sin embargo, del día siete al día catorce después de la aplicación de la hidrocortisona hay una recuperación celular, lo que sugiere que entre estos días hay un efecto protector del corticoesteroide.

Esto se debe a que en las primeras fases del tumor, los linfocitos precursores ayudan protegiendo al tumor, en cambio de siete a quince días después, los linfocitos pretratados con HC tienen un efecto citotóxico contra el tumor in vivo.

Para conocer el efecto de la hidrocortisona in vitro, se realizó una prueba de actividad citotóxica; se mezclaron cantidades conocidas de HC a donadores de células de bazo normales y con tumor y se observó que dos días después de la aplicación de la HC, hubo citotoxicidad apenas visible, a los cuatro días desapareció ésta, y a los siete días fueron más citotóxicos. Estos resultados son diferentes a los obtenidos in vivo y se deben quizá a las condiciones del experimento.

DE todo este trabajo, se concluye que la HC afecta sólo linfocitos inmaduros (precursores) cuyo efecto es mayor entre el 3o y 5o. día debido a que es la etapa proliferativa de las células supresoras, lo que al pasar el tiempo va creando citotoxicidad y regeneración de órganos linfáticos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anuario estadístico de la Secretaría de Programación y Presupuesto, 1975.
- 2.- Epidemiología de Cáncer en la República Mexicana. IMSS. 1980.
- 3.- Gershon, R. K. 1974 T cell control of antibody production. *Conmp Top Immunobiol*3: 1-40.
- 4.- Waldman, T. A. et al 1974 Role of suppressor T cells in pathogénesis of ocmmmon variable hypogammaglobulinemia. *Lancet* 2:609-613.
- 5.- Broder, S. et al 1975 Imparied synthesis of polyclonal (nonparaprotein) immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with multiple myeloma: Role of suppressor cells. *N. Engl J Med* 29: 887-892.
- 6.- Waldman, T. A., Broder, et al 1977 Suppressor cells in the regulation of the immune response. *Prog. Clin Immunol.* 3: 155-199.
- 7.- Tada, T. 1975 Regulation of reaginic antibody formation in animals. *Prog Allergy* 19:122-194.
- 8.- Herzenber, L.A.et al Mechanisms of allotype suppression. University of Western Ontario Press 93:104.
- 9.- Mørhead, J. W. 1976 Tolerance and contact sensitivity to DNFA in mice. *J Immunol* 117:802-806.
- 10.-Immunology. Readings from Scientific American. New York.1976.
- 11.- Parker, et al 1978 Morphologic and cytochemical comparison of human lymphoblastoid T-cell and B-cell lines: Light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 60:59-68.
- 12.- Broder, et al 1978 Suppressor cells in Cancer. *J Natl Cancer Inst* 61:6-11.
- 13.- Conheim, et. al 1970 Fetal antigen capable of inducing transpalantation immunity against Sv40 hamster tumor cells *J immunol* 105: 525.
- 14.- Foley, E. J. 1953 Antigens proprieties of methylcholantrene induced tumøos in mice of the strain or origin. *Cancer Res.* 13: 825.
- 15.- Kirby, D.P.S. et al 1966 Transplantation of eggs to the kidney and uterus of immunized mice. *Transplantation* 4: 713.
- 16.- Prehn, T. R. 1957 Specific immunity to methylcholantrene induced sarcomas *J Nat Cancer Inst.* 18: 769.

- 17.- Burnet, P. M. 1961 Immunological recognition to self.
Science 133: 307.
- 18.- Currie, G. A. 1967 The masking of antigens in trophoblast and cancer cells. Lancet 1: 708.
- 19.- Inbar, M. Sachs, L. : 1969 Structural differences insites of the surface membrane of normal and transformed cellas. Nature 233: 710.
- 20.- Wallach, D.P.: 1968 Cellular membranes and tumor behavior. A new hypothesis. Prac. Nat. Acad. Sci. 76: 673.
- 21.- Kirchner, T. M. Chused, R. et al 1974 Evidence of suppressior cell activity in spleens of mice bearing primary tumors induce by Moloney sarcoma virus. J. Exp Med 139:1473-1487.
- 22.- Hayry, P. et al 1970: Inhibition of phytohemagglutinin and alloantigen-induced lymphocyte stimulation by Rauscher Leukemia virus. J. Natl. Cancer Inst: 44:1311.
- 23.- Sharma, et al 1978: Tumor cell killing by macrophages activated in vitro with limphocyte mediator. Cell Immunol 37: 20-30
- 24.- Gorcynski, R. 1974: Immunity to murine sarcoma virus inc - ced tumors. Journal of Immunol. 12: 1826.
- 25.- Gillespie, Y., Rusell, S. 1978: Development and persistence of cytolytic T limphocytes in regressing or progressing Moloney sarcomas. Inst. J. Cancer 21: 94-99.
- 26.- Elgert, K. et al 1978: Macrophage regulation of the T-cell allogeneic response durig tumor growth. Cell Immunol 35:14.
- 27.- Parajpe, et al 1974 Int J Cancer 8: 179.
- 28.- Bhatnagar, et al 1975 J Exp. Med. 142: 839.
- 29.- Jurin, M. 1974 Cancer Res. 34: 672.
- 30.- Helden, H. Kirchner, J. 1976 J. Immunol. 117:646.
- 31.- Veit, B., Feldman, J. 1976 J Immunol. 117: 646
- 32.- Ferabach, B. Kirchner, H. 1976 Transplantation 21: 381.
- 33.- Argyris, B. et. al 1977 Immunologic unresponsiveness of mouse spleen sensitized to allogeneic tumors. Cell Immunol. 2*:390
- 34.- Argyris, B. 1978 Suppressor cells in the spleen of tumor allosensitized mice. Cancer Re. 37: 3390.
- 35.- Bonnard, G. et al 1976 Immunosuppressive activity of a sublume of the mouse E1-4 lymphoma. J. Exnl. Med. 143: 204
- 36.- Hellstrom, K. et al 1976 Suppression of mixed lymphocyte reactions by alloantigen-activated spleen-localizing thy-

cocytes. Cell Immunol. 22: 358.

- 38.- Takei, et al 1976 In vitro induction of cytotoxicity against syngenic mastocystoma and its suppression by spleen and thymus cells from tumor-bearing mice. J Immunol. 116: 288.
- 39.- Wybran, J. et al 1974: Cytotoxicity of human rosette-forming blood lymphocytes on coltivated human tumor cells. Inst. Cancer 13: 515.
- 40.- Dean, J. et al 1974 Functional activies of rosette separated human periphereal blood leukocytes. J Immunol 115: 1149
- 41.- West, et al 1977 Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: Characterization of effector cell. J Immunol. 118: 355
- 42.- Kaplan, et al 1978: Expression of human T lymphocytes antigens by natural killer cells. J Natl Cancer Inst. 80: 861.
- 43.- Moretta., L et al 1977: Funcional analysis of two human T-cell subpopulations: Help and suppression of B-cell responses by T-cell bearing receptor form TgM or IgG. Exp. Med. 146: 184-200.
- 44.- Plata, F. and Jongeneel, V 1978: Characterization of effector lymphocytes associated with immunity to murine sarcoma virus (MSV) induce tumors. Journal of Immunol. 110: 629.
- 45.- Plata, F. et al 1975 Primary and secondary in vitro generation of cytolytic T lymphocytes in the mirine sarcoma virus system. Eur. J. Immunol. 5: 227.
- 46.- Hodes, R., and Hathocook, S., 1974: In vitro generation of suppressor T-cell factor in the regulation of a body response of the mouse. J. Immunol. 116: 167.
- 47.- Taniguchi, M. et al 1976: Properties of antigen-specific suppressive T-cell factor in the regulation of a body response of the mouse. J Ex Med 1444
- 48.- Takei, F., Levy., et. al 1978: Characterization of a soluble factor that specifically suppresses the in vitro generation of cell cytotoxic for syngenei tumor cell in mice. Jorunal of Immunol 120: 1218-1224.
- 49.- Elgert., K. and Farrar, W. 1978: Suppressor cell activity in tumor-bearing mice. Journal of Immunol. 120: 1345-1353.

- 50.- Rudcynski, A., and Mortensen, R. 1978: Suppressor of cells in mice with murine mammary tumor virus-induced mammary tumors. Inhibition of mammary tumors. Inhibitions of mitogen-induced lymphocyte stimulation. J Natl Cancer Inst. 60: 205-211.
- 51.- Felch, et al 1973: Regulation of lymphocyte responses in vitro . Suppressor activity of adherent and nonadherent lymphoid cell. Cell Immunol 9: 12-30.
- 52.- Fujimoto, S. et al 1978 Cellular interaction between cytotoxic and suppressor cells against syngeneic tumors in the mouse. Cell Immunol 38: 378-387.
- 53.- Parr, I. et al 1978: Selective mobilization of specifically cytotoxic T-lymphocytes at sites of inflammation in relation to BCG-induced. J Natl Cancer Inst 59: 1666.
- 54.- McDonald et al 1978 Effector of hyperthermia in the functional activity of cytotoxic T-lymphocytes. J Natl Cancer Inst. 59: 1263-1267.
- 55.- Schechter, B., and Feldman, M. 1978 Hydrocortisone effects tumor growth by eliminating precursors of suppressor cells.
- 57.- Bodansky, O. 1975 Biochemistry of human Cancer. New York. 37-380.
- 58.- Hirano, T. and Nordin, A. 1976: Cell mediated immune response in vitro J. Immunol. 116-115.
- 59.- Réme, T., Gomard, et al 1978 Specific triggering by concanavalin A of a secondary T killer cell-mediated anti tumor immune response. Cell Immunol 34: 299-309.
- 60.- Sharma, S., and Piessens, W. 1978: Tumor cell killing by macrophages activated in vitro with lymphocyte mediator. Cell Immunol 37: 2030.
- 61.- Turk, J. et al 1972: Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. Immunol 23: 492-501.
- 62.- Bach, et. al 1979: The Mode of action of thymic hormones. Ann Acad. Sci. New York. 332
- 63.- Seminars in Hematology. 1980.