

7 2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

REVISION BIBLIOGRAFICA:

CELULAS ASESINAS
NATURALES (NK)



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JUAN MANUEL CONTRERAS BALCAZAR



TALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

	página
INTRODUCCION -----	1
I.- GENERALIDADES -----	2
a) Características morfológicas -----	2
b) Ontogenia, filogenia, y características de superficie_ de las células NK -----	3
c) Heterogeneidad de las células NK -----	7
II.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL NIVEL DE LA ACTIVIDAD DE LAS_ CELULAS NK -----	12
III.- FUNCIONES ATRIBUIDAS A LAS CELULAS NK -----	20
a) Vigilancia contra las neoplasias -----	20
b) Defensa contra los virus -----	22
c) Regulación hematopoyética e inmune -----	25
d) Defensa contra otros patógenos -----	26
IV.- MECANISMO DE CITOLISIS DE LAS CELULAS NK -----	28
V.- MODULACION Y REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS NK, EN LA SALUD Y LA ENFERMEDAD -----	41
a) Respuesta positiva -----	41
b) Respuesta negativa -----	47
VI.- RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD DE DIFERENTES CELULAS A LA_ CITOTOXICIDAD DE LAS CELULAS NK -----	50
VII.- CELULAS NK EN PROCESOS PATOLOGICOS -----	53
a) En el cáncer -----	53
b) En la anemia hemolítica autoinmune idiopática ----	54
c) En los padecimientos inmunodeficientes -----	55
d) En pacientes con gastritis crónica -----	56
e) En pacientes con tuberculosis y en pacientes con pneumo nía -----	56
f) En la infartación aguda miocárdica -----	56
g) En el lupus eritematoso sistémico -----	57
h) En pacientes con epidermólisis bulosa -----	57
VIII.-METODOS DE LABORATORIO PARA ESTUDIAR LAS CELULAS NK -	59
IX.- CONCLUSIONES -----	63

Abreviaturas empleadas en este trabajo:

ADCC	=	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
Ad2	=	adenovirus del tipo 2.
CHS	=	síndrome de Chédiak-Higashi.
EB	=	epidermólisis bulosa.
EBV	=	virus Epstein-Barr.
FcγR	=	receptor para la porción Fc de la IgG.
FNT	=	factor de necrosis del tumor.
HL-A	=	locus de histocompatibilidad humana A.
HSV-1	=	virus del herpes simple del tipo 1.
HSV-2	=	virus del herpes simple del tipo 2.
IAHA	=	anemia hemolítica autoinmune idiopática.
IFN	=	interferón.
IFNL- α	=	interferón recombinante A de leucocitos.
IL2	=	interleucina-2.
i.p.	=	intraperitoneal.
LAF	=	factor activador de linfocitos.
LCMV	=	virus de la coriomeningitis linfocítica.
LGL	=	linfocitos granulares grandes.
LP	=	pirógeno leucocítico.
MCMV	=	citomegalovirus del ratón.
MHV	=	virus de la hepatitis del ratón.
NDV	=	virus de la enfermedad de Newcastle.
NKCF	=	factor citotóxico de las células NK.
PG	=	prostaglandina.
poli I:C	=	ácido polinosínico-policitídílico.
SIDA	=	síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
SRBC	=	eritrocitos de carnero.

INTRODUCCION

La lisis de células de tumor in vitro por células linfoides no inmunes, inicialmente visto como una "circunstancia rodeante" fastidiosa en el estudio de la inmunidad celular contra el cáncer, ha pasado a ser actualmente el asunto principal de investigaciones extensas y numerosas. El fenómeno se ha referido como citotoxicidad natural, y las células que median el fenómeno son llamadas células NK ("Natural Killer"). Existe un interés creciente respecto a las células NK, a causa de su amplia reactividad contra una variedad de blancos celulares normales y blancos celulares tumorales y su posible papel en los mecanismos de defensa del hospedero. En vista de esto, para tener un entendimiento más amplio y claro del posible papel de las células NK en los mecanismos defensivos del hospedero, es pertinente hacer una reseña de algunos hallazgos interesantes hechos en los análisis de la década reciente. Hacia este fin, se ha hecho una recopilación de artículos diversos sobre el tema, un estudio minucioso de cada uno de ellos, y una integración de las principales ideas para dar forma a un trabajo. El resultado es el presente reporte que nos ayuda a tener una visión más amplia y clara de la citotoxicidad natural, las células NK, y el posible papel de éstas en los mecanismos de defensa del hospedero.

1- GENERALIDADES-

Las células NK fueron identificadas originalmente por su citotoxicidad, sin una sensibilización previa conocida, hacia líneas celulares neoplásicas in vitro. Su actividad fue descrita primeramente en la mitad de los años setentas, y desde ese tiempo estas células efectoras citotóxicas han sido estudiadas extensamente.

Las células NK no son adherentes ni fagocíticas (153) y han sido definidas como células efectoras diferentes a los macrófagos, las células T, y las células B, capaces de reconocer y matar, sin una sensibilización previa, células blanco in vitro (111).

La citotoxicidad de las células NK no muestra una restricción importante de histocompatibilidad porque puede ser dirigida a células blanco singénicas, alogénicas, y aún xenogénicas (122). Esta citotoxicidad es dependiente de la temperatura (73, 192) y pudiera además ser dependiente de su continua exposición a la interleucina-2 (IL2) ó factor de crecimiento celular T (TCGF) (43).

a) Características morfológicas.

En el ratón (86, 104), la rata, y el humano, diversos reportes han mostrado claramente que una pequeña, pero distinta, subpoblación de linfocitos media la citotoxicidad natural. Estas células son linfocitos granulares grandes (LGL) (150) y pudieran representar solamente del 2 al 6% de las células blancas de la sangre periférica (134). Además, se ha calculado que aproximadamente el 80% de los LGL de la sangre periférica humana tienen citotoxicidad natural potencial (178).

Se ha observado que los LGL tienen citoplasma relativamente abundan

te con gránulos azurófilos y núcleo arriñonado (84, 104) o redondeado (84).

Además, en microscopía electrónica (FIG. 1), los LGL de humano muestran microvellosidades cortas en cantidad moderada en la superficie celular, prominente aparato de Golgi (31), nucléolo pequeño, citoplasma rico en mitocondrias, pequeñas vacuolas, vesículas, e hilos cortos de retículo endoplásmico rugoso. En particular, estas células están caracterizadas por gránulos de alta densidad electrónica encerrados por una membrana y algunas veces compuestos de un corazón de alta densidad electrónica y un material granular circunvecino. También, los LGL contienen estructuras tubulares acomodadas en un orden paralelo, las cuales pueden estar combinadas con los gránulos de alta densidad electrónica. Así, unas de las diferencias de los LGL con otras subclases de células linfáticas y con las células mielomonocíticas son las inclusiones citoplásmicas de los gránulos y las estructuras tubulares (84).

b) Ontogenia, filogenia, y características de superficie de las células NK.

Las células NK son derivadas de la médula ósea, y pudieran ser dependientes de ella; así, el microambiente de la médula ósea pudiera ser esencial para la generación de células NK funcionales o "activas" (121). También, se ha encontrado que las células NK de la médula ósea femoral y el bazo, en el ratón, pertenecen a una población formada recientemente, de renovación rápida. Un tiempo aproximado de 20.5 hrs. en el bazo y de 10.5 hrs. en la médula es necesario para el paso de las precursoras de NK a células NK funcionales en estos órganos, de donde ellas salen al a-

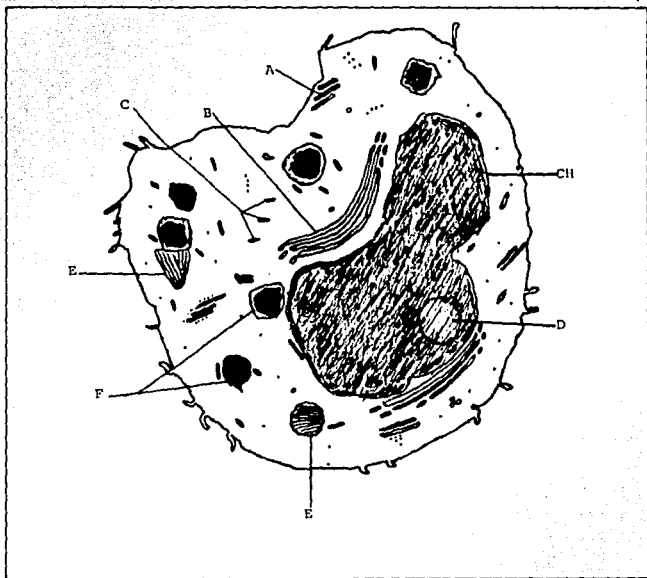


FIG. 1. LGL, características morfológicas:

A = retículo endoplásmico rugoso

B = aparato de Golgi

C = mitocondrias

CH= núcleo

D = nucléolo

E = estructuras tubulares acomodadas en orden paralelo

F = gránulos

zar y rápido. Dado que las evidencias sugieren que las células NK se producen en la médula ósea y se diseminan al bazo, en éste, el período de 20.5 hrs. necesario para el paso de las precursoras de NK a células NK funcionales, también incluye el tiempo pasado fuera del bazo, esto es, en la médula (122). La etapa de maduración de las células NK del ratón pudiera estar unida a la expresión del antígeno Thy-1 sobre estas células (85).

Las células NK no son dependientes del timo (51, 122), no presentan inmunoglobulinas de superficie (Ig^s) (125) ni receptores para el fragmento C3b del tercer componente del complemento (C3b^r) (177); pero, las células NK humanas pudieran poseer receptores para la porción Fc de la IgG (Fc_γR) monomérica citofílica (171), y poseen receptores, que pudieran ser iguales a los expresados por los leucocitos polimorfonucleares, para la porción Fc de la IgG funcional (140). También, algunas de las células NK de humano presentan una baja afinidad para formar rosetas con eritrocitos de carnero (SRBC) (rosetas E) (84, 169), lo cual es una propiedad de las células T.

Ya que la población de los LGL expresa una combinación desusual de antígenos sobre su superficie, no está claro el camino de diferenciación el cual da origen a las células NK (135, 152).

Así, las células NK expresan antígenos de células T definidos por anticuerpos monoclonales (29, 135, 139, 200). Algunos de estos antígenos son encontrados sobre las células T citotóxicas (29, 139, 200). Y, por otra parte, se ha demostrado que algunas clonas de linfocitos T citotóxicos de ratón poseen los antígenos NK-1.1 y NK-2.1 (antígenos asociados

con NK), mientras que otras sólo el NK-2.1 (21), y que las células efectoras NK, las precursoras de las células efectoras semejantes a NK inducidas por lectina, y las precursoras de las células efectoras citotóxicas aloespecíficas humanas, comparten la expresión del antígeno detectado por el anticuerpo monoclonal anti células NK llamado NK-9. Esto podría implicar un origen común de estos tipos de células efectoras citotóxicas, y aún, el mismo linaje celular pudiera estar involucrado a una etapa diferente de diferenciación (131).

Además, en un estudio (63) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de origen celular T, fue demostrado que sus blastos leucémicos T, obtenidos de la médula ósea y enriquecidos por la técnica de formación de rosetas con SRBC, presentan actividad citotóxica natural. Estos hallazgos apoyan adicionalmente la hipótesis de que las células del linaje celular T son las efectoras de la citotoxicidad natural.

Sin embargo, también las células NK expresan antígenos sobre su superficie restringidos generalmente al linaje mielomonocítico (79, 135), y se ha demostrado la presencia de la actividad de la Naftol-AS-D cloroacetato esterasa (NCAE) en las células NK humanas, la cual está presente principalmente en las células mieloides. Estos hallazgos sugieren que las células NK pudieran ser derivadas de un antecesor celular común mielomonocítico (72).

También, se ha supuesto un linaje celular independiente para las células NK humanas. Se han descrito varios anticuerpos monoclonales que reaccionan más o menos específicamente con éstas células. El HNK-1 (Leu7) es el anticuerpo usado más ampliamente, y se ha asignado al cromosoma

soma 11 el gene que codifica para el antígeno reconocido por este anticuerpo (162). El H25 y el H366, que reaccionaron con todas las líneas celulares T probadas, y con células linfoides Fc γ R⁺ que contuvieron toda la actividad de NK presente en la sangre; alrededor del 10% de los linfocitos formadores de rosetas E, y una proporción de monocitos, fueron también reactivos (11). El N901, que reconoce un antígeno que pudiera estar presente sobre la mayoría de las células NK y algunas células mieloides leucémicas; algunas clonas celulares T sin actividad de NK pudieron también expresar, al menos, niveles bajos del antígeno (59). El NK-9, que reconoce prácticamente a todos los LGL (131). Y el NK-8, que reacciona con una cantidad menor de LGL que el anticuerpo NK-9 (130, 131). En especificidad, ninguno de estos anticuerpos está limitado exclusivamente a las células NK, y, así, deja sin contestar la pregunta del origen de los LGL de humano.

c) Heterogeneidad de las células NK.

i) Relación entre las células NK y las células K.

Diferentes tipos de células efectoras están involucradas en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC): macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, y células linfoides no adherentes ni fagocíticas denominadas células K ("Killer").

En el hombre y en los animales, algunos resultados habían indicado que las células K, como las células NK, pueden residir en la población de LGL, y aún las mismas células efectoras pudieran mediar la citotoxicidad natural y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Después, en un estudio (17), se observó que una célula efectora particular puede en-

lazarse simultáneamente a un blanco de NK y a uno de ADCC, así como lizar a ambos blancos. Los resultados de este estudio dan evidencia directa de que al menos un cierto porcentaje de los linfocitos de humano tienen el potencial y la capacidad para llevar a cabo funciones de NK y K. En este reporte, no fue excluida la posibilidad de que existan células efectoras distintas con la capacidad para llevar a cabo solamente la citotoxicidad natural o la ADCC.

Por otro lado, se ha demostrado que un polinucleótido sintético inductor del interferón (IPN), el ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C), ejerce sobre la actividad citotóxica de las células NK un efecto que no se correlaciona con el efecto de este ácido sobre la actividad citotóxica de las células K humanas. En este estudio, se sugirió que mecanismos biológicos distintos pueden estar involucrados en la regulación y expresión de la activación celular NK y K por el IPN (44).

ii) Subgrupos de células NK.

En el humano (107, 208) y ratón, estudios han demostrado que las células NK son heterogéneas en términos de sus antígenos de superficie celular definidos por anticuerpos, pudiéndose revelar subgrupos celulares.

Así, en el humano, se ha mostrado que subgrupos celulares NK diferentes pueden lizar las células K562 (K562, una línea de eritroleucemia humana HL-A⁻), que son sensitivas a las células NK (107, 208). También, en el bazo del ratón, sobre la base de la expresión del aloantígeno NK-1.2, que es específico de las células NK, pueden ser detectadas células NK de dos tipos: aquellas que lo expresan y lisan preferencialmente blancos de tumor linfoide, denominadas NK_A, y aquellas que no lo expre -

san y lisan preferencialmente blancos de tumor no linfoide, denominadas NK_B (28). Algunos resultados sugieren que las células del bazo del ratón con actividad elevada de NK (aumentada in vivo) expresan este antígeno en una extensión mucho menor que las células sin actividad elevada (105).

En la rata, se ha sugerido que las células NK activas contra las células de tumor no linfoide, y las células NK activas contra las células de tumor linfoide, son probablemente idénticas (22). Sin embargo, en el ratón, la evidencia parece diferenciar las células NK que matan las células de tumor linfoide, de aquéllas que lisan las células de tumor no linfoide. Para estas células NK se ha propuesto el término de células NC ("Natural Citotoxic"), y se ha mostrado que el mecanismo usado por las células NC, para lisar blancos, es fundamentalmente diferente de aquél usado por los linfocitos T citotóxicos (137).

En general, los linfocitos normales y los fibroblastos normales son resistentes a la lisis mediada por las células NK y a la lisis mediada por las células NC. Sin embargo, se ha propuesto que un fibroblasto asocia con su transformación la pérdida de la resistencia a las células NC, pero no la pérdida de la resistencia a las células NK, permaneciendo resistente a las células NK; mientras que un linfocito asocia su transformación con la pérdida de la resistencia a las células NK, pero no la pérdida de la resistencia a las células NC, permaneciendo resistente a éstas. Esto provee la base para la especificidad del blanco exhibida por las células efectoras NK y las células efectoras NC (110).

En la actividad de las células NK del humano, las células efectoras

contra los fibroblastos de humano infectados con el virus del herpes simple del tipo 1 (HSV-1) y las células efectoras contra las células blanco K562 no son exactamente las mismas, ya que ellas pueden ser diferenciadas por sus antígenos de superficie y por las estructuras blanco que reconocen. Y, algunos pacientes tienen la actividad de las células NK normal contra uno de los dos blancos anteriores (K562 ó los fibroblastos infectados con el HSV-1), pero tienen esta actividad baja o nula contra el otro, siendo esto una evidencia fuerte que demuestra que las células NK del humano son heterogéneas, y que las subpoblaciones de estas células pueden estar reguladas independientemente cada una de la otra in vivo (49).

Existen datos que apoyan la hipótesis de que la heterogeneidad de la entera población de las células NK es atribuible, al menos en parte, a una mezcla de clonas que varían importantemente en sus especificidades del blanco y sus fenotipos (8).

También, se ha investigado el aspecto ultraestructural de 3 subpoblaciones de las células NK humanas: las células $Leu7^+ 11^-$, $Leu7^+ 11^+$, y $Leu7^- 11^+$. Estos subgrupos muestran diferente aspecto ultraestructural. De hecho, las células $Leu7^+ 11^+$, coexpresando o no el antígeno HNK-1, muestran una relación nuclear/citoplásmica baja, un núcleo de forma irregular, un citoplasma conteniendo muchas mitocondrias, un aparato de Golgi bien desarrollado, vesículas, vacuolas, muchos gránulos de alta densidad electrónica, y una superficie irregular de la célula. Por otra parte, las células $Leu7^+ 11^-$ muestran una relación nuclear/citoplásmica alta, un citoplasma con pocos organelos, y una superficie bastante uniforme. A

demás, parte de ellas carecen de gránulos de alta densidad electrónica _

(119)

II- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL NIVEL DE LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS NK-

Un gran número de LGL parece que se encuentra no solamente en los órganos linfáticos, sino que también en el epitelio de varios tejidos (191).

Los leucocitos de la sangre periférica y las células del bazo de humanos ejercen niveles similares de actividad de las células NK, en contraste a las células de ganglios linfáticos, las cuales son pobrementecitotóxicas (156).

Varios resultados indican que en los ganglios linfáticos, amígdalas, adenoides y bazo de humanos, las células NK pudieran tener un patrón de localización particular donde ellas son encontradas en los centros germinativos de los folículos secundarios (167). Y, en los centros germinativos de los folículos linfáticos de los ganglios linfáticos y los bazos, ha sido demostrada la presencia de un subgrupo especial de los linfocitos T caracterizado por la reactividad con los anticuerpos siguientes: el OKT11, OKT1, OKT3, OKT4 y Leu7; siendo la diferencia principal con otros linfocitos T periféricos, la reactividad con el anticuerpo Leu7 (hasta este estudio, se pensaba que el anticuerpo Leu7 era específico para linfocitos conteniendo gránulos azurófilos y exhibiendo citotoxicidad natural, y se había indicado solamente un traslape ligero con poblaciones de linfocito OKT3 y OKT8 positivo) (143).

En las células mononucleares del intestino humano, se ha encontrado que la citotoxicidad espontánea mediada por células está marcadamente deficiente, y la proporción de las células NK pudiera ser considerablemente más baja que en las células mononucleares de la sangre periférica.

Así que la diferencia funcional aparente entre células similares derivadas de sitios diferentes pudiera estar grandemente relacionada a proporciones distintas de las células efectoras (56). Se ha encontrado también que los monocitos, las células mieloides y las células NK, son excluidos de la linfa del ducto torácico; mientras que las células T recirculan (52).

Por otro lado, en la sangre periférica y el bazo de ratones se detecta una actividad alta de las células NK, pero los ganglios linfáticos y el timo son bajos o ausentes en actividad de las células NK (86). Las células NK del bazo de estos animales pudieran tener un fenotipo de su superficie más heterogéneo que el de las células NK tímicas (209).

Se ha encontrado también que las suspensiones celulares de los pulmones y del bazo de ratones muestran niveles comparables de actividad de las células NK; y aunque los datos indican que las células NK en el pulmón y bazo son similares en el fenotipo antigénico y la preferencia del blanco, parece ser un sitio pulmonar de células de la resistencia natural cuya función puede ser modulada localmente (170).

Además de ser dependiente del tejido, se ha observado que los niveles de la actividad de las células NK están bajo el control genético, el hormonal, y el control de la edad.

De acuerdo con esto, el desarrollo de la actividad de las células NK en el humano ocurre durante la vida intrauterina, encontrándose que los fetos son capaces de mostrar actividad citotóxica de las células NK. La actividad de las células NK de los linfocitos del cordón umbilical de los infantes prematuros es más baja que la de las células NK de los lin-

focitos del cordón umbilical de los infantes de término completo (186), y se ha observado que existe una correlación positiva, que es débil, entre la edad y la actividad de las células NK. Existe además una diferencia definitiva en la función de las células NK entre los hombres y las mujeres, aquéllos teniendo una actividad de las células NK ligeramente más alta que la de las células NK de las mujeres, diferencia que se extiende desde los neonatos hasta los adultos. Y se han confirmado observaciones de que un nivel de la actividad de las células NK de un individuo es una propiedad relativamente consistente de los linfocitos de esa persona, y que uno puede esperar, aún en un término de varios años, que un nivel alto de la actividad de las células NK de un donador continuará siendo alto cuando se compara con los de la actividad de las células NK de un grupo de otros donadores normales (144).

En humanos, la presencia de la actividad de las células NK en la sangre neonatal, su aumento ligero, pero significativo, con la edad, y su nivel relativamente constante en la edad adulta, están en contraste con el patrón visto en ratones, donde, la actividad está virtualmente ausente al nacimiento, tiene un pico desde la octava semana hasta la doceava semana, y declina entonces (144).

Algunos datos muestran que las células NK-1.1⁺ son detectables tempranamente en los tejidos hematopoyéticos de los ratones fetales, y que la cantidad de las células NK-1.1⁺ del bazo de los ratones recién nacidos, de 1 a 2 semanas de edad, y adultos con actividad baja de las células NK, es alta, semejante a aquélla de los ratones jóvenes adultos con actividad alta de las células NK. Las células NK-1.1⁺ de los ratones de

1 a 2 semanas de edad son capaces de enlazarse a blancos sensitivos a las células NK, pero no de lisarlos, y por tanto se detecta una actividad de las células NK virtualmente no existente, sugiriéndose que estas células NK-1,1⁺ son inmaduras en relación a su función lítica (101).

Se ha encontrado también que la velocidad de la destrucción de las células blanco mediada por las células NK del bazo de los ratones adultos con actividad baja de las células NK, es apreciablemente más lenta que la mediada por las células NK del bazo de los ratones jóvenes con actividad alta de las células NK. Ya que la frecuencia de los tumores y las infecciones aumenta marcadamente en las poblaciones adultas, los resultados de este estudio indican que la eficiencia funcional de las células NK de los ratones adultos está deteriorada, y, en parte, este defecto pudiera dar cuenta de la capacidad reducida de los individuos mayores de edad para resistir a los microorganismos patogénicos y a ciertos tipos de cáncer (6).

En el ratón, se sabe que los niveles de la actividad de las células NK están bajo el control genético.

De acuerdo con esto, los ratones de la cepa SM/J tienen una hiperactividad de las células NK. Esta hiperactividad pudiera ser debida a la presencia de una subclase de las células NK: las células NK-1⁺, Qa5⁻; y pudiera no estar bajo el control del gen H-2, sino bajo un control poligénico (34).

Los ratones de la cepa SJL y los ratones de la cepa C57BL/6J-bg^j bg/bg tienen un nivel relativamente bajo (90) y una falta casi total (183) de actividad de las células NK, respectivamente. En los ratones

SJL, se ha provisto evidencia de la selectividad de los defectos en la citotoxicidad de NK contra los blancos de linfoma; defecto observado particularmente en la respuesta al IFN o los inductores del IFN, los cuales se conoce que aumentan la actividad de NK en algunas otras cepas de ratones con niveles bajos de actividad de NK (90).

Se ha mostrado también que la restricción alimentaria influye sobre la actividad de las células NK en los ratones.

De conformidad con esto, en ratones alimentados con una dieta deficiente en tirosina y fenilalanina, disminuye la actividad de las células NK; pero la deficiencia en metionina aumenta la actividad de las células NK. Además, los niveles de la citotoxicidad mediada por las células NK en los ratones alimentados con una dieta no deficiente en los aminoácidos, con la dieta deficiente en tirosina y fenilalanina, y con la dieta deficiente en metionina, no son influenciados por el consumo moderado del alcohol en las dietas. Estos datos sugieren que los cambios frecuentemente observados en la función inmune de los alcohólicos, pudieran estar unidos más estrechamente a la dieta y el status nutricional, que a los efectos directos del alcohol ingerido (2).

Además, los ratones con una alimentación deficiente en calorías, comparados con ratones de su misma edad alimentados con una dieta normal, muestran un aumento en la generación in vitro de linfocitos T citotóxicos; una actividad menor de las células NK; y, especialmente en los ratones de mayor edad, un incremento relativamente más alto en la actividad de las células NK inducida in vivo por un agente inductor de IFN. Dado que se ha observado que los roedores sujetos a una dieta restringida

(sin desnutrición) viven más y desarrollan menos tumores espontáneos frecuentemente en la vida tardía que los controles con una dieta no restringida, los resultados de este estudio sugieren que los ratones con la dieta restringida pudieran resistir mejor al cáncer por un sistema de NK muy sensible a señales de inducción unido a un sistema de linfocitos T citotóxicos más efectivo que aquél de los controles no restringidos (195).

En las ratas, aunque no se ha observado una diferencia estadística en la función de las células NK entre los animales deficientes en selenio y los animales control (142), la actividad de las células NK del bazo y la producción del IFN por los macrófagos están disminuidas en los animales deficientes en hierro; la baja producción del IFN causando la actividad deteriorada de las células NK (66).

Por otra parte, un metabolito fúngico, la toxina T-2, se ha dado en la dieta a los ratones, y esto ha conducido a una actividad baja de sus células NK. Además, este efecto supresor de la toxina T-2 sobre la actividad de las células NK puede persistir aún después de 14 días de exposición a una dieta libre de toxina (24).

Se ha demostrado también que la actividad de las células NK del bazo de los ratones está reducida después de la exposición de estos animales al estrés (tensión). Está bien documentado que el estrés afecta a otras partes del sistema inmune, y tales cambios pudieran explicar las observaciones de la baja resistencia al cáncer en los animales estresados; sin embargo, el efecto reportado del estrés sobre el sistema de las células NK indica un mecanismo adicional por medio del cual el estrés pudie-

ra cambiar la susceptibilidad al cáncer suprimiendo el sistema de defensa del hospedero (1).

En los humanos, se ha encontrado que los acontecimientos de la vida influyen en las respuestas inmunológicas. Así, en un reporte (207) se describe el comportamiento de 5 pacientes con cáncer dentro de un período de 6 meses de aficción. Los pacientes que fueron capaces de hacer frente a su situación mental (evaluado con cuestionarios) no cambiaron drásticamente los parámetros inmunes mensurables. Sin embargo, en los pacientes severamente deprimidos, la actividad de las células NK y el número de los receptores para la IL2 sobre la superficie de los linfocitos periféricos disminuyeron. Además, estos pacientes murieron durante el período de observación.

Por otro lado, la actividad y el número de las células NK parecen ser aumentados en los humanos por el ejercicio, lo cual pudiera resultar en una mejor resistencia contra las enfermedades infecciosas (48, 138). En contraste, se ha indicado que el fumar cigarrillo está asociado con una disminución en el número y la proporción de células NK circulantes, que este efecto está presente muchos años después del cese del fumar, y que el fumar reduce la actividad de las células NK en el fluido del lavado bronquioalveolar. Este déficit cuantitativo de las células NK y la baja actividad de las células NK en el fluido del lavado bronquioalveolar pudieran contribuir a la incidencia aumentada de infección y malignidad en los fumadores (172, 182).

La exposición a la radiación ultravioleta ha sido implicada en la predisposición a ciertas neoplasias, y conduce a la reactivación viral.

Se ha reportado que los linfocitos humanos de la sangre periférica, que fueron expuestos in vitro a la radiación ultravioleta, muestran una inhibición de la actividad de las células NK, actividad que es independiente de la proliferación; y que la sensibilidad máxima para la actividad de las células NK, es encontrada en una longitud de onda de 260nm, longitud en que absorben el ácido nucleico (DNA y RNA) y las proteínas celulares. En base a esto, durante la exposición en ciertas condiciones a la luz del sol se pudiera proveer radiación suficiente para inhibir in vivo la actividad de las células NK (160).

III- FUNCIONES ATRIBUIDAS A LAS CELULAS NK-

Las células NK pudieran jugar no solamente un papel importante en la primera línea de defensa (antes del desarrollo de las respuestas inmunes específicas) contra tumores, sino que también contra los patógenos extraños (123, 153, 191).

a) Vigilancia contra las neoplasias.

Se ha notado frecuentemente que existe la necesidad de preparar a los ratones hospederos con pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano), antes de la transferencia i.p. de los plasmocitomas. Ya que la inyección del pristano en los ratones conduce a una disminución de la respuesta proliferativa de las células T y las células B a los mitógenos y a una actividad baja de las células NK, esto último pudiera ser suficiente para permitir que los tumores transplantados crezcan sin la interferencia inmunológica del hospedero (53).

La inhibición selectiva de la citotoxicidad mediada por las células NK en los ratones pudiera estar asociada con un aumento en la metástasis espontánea, donde las células subcutáneamente implantadas de un tumor no linfóide crecen localmente y se diseminan, y se cuantifica la incidencia y el número de las colonias del tumor en los pulmones de los hospederos; y con un aumento en la metástasis experimental, donde las células intravenosamente inoculadas del tumor se diseminan, y se cuantifica la incidencia y el número de las colonias del tumor en los pulmones de los hospederos (68). Observaciones como éstas, y resultados de otros estudios con ratones (67) y ratas (12), sirven para dar apoyo a la hipótesis del papel principal de las células NK del hospedero en la resistencia natu -

ral a la diseminación hematógica del tumor.

Además, el tratamiento de ciertos linfomas con IFN reduce su sensibilidad lítica a las células NK, observándose un retardo en la eliminación de los tumores al ser inyectados en los ratones (58).

Las células mononucleares de la sangre periférica de pacientes con leucemia de tipos diferentes muestran una actividad de las células NK baja (112). Además, los datos de un estudio de pacientes con leucemia aguda en remisión completa sugieren un déficit de linfocitos, el cual persiste por algún tiempo, al alcanzar la remisión, déficit que pudiera ser debido a la quimioterapia usada para inducir la disminución de la intensidad de los síntomas de la enfermedad; una recuperación gradual de la actividad de las células NK a lo largo del curso de la remisión; y quizás una disminución en la actividad de las células NK entre los pacientes que recaerán subsiguientemente (173). De esto, la actividad baja de las células NK de los pacientes leucémicos pudiera reflejar una anomalía de estas células, la cual sería la razón fundamental de la leucemia (112).

Por otra parte, ratones inmunosuprimidos por agentes citostáticos, a los que se les administran células leucémicas, mueren en pocos días; sin embargo, el tiempo de supervivencia puede ser aumentado si el agente citostático se les administra conjuntamente con timosina antes de la inoculación de las células leucémicas. Resultados adicionales sugieren que el daño causado a las células NK por el tratamiento con el agente citostático da cuenta al menos parcialmente de la muerte rápida, y que la timosina ejerce al menos en parte una actividad preventiva contra la

progresión de las leucemias por medio de un efecto sobre las células NK o sus células progenitoras (188).

b) Defensa contra los virus.

Se ha observado que la infección de ratones con virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) (grupo arenavirus) (13, 25, 26), citomegalovirus del ratón (MCMV) (grupo herpesvirus) (26, 61), virus de la hepatitis del ratón (MHV) (grupo coronavirus), virus vaccinia (grupo poxvirus) (26), y virus de la influenza (170), conduce a un aumento de actividad de las células NK.

La velocidad de reemplazo de las células NK en el bazo de los ratones (representando el período de tiempo entre la división de las células precursoras, y el punto en el cual las células mueren o salen del órgano examinado) se eleva importantemente durante la infección aguda con LCMV, este aumento en el reemplazo es acompañado por división de las células NK, y esto resulta en el aumento del número de las células NK (13). Además, ratones infectados en forma aguda por 3 días con LCMV muestran niveles de la citotoxicidad mediada por las células NK y del IFN en plasma más altos que los de los ratones persistentemente infectados con LCMV. En estos últimos, los niveles permanecen elevados continuamente, indicando que la citotoxicidad aumentada mediada por las células NK puede ser mantenida durante períodos prolongados, en la presencia de la estimulación crónica del IFN a nivel bajo (IFN inducido durante la infección viral, el cual activa las células NK) (25).

En ratones que se les administra intravenosamente el anticuerpo anti-asialo GM1 (anticuerpo que parece eliminar selectivamente in vivo las

células NK del ratón) y se les infecta poco después en forma aguda con MCMV, MHV, y virus vaccinia, se ha determinado que existe un aumento de la síntesis viral en bazo e hígado y que las lesiones patológicas en el hígado (grado de hepatitis) se correlacionan con la producción del virus (26).

En el humano, las células NK son probablemente una de las poblaciones celulares más importantes requeridas para la resistencia a infecciones por herpesvirus.

De acuerdo con esto, en ensayos citotóxicos in vitro, se ha encontrado que las células infectadas con HSV-1 son más susceptibles que las células no infectadas a la actividad de las células NK (50); y que las células infectadas con HSV-1 o con virus del herpes simple del tipo 2 (HSV-2) pueden ser lisadas por las células NK autólogas (99, 206).

Los humanos neonatos son excepcionalmente susceptibles a infecciones por herpesvirus (111), y presentan una actividad citotóxica de NK contra células infectadas con HSV-1 normalmente baja (100, 111).

Otros dos grupos excepcionalmente susceptibles a las infecciones por los herpesvirus son los pacientes con el síndrome de Wiskott Aldrich (inmunodeficiencia primaria) y los pacientes con infecciones severas persistentes o recurrentes de herpesvirus, encontrándose que tienen una función de NK baja contra células infectadas con HSV-1. Los pacientes examinados de este último grupo no habían recibido terapia inmunosupresora, no tenían malignidad ni inmunodeficiencia primaria conocida, y fueron probados al tiempo de la infección, sugiriéndose que su respuesta baja no es el resultado de las infecciones y pudiera ser al menos parcialmen-

te responsable de la severidad de las infecciones (111).

En los pacientes con herpes simple genital recurrente, se ha reportado que el número de células NK y la actividad de las células NK contra células infectadas con HSV-2 están disminuidos durante las primeras 24 hrs. del comienzo de las lesiones, aumentan de 5 a 7 días después del comienzo, y no están alterados significativamente en el intervalo entre dos recurrencias (32).

Además, en los pacientes con herpes bucal labial recurrente, se ha encontrado durante la recurrencia una actividad citotóxica espontánea aumentada contra células blanco infectadas con HSV-1, la cual persiste a niveles relativamente altos por varias semanas después; pero disminuye a niveles bajos, durante la última semana antes de que las lesiones herpéticas se presenten de nuevo (154).

También, la actividad de las células NK y los niveles de las células HNK-1⁺ se han determinado en serie en la sangre periférica de algunos niños con síndrome de shock de dengue en su forma hemorrágica, y se ha revelado que durante el curso de la enfermedad, la actividad de las células NK de estos niños no cambia significativamente de los controles normales. En contraste, los niveles de células HNK-1⁺ (las cuales mostraron casi toda la actividad funcional de las células NK) están disminuidos significativamente en la etapa febril y la etapa de shock (primer día y segundo día del apaciguamiento de la fiebre) y están normales en la etapa convaleciente temprana (tercer día y cuarto día del apaciguamiento de la fiebre) y la etapa convaleciente tardía (aproximadamente 14 a 18 días después del apaciguamiento de la fiebre). Además, la actividad

de las células NK, sobre una base por células, está aumentada significativamente en la etapa temprana de la enfermedad cuando se compara con aquella del período tardío de la enfermedad y aquella de los controles normales. Estos resultados sugieren que las células NK son activas en la defensa contra la infección viral de dengue y pudieran jugar un papel en la patogénesis del síndrome de shock de dengue en su forma hemorrágica. Sus funciones pudieran también determinar la severidad de la enfermedad (80).

Y, ya que parece que existe una relación directa entre la oncogénesis in vivo de los fibroblastos transformados por adenovirus del tipo 2 (Ad2) y su resistencia in vitro a las células NK, las células NK pudieran jugar un papel importante en el sistema de la vigilancia inmune del hospedero contra las células transformadas por Ad2 (166).

c) Regulación hematopoyética e inmune.

Está bien establecido que las células NK pueden actuar no solamente sobre las células tumorales y las células viralmente transformadas, sino que pueden actuar también sobre ciertas células normales, incluyendo precursores hematopoyéticos; y, por consiguiente, se ha sugerido que las células NK tienen in vivo un papel regulador de la hematopoyesis (69).

Las células NK inhiben posiblemente in vitro la producción de anticuerpos por las células B linfoblastoides humanas, las cuales aparecen en la circulación 5 a 7 días después de la inmunización con una variedad de antígenos (19). Al respecto, se ha provisto evidencia de que las células B linfoblastoides expresan el receptor para la transferrina, el cual pudiera ser la estructura reconocida por las células NK. El significado

funcional de estas células B activadas es desconocido; sin embargo, dado que las células B linfoblastoides no son células terminales y que se ha demostrado in vitro su diferenciación adicional, estas células pudieran jugar in vivo un papel en el proceso madurativo de las células B (18).

También, es posible que las células NK supriman indirectamente la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B (4, 10, 205), y jueguen in vivo un papel importante en la regulación de las etapas terminales de las respuestas humorales (4, 19).

Por otro lado, usando células B humanas y células NK autólogas altamente purificadas, algunos investigadores han demostrado recientemente que las células NK pueden aumentar substancialmente la respuesta proliferativa de las células B activadas, y otros hallazgos han sugerido que el contacto de la célula NK con la célula B no es un prerequisite para el efecto. Estos estudios han extendido así el repertorio funcional de las células NK para incluir la actividad estimuladora, así como, la actividad supresora y la lítica (91).

d) Defensa contra otros patógenos.

1) Contra los parásitos protozoarios.

Se ha observado también que la inoculación de los ratones con Toxoplasma gondii, esporozoitos de Plasmodium berghei, o con tripomastigotes de Trypanosoma cruzi, conduce a un aumento del nivel de la actividad de sus células NK, lo cual es indicativo de una movilización de esta parte del sistema inmune (70, 71, 132).

Además, se ha demostrado que el Trypanosoma cruzi, que no es rigurosamente específico de un hospedero y es un parásito predominantemente in

tracelular (el cual causa la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas) (7, 70), y los tripomastigotes del Trypanosoma lewisi, que es un parásito extracelular específico de la rata (7), pueden ser destruidos por las células NK del ratón. En contraste, no se ha encontrado evidencia de que las células NK del ratón sean capaces de matar el Trypanosoma muscui, que es un parásito extracelular específico del ratón. Así, los parásitos protozoarios bien adaptados pudieran ser no susceptibles a los mecanismos de la resistencia natural mediada por células de sus hospederos.

En pollos inoculados con Eimeria, los resultados sugieren que las células NK de los linfocitos intraepiteliales intestinales pudieran jugar un papel importante en la defensa del hospedero contra las infecciones por el protozoario intestinal (109).

ii) Contra los hongos.

Algunos datos muestran además que las células NK de los muridos se enlazan al Cryptococcus neoformans e inhiben in vitro su crecimiento (73, 125).

IV- MECANISMO DE CITOLISIS DE LAS CELULAS NK-

Algunos experimentos muestran que la destrucción de células de tumor por las células NK humanas y por las células fagocíticas activadas es mediada por mecanismos diferentes. Mientras que se han encontrado argumentos acerca del papel que juegan los derivados del oxígeno en la destrucción de células de tumor por las células fagocíticas activadas (3), la actividad de las células NK contra las células K562 no es mediada por los productos de un estallido respiratorio, que es una serie coordinada de eventos metabólicos consistiendo del aumento en el consumo del oxígeno y la producción del anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH), y oxígeno particular (O_2) (3, 55).

El estudio, al microscopio electrónico, de la formación de los conjugados de los LGL humanos con las células K562 muestra contactos de dos tipos diferentes: en uno, la célula efectora emite proyecciones o pseudópodos que penetran en las cavidades o formaciones semejantes a agujeros de la superficie de la célula blanco, en el otro tipo, la célula efectora forma una área extensa de contacto con la célula blanco; no se ha determinado si son dos tipos diferentes de enlazamientos o si son subetapas que se dan ambas al realizarse el enlazamiento del efector al blanco. Después de la formación del conjugado, el aparato secretorio de la célula efectora se dirige hacia la célula blanco, y se produce una citólisis aparentemente mediada por secreción. En conjugados involucrando células blanco resistentes a la citólisis, la polarización celular se da en una proporción menor (31). Además, parece probable que la formación del conjugado lítico esté asociada con la formación de una unión de tipo especí

fico que involucra la actina y la vinculina (una proteína que se ha asociado con los sitios de fijación de los microfilamentos a las membranas), de las células efectoras, tal contacto especializado es formado sólo entre las células NK y las células blanco sensitivas. Esta reorganización citoesquelética precede y pudiera ser un prerequisite para la polarización del aparato secretorio y ser responsable de los movimientos requeridos (30).

Algunos resultados muestran que las células NK requieren de los microfilamentos de su citoesqueleto para que ocurra el reciclamiento y movimiento de ellas, y que este reciclamiento y movimiento pueden realizarse sin el ensamble de los microtúbulos. Por otra parte, se ha observado que la inhibición del ensamble de éstos induce una supresión de la actividad citotóxica de las células NK, y parece que esta actividad defectuosa es debida, al menos en parte, a una falla de los linfocitos potencialmente líticos para eliminar las células blanco enlazadas, sugiriéndose que la inhibición de los microtúbulos afecta el evento lítico mismo. Estos resultados apoyan la hipótesis de que para que la citólisis ocurra normalmente, se requiere la secreción de elementos líticos presentes en los gránulos citoplásmicos de las células efectoras (92).

Se ha demostrado también que la actividad citotóxica de las células NK es dependiente de la calmodulina, ya que inhibidores para esta molécula tienen efectos inhibitorios sobre la actividad de dichas células (124). La calmodulina es la principal proteína intracelular enlazante para el calcio la cual modula muchas funciones enzimáticas, además de tener efecto sobre la polimerización de los microtúbulos; y, ya que la ac-

tividad de las células NK pudiera estar asociada con la secreción, parece razonable que esta inhibición sea debida más bien a un efecto sobre los microtúbulos, que a un efecto sobre cualquiera de las funciones enzimáticas hasta aquí estudiadas.

Ciertas observaciones son compatibles con la idea de que las células NK tienen varias enzimas con especificidad diferente de sustrato las cuales pudieran estar involucradas en funciones celulares diferentes, y se ha sugerido que más de una enzima está involucrada en cada una de las actividades de la célula efectora. Al respecto, está claro que la elastasa no juega un papel en la citotoxicidad de las células NK del humano; proteasas de superficie tales como la elastasa pudieran facilitar la migración de las células a través del tejido conectivo, a donde su función efectora ocurre (211). Otra(s) proteasa(s) (82, 146), fosfolipasa(s) y metil transferasa(s) de membrana (146), pudieran estar involucradas más bien en la activación de la membrana de la célula efectora, que como mediadoras de la lisis de las células blanco en la última etapa letal de la actividad citotóxica de las células NK. Las enzimas lisosomales fosfatasa ácida, α -naftil-acetato esterasa (84, 92) y arilsulfatasa (210), que se han encontrado en las células NK humanas, pudieran jugar también un papel en la actividad citotóxica de las células NK (189), sobre todo en la lisis del blanco. La arilsulfatasa pudiera funcionar en la degradación de ésteres sulfato de cerebrósido de la membrana celular blanco, para iniciar el evento lítico (210).

Un factor soluble liberado de células NK estimuladas con lectina (202) o con células de un blanco de NK (46, 203) puede lisar solamente

células blanco sensitivas a NK, y no líneas celulares resistentes a NK. Este factor ha sido definido funcionalmente como "factor citotóxico de las células NK" (NKCF), porque se conoce poco de su naturaleza bioquímica o su relación con otras citotoxinas mejor definidas. El NKCF tiene ciertas semejanzas a las linfoquinas, pero también diferencias. Entre sus características tenemos:

- a) p.m. > 12000,
- b) a 100°C por 15" es inestable (202),
- c) a -20°C es estable (46, 202),
- d) a 60°C por 15" se observa una pérdida parcial de su actividad citotóxica, sugiriendo que el NKCF pudiera contener varios elementos con estabilidad diferente a la temperatura (46), y
- e) su actividad se inhibe con azúcares simples (202).

Por otra parte, se ha sugerido que las células NK recientemente aisladas contienen una cantidad de NKCF preformado activo y que el tratamiento de estas células con IFN causa síntesis de novo de NKCF adicional y/o la activación del NKCF preexistente inactivo. Ya que la evidencia en contrada favorece una participación del NKCF en el mecanismo de la citotoxicidad mediada por las células NK, el aumento de esta actividad citotóxica inducido por IFN pudiera ser dado por un aumento en la síntesis, activación, y/o liberación, del NKCF (204).

El enlazamiento de la célula efectora a la célula blanco es dependiente de Mg^{++} (74, 146). Y, mientras que el enlazamiento de las células NK clonadas de ratón al blanco pudiera ser independiente de la expresión del receptor para la transferrina sobre las células blanco, algunos re -

sultados sugieren fuertemente que el receptor para la transferrina (el cual es una proteína que media la toma celular del hierro) juega un papel en la interacción de las células NK humanas con sus blancos humanos (129). También, se han obtenido resultados que sugieren fuertemente que la glucosilación normal del sitio del reconocimiento sobre células blanco de tumor es necesaria para que, con las proteínas glucosiladas, se consiga el reconocimiento, el enlazamiento y la lisis, por las células NK humanas (5). Otros estudios apoyan que moléculas similares a la molécula C3bi del fragmento C3b del tercer componente del complemento pudieran estar involucradas en el enlazamiento (83).

La liberación del factor citotóxico soluble pudiera dar sólo la explicación de una parte del mecanismo lítico completo, ya que hay evidencias de que ciertos componentes presentes sobre la membrana citoplásmica celular de NK participan también en el proceso lítico. Respecto a esto, las etapas del enlazamiento y la citólisis pudieran ocurrir a través de estructuras estrechamente allegadas o asociadas de la superficie de las células NK (75).

Se ha demostrado que los anticuerpos que reaccionan con la región A de la molécula T-200 sobre las células NK humanas, pero no los que reaccionan con la región B, son capaces de bloquear la lisis mediada por estas células; y, suponiendo que esta molécula atraviesa solamente una vez, la membrana celular, se ha concluido que la región B reside entre la membrana celular y la región A (128). Después de la conjugación celular, la glucoproteína T-200 pudiera tener una participación en una fase del proceso lítico por NK (47); y, otro antígeno de la superficie de la

célula efectora, el cual parece estar asociado con, pero no ser parte de, la molécula T-200, pudiera estar involucrado en la transferencia del NKCF (27, 196).

Hiserodt y colaboradores (77) han sugerido un modelo hipotético de trabajo para el mecanismo de la citotoxicidad natural en el humano (FIG. 2). La primer etapa (indicada como ① sobre la figura) de la reacción de NK se representa como un enlazamiento, dependiente de Mg^{++} , del receptor de NK al antígeno blanco, requiriendo un reconocimiento de unas estructuras de carbohidrato y un sostén proteico. No está claro si otras interacciones celulares y otros receptores de membrana se requieren para disparar la respuesta citolítica; sin embargo, algunos datos sugieren que existen (174).

El enlazamiento al blanco induce una serie de respuestas fisiológicas referidas como "la programación para la lisis". Sin embargo, esta etapa puede ser dividida adicionalmente en una fase temprana de disparo ② (probablemente enzimático) y una fase más larga de la respuesta celular. En la respuesta citolítica, la programación para la lisis es la etapa que depende más de la temperatura, es dependiente críticamente de la presencia del Ca^{++} (74), y puede ser modulada (hacia arriba y hacia abajo) por varios agentes farmacológicos (76, 146).

Durante la fase temprana de disparo de esta respuesta, el Ca^{++} se pudiera enlazar a un sitio extracelular de enlazamiento ②, lo cual permitiría subsiguientemente la hendidura enzimática de un componente del receptor, denominado "la molécula del enfoque lítico" ③. Esta hen

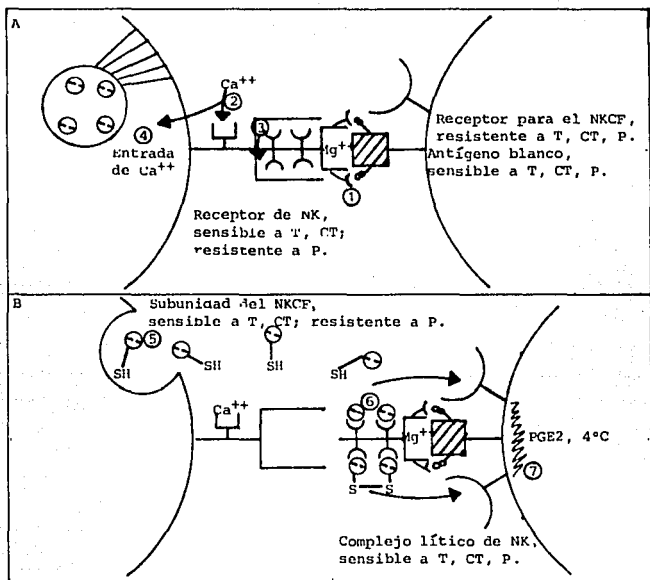


FIG. 2. Modelo hipotético para el mecanismo de la citotoxicidad natural en el humano. ① enlazamiento del receptor de NK al antígeno blanco; ② enlazamiento del Ca⁺⁺ a un sitio extracelular de enlazamiento; ③ hendidura enzimática requerida para la liberación del fragmento del enzima lítico; ④ flujo del Ca⁺⁺ a través de la membrana; ⑤ acoplamiento estímulo-secreción con liberación de subunidades del NKCF; ⑥ polimerización de las subunidades del NKCF en un complejo lítico; ⑦ daño a la membrana de la célula blanco.

T, tripsina; CT, quimotripsina; P, papaína.

(Referencia: 77).

didura permite la transferencia libre del fragmento del enfoque lítico de la célula NK al blanco y expone los sitios receptores de alta avides para las subunidades del NKCF (3) . Este paso de disparo pudiera ocurrir dentro de solo algunos minutos del enlazamiento al blanco. A pesar de la resistencia de las células NK a la inactivación por la papaína, la capacidad de la papaína para bloquear al golpe letal de NK (Tabla I) apoya el concepto de que cierta(s) estructura(s) involucrada(s) en el golpe letal es (son) proteína(s) intracelular(es) y/o proteína(s) escondida(s) en la membrana.

Es posible que la actividad enzimática, necesaria para la etapa temprana de disparo, sea en el sitio bloqueado por ciertos inhibidores de proteasas (82). La existencia de un componente de superficie, derivado de NK e involucrado en el golpe letal, es apoyada por la capacidad del anticuerpo RM2 para inhibir la lisis independiente de la célula citotóxica y para ser removido específicamente por absorción sobre células NK purificadas (75). En este punto de la reacción, un papel para la molécula T-200 se ha sugerido como el receptor/disparador de NK (174).

Los estudios apoyan que, además de ser requeridos en un sitio extracelular de enlazamiento, los iones Ca^{++} deben fluir también hacia el interior de la célula NK a través de canales, obstruidos por bloqueadores de canal, específicos del Ca^{++} (74) (4) . El flujo del Ca^{++} hacia el interior de la célula NK, activa la fase más larga de respuesta celular de la programación para la lisis, un proceso secretorio que culmina con la liberación de subunidades del NKCF, dentro de la fase líquida (5) .

Las subunidades del NKCF, una vez liberadas, son ensambladas enton-

TABLA I

Sensibilidad de varias estructuras involucradas en la citólisis de NK .

Estructura propuesta	Sensibilidad a proteasas		
	T	CT	P
Receptor de NK	+	+	-
Antígeno blanco	+	+	+
NKCF	+	+	-
Receptor para el NKCF	-	-	-
Molécula del enfoque lítico	?	?	+
Golpe letal funcional	+	+	+

T, tripsina

CT, quimotripsina

P, papaína

(Referencia: 77, 78).

ces alrededor del fragmento del enfoque lítico en un complejo lítico de alto p.m., para inducir la lisis rápida del blanco (6). Aquellas subunidades del NKCF no enlazadas directamente en este complejo lítico difunden dentro del sobrenadante, y ellas representan la "actividad del NKCF". El modelo sugiere que la polimerización de las subunidades del NKCF ocurrirá alrededor del fragmento del enfoque a través del enlazamiento disulfuro así como la interacción proteína-proteína, ya que, después de la etapa dependiente del Ca^{++} , la adición de 2-mercaptoetanol a un evento de programación en marcha bloqueará la citólisis (76).

Una vez ensamblado completamente, la actividad del complejo lítico medida funcionalmente por la lisis independiente de la célula citotóxica, puede ser bloqueada por la adición de tripsina, quimotripsina o de papaína, así como por ciertos anticuerpos dirigidos contra las células NK

(75). Esto es un hallazgo importante, porque ni el receptor para el NKCF ni las subunidades del NKCF son sensibles a la papaína (Tabla I). Así, la capacidad de la papaína para inhibir la lisis independiente de la célula citotóxica implica que debe quitar el antígeno blanco al cual el complejo lítico está enlazado o hendir e inactivar el complejo lítico en sitio(s) no relacionado(s) con el NKCF. Respecto a esto, se ha sugerido que la papaína debe afectar estructuras en el complejo lítico no relacionadas con las subunidades del NKCF.

Además, una vez ensamblado sobre la superficie de la célula blanco, el complejo lítico es incorporado entonces en la membrana del blanco por un proceso hasta aquí desconocido. Esto pudiera involucrar el reconocimiento de la subunidad del NKCF por el receptor para el NKCF de la célula blanco. Finalmente, la acción de estas moléculas sobre la célula blanco, para inducir el evento letal final, no es conocida. La capacidad de la temperatura baja (4°C) o de la prostaglandina (PG) E₂ para bloquear la lisis independiente de la célula citotóxica sugiere que el evento letal está ocurriendo, al menos inicialmente, en la membrana del blanco (7) y causa probablemente la ruptura de la célula a través de lisis osmótica coloidal.

Así, la lisis de las células blanco mediada por el NKCF es comparable a la lisis independiente de la célula citotóxica, excepto por la ausencia de la molécula hipotética del enfoque lítico (77).

Aunque estructuralmente distintas a los blancos clásicos de célula tumoral, las células de Cryptococcus neoformans pudieran ser capaces de interacciones similares célula a célula con las células efectoras NK co-

mo los blancos de célula de tumor ya que ciertos datos indican que el enlazamiento de la célula NK de los mûridos al Cryptococcus neoformans es un acontecimiento distinto que precede a la inhibición del crecimiento del criptococo; es independiente de la temperatura, aunque es retardado a 4°C; y es dependiente de Mg^{++} . En contraste con el enlazamiento, la inhibición del crecimiento del criptococo mediada por las células NK es dependiente de la temperatura y el Ca^{++} (73).

En la citólisis mediada por el NKCF, parece haber al menos cuatro subetapas basadas en la modulación por glutaraldehído (39) (FIG. 3):

- 1) La etapa de enlazamiento del NKCF, la cual ocurre dentro de 2 hrs. después de la adición del NKCF y es inhibida por el glutaraldehído;
- 2) la etapa de ensamble/activación del NKCF, la cual ocurre de 2 a 5 hrs. después de la adición del NKCF y es aumentada por la adición del glutaraldehído;
- 3) la etapa de efector del NKCF, la cual ocurre de 5 a 10 hrs. después de la adición del NKCF y antes de la liberación del Cr^{51} , y no es afectada por la adición del glutaraldehído; y
- 4) la etapa de lisis por el NKCF, la cual ocurre de 10 a 15 hrs. después de la adición del NKCF, cuando comienza la liberación del Cr^{51} , y no es afectada también por la adición del glutaraldehído.

Subetapas comparables con éstas existen durante la lisis independiente de la célula citotóxica (38) (FIG. 3). Así, el glutaraldehído aumenta la lisis solamente cuando es adicionado dentro de 5 minutos después de la dispersión de los conjugados; después de esta etapa, cuando aún no ocurre la lisis, existen algunos minutos en los que el glutaralde

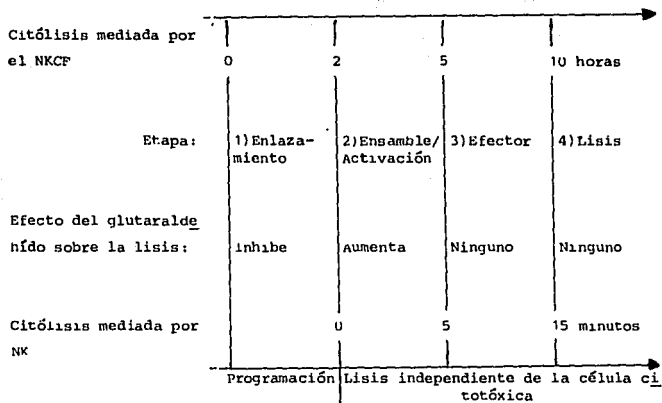


FIG. 3. Modelo cinético de las subetapas funcionales de la lisis independiente de la célula citotóxica (Referencia: 38) y la citólisis mediada por el NKCF (Referencia: 39).

hído no aumenta la lisis; y, esta etapa es seguida por una etapa de lisis, tiempo durante el cual el glutaraldehído no tiene otra vez efecto. Además, la etapa de la programación (tiempo en el que los factores líticos de NK son enlazados a la célula blanco) es inhibida por la adición del glutaraldehído.

De esta manera, también, los resultados de los estudios con el glutaraldehído, que afecta el movimiento de la membrana, indican que la lisis independiente de la célula citotóxica o etapa terminal de la citólisis por NK es un proceso dinámico que ocurre probablemente, al menos inicialmente, sobre la membrana de la célula blanco.

V- MODULACION Y REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS NK, EN LA SA
LUD Y LA ENFERMEDAD-

a) Respuesta positiva.

La citotoxicidad mediada por las células NK es aumentada significativamente en presencia de los hematíes enteros y directamente por ellos. El acrecentamiento depende del número de los glóbulos rojos presentes y puede ser inducido por hematíes alogénicos, xenogénicos, o autólogos. Además, la inducción del aumento de la citotoxicidad ocurre probablemente en una fase posterior al enlazamiento y anterior a la programación. Así, estos resultados indican que los hematíes son un potente modulador de la citotoxicidad de NK (165).

Los leucocitos humanos pueden producir IFN, substancia que aumenta también la citotoxicidad de las células NK (103).

El aumento de la actividad de las células NK humanas por el IFN es dependiente de síntesis proteica (64, 108). Además, se ha encontrado que el IFN induce en los LGL humanos, la formación rápida de proteínas dependientes probablemente de la formación de RNA nuevo, y alguna(s) de éstas pudiera(n) estar involucrada(s) en la actividad de las células NK aumentada por el IFN (64).

Se ha reportado que el pretratamiento de los LGL humanos con IFN no tiene efecto sobre su enlazamiento a las células de la línea K562, la cual crece en suspensión; pero activa posiblemente la citotoxicidad de algunos LGL enlazadores, no líticos; aumenta la velocidad de la lisis por las células NK enlazadas, líticamente activas, inducidas con el IFN; aumenta la capacidad del reciclamiento de las células NK (178); y dife

rencia las células OKT3⁺ a células OKM1⁺, aumentando por consiguiente la proporción de linfocitos OKM1⁺ enlazados a las células K562 (158). Utilizando blancos celulares formadores de monocapas, el pretratamiento de los LGL con el IFN provoca en contraste un aumento en la cantidad de los LGL enlazados a los blancos, provoca un aumento en la proporción de las células citotóxicas, también un aumento en la velocidad de la lisis por las células NK enlazadas, líticamente activas, inducidas con el IFN (178).

Por otra parte, se ha observado que la actividad baja de las células NK de la sangre periférica de los pacientes con carcinoma hepatocelular en estado avanzado puede ser aumentada in vitro con el IFN o con el levamisol, que es una droga antihelmíntica, y que la actividad de las células NK de los sujetos normales aumenta sólo levemente in vitro con esta última sustancia (168). En contraste, en otros estudios (164), la citotoxicidad de las células NK de los humanos normales se redujo con el levamisol.

Se ha observado además que la administración de preparaciones del IFN natural en pacientes con tumores conduce a un aumento de su actividad de NK (45, 112). Similarmente, se reportó (112) un aumento de la citotoxicidad de NK de pacientes con tumores, después de la administración del IFN recombinante A de leucocitos (IFNL-rA) en los pacientes, experiencia que contrasta con lo observado en otro estudio (118), donde el IFNL-rA falló para producir un aumento apreciable de la actividad de NK y se observó aún, en varios de los pacientes, una disminución de la actividad de NK. En este estudio, las razones de los hallazgos no fueron cla

ras.

En el tratamiento del cáncer y otros males humanos semejantes, el uso de un protocolo de tratamiento secuencial que alterna subtipos del IFN humano pudiera ser mucho más efectivo que los tratamientos con IFNs particulares, ya que el trato secuencial de los linfocitos de la sangre periférica humana el cual alterna IFNs diferentes ha encontrado ser mucho más efectivo que los tratamientos con IFNs individuales, para el aumento de la citotoxicidad de las células NK (176).

El INF inmune (IFNY) con el IFN de los leucocitos humanos (IFN α) o con el IFN de los fibroblastos humanos (IFN β) aumentan la citotoxicidad natural mediada por los linfocitos humanos, obteniéndose un efecto sinérgico; y, así, las combinaciones de IFNY e IFN α y/o de IFNY e IFN β pudieran ser importantes para el aumento de la actividad citotóxica natural contra las neoplasias e infecciones por virus (193).

Los pacientes con trasplante en tratamiento con ciclosporina A (un inmunosupresor potente derivado de metabolitos fúngicos activos (61)) tienen la tendencia a desarrollar infecciones virales y linfomas que han sido asociados con la infección del virus Epstein-Barr (EBV), que es un herpesvirus linfotrópico en el hombre. Se ha observado que pacientes de este tipo presentan una actividad de células NK deprimida, la cual puede ser aumentada sólo pobremente in vitro con IFN, y que la presencia de viremia por citomegalovirus (CMV) en pacientes de este tipo está asociada también con un aumento escaso de actividad de NK por el IFN (62).

También, la actividad citotóxica de las células NK humanas puede ser aumentada in vitro por el poli I:C (44).

La administración de las 5-halo-6-fenil pirimidinonas en los roedores, las cuales son moléculas con potencia para inducir el IFN, conduce a una estimulación de sus células NK, hallazgos que, junto a reportes de que las moléculas exhiben propiedades antitumorales en los animales, sugieren que estos agentes pudieran ser de importancia particular en la terapia del cáncer (113, 114). Por otro lado, los datos presentados en un estudio con adriamicina (35), que es una droga anticancerosa, sugieren que los macrófagos activados con la adriamicina producen factor activo de linfocitos (LAF) que pudiera inducir a las células T a producir IL2 y/o IFN, aumentándose la actividad de NK del ratón. Suponer que las propiedades antineoplásicas de las moléculas de las pirimidinonas y la adriamicina, observadas in vivo, son mediadas al menos en parte por las células NK, es razonable.

La elevación de la actividad de las células NK provocada por la administración del virus no replicativo de la enfermedad de Newcastle (NDV) en ratones, el cual es un conocido inductor del IFN, puede ser inhibida por la ciclosporina A, debido probablemente a un bloqueo de la acción del IFN inducido por NDV (61). Un fenómeno que se ha observado que sigue a este aumento de la actividad de NK, es un período de actividad deprimida de NK y una respuesta deprimida a la estimulación in vitro con IFN (120).

Existen datos de que los leucocitos del calostro humano cultivados en presencia de células infectadas con HSV-1 producen una citocina que pudiera ser el IFN, y de que los sobrenadantes de estos cultivos, los cuales contienen a la citocina, son capaces de incrementar la actividad

citotóxica de las células NK de los leucocitos de la sangre del recién nacido contra células infectadas con HSV-1; observaciones que pueden ayudarnos a entender, en parte, la resistencia inespecífica antiviral aumentada de los infantes amamantados (100). Por otro lado, las pruebas con ratones lactantes han demostrado que ellos pueden ser protegidos de la infección con HSV-1, por el tratamiento con IFN y aciclovir (un poderoso agente antiviral), mejor que, por el tratamiento con IFN sin aciclovir (98).

La inoculación de los parásitos protozoarios en los ratones conduce también a un aumento del nivel de la actividad de sus células NK y los trabajos con sonicados de Toxoplasma gondii sugieren que los antígenos que son decisivos en la inducción de la elevación de la actividad de NK, son probablemente proteínas y/o glucoproteínas (71). Se ha reportado además que los esporozoitos del Plasmodium berghei son mitogénicos para las células T, induciendo la producción de IFN γ y la activación de las células NK (132).

El aumento de la actividad de las células NK en las células no adherentes del bazo de las ratas puede ser producido in vitro por la adición del Corynebacterium parvum o en las células completas por la incubación de las células sin la adición de un agente estimulador. En el caso de las células completas, el proceso es dependiente de células, que se presume que son macrófagos, y, en ambos casos, es probable que la elevación de la actividad de NK sea mediada por el IFN (151).

La aglutinina abrus y su subunidad B, pero no su subunidad A, aumentan también la actividad citotóxica natural de los linfocitos de la san-

gre periférica de los sujetos normales (201).

La inyección i.p. del factor de necrosis del tumor (FNT) en los ratones causa una activación notable de la actividad de sus células NK, sugiriéndose una activación independiente de IFN. Un efecto similar se ha observado cuando los IFNs α y β son inyectados, y existen resultados adicionales cuando el IFN es inyectado junto con el FNT. Además, el FNT es también activo in vitro activando las células NK en las células de sangre periférica humana (190).

La IL2 aumenta también in vitro la actividad citolítica de las células NK humanas, en ausencia de la promoción del crecimiento o expresión del receptor Tac, y la de las células NK de ratón. En ambos sistemas, el del ratón y el del humano, el aumento de la actividad celular NK por la IL2 es debido totalmente a la capacidad de la IL2 para inducir IFN γ en los cultivos; indicando un efecto de "cascada" por medio del cual, una linfocina, la IL2, induce la producción de otra linfocina, el IFN γ , que media realmente el aumento del efecto citotóxico (43, 134, 194).

En los pacientes con síndrome de Chédiak-Higashi (CHS), se ha observado que aunque la actividad citotóxica despreciable de las células NK de su sangre periférica no puede ser restaurada a niveles normales por el tratamiento con IL2 ó IFN α , el porcentaje del acrecentamiento de la actividad de NK es para los pacientes, más alto que, el de los controles (126).

Los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) pudieran presentar una actividad reducida de NK que puede ser aumentada in vitro por el tratamiento con IL2 (54, 149). Además, en los individuos

positivos al anticuerpo para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), se ha encontrado que la actividad de NK de las personas con algo de capacidad lítica de estas células es aumentada in vitro significativamente por la encefalina; pero que las personas sin nivel basal mensurable de actividad de NK no son sensibles a la estimulación con la encefalina (133).

Por último, se ha encontrado que una monocina humana, el pirógeno leucocítico (LP), no conduce a un aumento de la actividad de las células NK humanas, y que otra monocina humana, el LAF o interleucina-1 (IL1), tampoco. Sin embargo, el LP/LAF con IFN y/o una preparación de IL2 no pudo conducir a la elevación de esta actividad a niveles superiores al observado cuando se realizaron los mismos ensayos, pero en ausencia del LP/LAF (41).

b) Respuesta negativa.

Ciertos experimentos in vitro (95) han mostrado la capacidad de los granulocitos de la sangre periférica humana para inhibir la capacidad citolítica de las células NK autólogas o de las células NK alogénicas, función inhibitoria que puede ser ejercida en la etapa inicial del enlazamiento del linfocito al blanco, así como, en una etapa posterior al enlazamiento; y, así, los granulocitos de la sangre periférica pudieran ser capaces de ejercer in vivo, un efecto regulador sobre las células NK no reconocido previamente.

Otras células con capacidad inhibitoria, que pudieran controlar in vivo el desarrollo o el mantenimiento de la actividad de NK, se ha dicho que son los fagocitos mononucleares. En conformidad con esto, los ma

crófaeos alveolares de pulmón humano (un sitio con actividad defectuosa o baja de NK) y unas células adherentes, que se supone que son macrófaeos, de la cavidad peritoneal de ratón (normalmente, un sitio con actividad baja de NK) son, en contraste con células adherentes de otros sitios, capaces de inhibir la citotoxicidad natural expresada por las células NK (16, 23). Y, aunque las células adherentes de la sangre periférica normal o de la sangre periférica de los pacientes con artritis reumatoide, enriquecidas en macrófaeos, suprimen la actividad de las células NK de la sangre periférica, se ha demostrado que las células adherentes del fluido sinovial o de la sangre periférica de estos pacientes, enriquecidas en macrófaeos, aumentan la actividad de las células NK del fluido sinovial de los pacientes (36).

La PGE2 inhibe también la actividad citolítica de las células NK humanas (57, 65), aparentemente por vía del receptor para la PGE2 unido al sistema de la adenilato-ciclasa (65), mediante aumentar los niveles del AMPc en los LGL (57). Sin embargo, las células NK humanas activadas in vitro por el IFN, son parcialmente resistentes a la supresión de su actividad citotóxica por los agentes que elevan el AMPc, incluyendo a la PGE2; y el mecanismo para la adquisición de la resistencia a la PGE2 pudiera ser debido a una disminución de la producción del AMPc en las células activadas por el IFN (108). Esto pudiera representar un importante mecanismo protector de las células NK contra las PGs producidas por los monocitos (103).

En estudios con prostaglandinas seminales, se ha revelado que la PGE1 10-OH, que está presente en una concentración singularmente alta en

el plasma seminal humano, tiene un efecto inhibitorio sobre la citólisis mediada por las células NK. En contraste, la RGF' 19-OH, que se encuentra en concentraciones más bajas en el semen, no tiene efecto sobre la citotoxicidad mediada por las células NK (147).

En otras investigaciones, se encontró que las pacientes con cáncer del ovario presentaron una actividad de NK igual a la de las mujeres sanas del grupo control; pero que la operación sobre las pacientes indujo una caída inmediata de la actividad de NK de su sangre periférica, independientemente de si el tumor fue quitado o si, solamente, un intento de extirpación fue hecho. Esta disminución, que duró algunos días, estuvo ligada a la operación; pero su mecanismo es desconocido (116). Se ha encontrado también que después de la mastectomía y el comienzo de la quimioterapia citotóxica incluyendo el melphalan en pacientes con cáncer mamario (117) o después de la operación y la terapia con tiotepa en pacientes con cáncer del ovario (116), estas pacientes presentan una actividad baja de sus células NK.

Por otro lado, los experimentos in vitro han mostrado que la actividad citolítica de las células NK de la sangre periférica humana puede ser inhibida también por: la IgG monomérica humana con características citofílicas por medio de su región Fc (171), el fragmento C3a del tercer componente del complemento humano (33), y la adición de ATP, que no interfiere con el enlazamiento de las células NK al blanco (161).

Por último, se ha encontrado también que la ascitis de ciertos ratones que tienen tumores puede inhibir la actividad de las células NK (87).

VI- RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD DE DIFERENTES CELULAS A LA CITOTOXICIDAD DE LAS CELULAS NK-

El mecanismo involucrado en la resistencia o susceptibilidad de las células tumorales a la citotoxicidad por las células NK no está bien comprendido.

Se ha encontrado que los linfocitos T de la sangre humana normal tratados con 12-o-tetradecanoilphorbol-13-acetato, que es un promotor de tumores, son susceptibles a la lisis por las células NK autólogas o alogénicas, debido probablemente a alteraciones de la estructura blanco de su superficie (88).

Una linfotoxina pudiera tener una acción en la inhibición de la multiplicación de las células preneoplásicas y las células neoplásicas sensibles, y en el aumento de la susceptibilidad a la citólisis de NK, lo cual puede ser importante para la eliminación in vivo de las células potencialmente malignas (148).

En unos experimentos (197), se realizó la diferenciación de unas células blanco leucémicas sensibles a NK, lo cual condujo a una disminución conjunta de la sensibilidad de las células blanco a la lisis por NK. Y, la baja sensibilidad de ellas fue atribuible a la disminución de su capacidad para enlazar a la célula efectora. Ya que en la diferenciación hay una maduración morfológica y funcional de las células blanco, esta maduración pudiera enmascarar o hacer que se pierda un antígeno de diferenciación temprana (oncofetal), en contra del cual pudiera estar dirigida en parte la citólisis mediada por NK. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la susceptibilidad de las células tumorales a la lisis me -

diada por NK humanas puede depender en parte, de su etapa de diferenciación.

Por otro lado, después de inhibir inicialmente el crecimiento de una línea celular de carcinoma, las células NK pudieran mediar un proceso de selección de sublíneas de esta línea resistentes a la inhibición del crecimiento por las células NK, lo cual puede resultar no siempre en un aumento de su potencial metastático (20).

Se ha encontrado además que los sobrenadantes de los cultivos de una línea celular derivada de un carcinoma humano inhiben la actividad de las células NK humanas y son capaces de interferir con el enlazamiento de la célula efectora al blanco, lo cual pudiera ser importante para entender por qué los tumores malignos proliferan aún en presencia de actividad citotóxica de NK. Estos hallazgos sugieren que ciertos factores producidos y liberados por los tumores pudieran inhibir la actividad citotóxica local de NK bloqueando un sitio receptor sobre la célula efectora, por consiguiente permitiendo al tumor crecer (96).

Recientemente, se ha reportado un factor, producido y liberado por diferentes líneas de célula de tumor, que hace que las células K562 sean resistentes a la lisis de NK sin afectar la función citotóxica de las células efectoras NK. Este factor soluble es termolábil, no es dializable, tiene un p.m. de 36000 daltons y no bloquea la capacidad del enlazamiento de las células efectoras (163).

Existen datos de que la lisis de las células de un blanco de glioma por las células NK se reduce en presencia de una monocapa de endotelio derivado de cerebro, ducto torácico, pulmón, aorta, o de ovario, y de

que esta reducción de la citotoxicidad se correlaciona con el grado de adhesión entre las células de tumor y las monocapas endoteliales. Así, las interacciones entre las células de tumor y el endotelio vascular del hospedero parecen proteger las células neoplásicas de los mecanismos de vigilancia natural y pudieran jugar un papel en la formación de depósitos de tumor metastático (155).

En experimentos con células de la línea Raji (una línea derivada de un linfoma humano), se ha encontrado también que la susceptibilidad de estas células, las cuales contienen EBV, a la actividad citotóxica de las células NK humanas puede ser aumentada mediante la inducción del ciclo viral del EBV por la superinfección in vitro (14).

Los parásitos protozoarios bien adaptados pudieran no ser susceptibles a los mecanismos de resistencia natural mediada por células de sus hospederos, y su no susceptibilidad a las células NK pudiera resultar también de la capacidad para elaborar sustancias que inactivan a estas células o que bloquean la interacción de las células NK con los sitios complementarios sobre la superficie del parásito (7).

VII- CELULAS NK EN PROCESOS PATOLOGICOS-

a) En el cáncer.

Los estudios de pacientes con cáncer epitelial no linfoide muestran que algunos de ellos, pero no todos, exhiben niveles bajos de citotoxicidad de NK (89, 184), y que al llevarse a cabo una separación de los pacientes por la etapa clínica de su enfermedad, en los "pacientes con cáncer localizado" y los "pacientes con cáncer avanzado" (éstos últimos incluyendo con metástasis, cáncer recurrente, y tumores locales extensivos, no extirpables), la mayoría de los que presentan una citotoxicidad natural baja pertenecen a los de mal avanzado; así, en los pacientes con cáncer epitelial no linfoide, la actividad citotóxica de las células NK pudiera estar correlacionada con la etapa clínica de la enfermedad (89). Además, en los pacientes con cáncer avanzado y citotoxicidad natural baja, la determinación de la capacidad para el reciclamiento de las células efectoras NK (aparentemente, una célula NK activa puede despegarse de un blanco eliminado, localizar otra célula blanco, enlazarla y lisarla) estuvo reducida, lo que puede explicar el defecto observado en la actividad citotóxica (169).

Por lo general, las células mononucleares de la sangre periférica del paciente con linfoma maligno muestran una citotoxicidad baja de NK (184). Los bazo o los ganglios linfáticos involucrados en la enfermedad de Hodgkin (frecuentemente asociada con una inmunidad celular defectuosa) se ha encontrado que tienen respectivamente un nivel medio de citotoxicidad de NK más alto que el del bazo o los ganglios linfáticos involucrados en la afección de pacientes con linfoma de otra naturaleza (156).

También, se ha estudiado la actividad de las células NK en pacientes con leucemia en diferentes fases de la enfermedad. Así, en 63 niños con leucemia aguda, se encontró una disminución clara de la actividad de NK en la fase aguda, independiente del patrón morfológico de la leucemia, el grado de blastosis y la terapia. El 75% de los niños alcanzando la remisión reveló una actividad disminuida de las células NK dentro de los primeros 24 meses, mientras que el 25% fue normal. Y, a los 3 años o más tarde, la mayoría de los pacientes que reaccionaron mostró una actividad normal de NK (15). Por otra parte, en un grupo de pacientes con leucemia de las células hairy, fue encontrada una actividad alta de las células NK en todos los pacientes con enfermedad estable no sintomática, y una actividad extremadamente baja o ausente de las células NK, sólo en los pacientes con enfermedad progresiva sintomática. La actividad de las células NK determinada en las etapas de transición mostró valores entre estos dos extremos. Estos hallazgos sugieren que la investigación de la citotoxicidad de las células NK in vitro pudiera servir como una ayuda útil para la determinación de la etapa clínica en la leucemia de las células hairy (40).

b) En la anemia hemolítica autoinmune idiopática.

Se ha encontrado que la actividad de las células NK de la sangre periférica de ciertos pacientes con anemia hemolítica autoinmune idiopática (IAHA) está disminuida marcadamente y no es restaurada por la estimulación con IFN α recombinante. Sin embargo, el número de estas células periféricas es normal. Estos hallazgos sugieren que los pacientes con IAHA exhiben un deterioro funcional de las células NK (37).

c) En los padecimientos inmunodeficientes.

En la inmunodeficiencia severa combinada (IDSC), que comprende un grupo heterogéneo de desordenes en los cuales las funciones de los linfocitos T y las de los linfocitos B son defectuosas, se ha observado que no todos los pacientes carecen de actividad citotóxica de NK; algunos de ellos pudieran expresar aún una actividad citotóxica muy alta de NK (141). Sin embargo, la actividad citotóxica de las células NK de estos pacientes pudiera no ser aumentada por el tratamiento in vitro con IPN (199).

En el SIDA, que está caracterizado por un defecto severo en la inmunidad mediada por células, con una reducción de los subgrupos del linfocito T cooperador y una respuesta proliferativa disminuida a los mitógenos y los antígenos, la actividad de NK de los pacientes está frecuentemente debajo de lo normal y declina a medida que la enfermedad avanza (54, 133, 149).

Y, en el CHS, un raro desorden de inmunodeficiencia congénita recesiva autosomal, se ha reportado que los pacientes son deficientes en actividad citotóxica de NK (126). Aparentemente, las células NK de los donadores con CHS tienen todas las estructuras celulares necesarias y las moléculas requeridas por ellas, para funcionar como células efectoras líticas; pero su falta de función citotóxica es debida a una demora relativa en la iniciación del mecanismo lítico, después del enlazamiento (175).

La deficiencia de adhesión del leucocito (LAD) es otra enfermedad recesiva autosomal que se caracteriza por infecciones bacterianas recurrentes y que se asocia con funciones defectuosas de los leucocitos debi

das a una expresión deficiente de glucoproteínas de adhesión sobre la membrana del leucocito. Estas proteínas, LFA-1, Mac-1 (CR3), y p150.95, son heterodímeros compuestos de diferentes cadenas asociadas no covalentemente con una cadena común. Los pacientes con el fenotipo severo de esta enfermedad carecen completamente de las 3 glucoproteínas sobre la superficie de los leucocitos, mientras que los pacientes con el fenotipo moderado pueden expresar niveles bajos de las proteínas de adhesión sobre los leucocitos (1-10%) y pudieran presentar una actividad baja de sus células NK (42).

d) En pacientes con gastritis crónica.

En 69 pacientes sufriendo gastritis crónica, 23 en senectud con gastritis contractiva y 10 con gastritis agravada por úlceras estomacales, se ha encontrado un nivel significativamente bajo de células NK en casos de atrofia de la mucosa y lesiones metaplásicas intestinales gástricas, particularmente, en una edad de más de 60 años (136).

e) En pacientes con tuberculosis y en pacientes con neumonía.

En los pacientes con tuberculosis y en una proporción menor en los pacientes con neumonía crónica y persistente se ha observado una disminución en la cuenta absoluta y la cuenta relativa de las células NK en sangre, y que el nivel de la disminución en estas cuentas depende de la extensión del proceso patológico en los pulmones (159).

f) En la infartación aguda miocárdica.

La actividad de las células NK contra las células del blanco K562 fue medida en pacientes, dentro de 24 hrs. de infartación aguda miocárdica y regularmente por 6 semanas después, y estuvo suprimida cuando fue

comparada con los controles. El IFN y la IL2 aumentaron la actividad de las células NK; pero no restauraron completamente su actividad defectuosa. Además, el suero de los pacientes no suprimió la actividad de las células NK de sujetos sanos, y el número de células NK (identificadas como LGL) no estuvo reducido en comparación con aquél de los controles. Por consiguiente, los pacientes con infartación aguda miocárdica pudieran exhibir un deterioro funcional de las células NK (97).

g) En el lupus eritematoso sistémico.

Se ha demostrado (93) que los pacientes con lupus eritematoso sistémico son deficientes en actividad citotóxica de NK y que esta anomalía existe predominantemente en aquellos individuos con enfermedad clínicamente activa. En este estudio, la disminución de la actividad citotóxica de NK observada en los pacientes con lupus eritematoso sistémico activo examinados parece que no fue el resultado de una inhibición directa por factores del suero, ni de una deficiencia en células NK, en la formación del conjugado célula efectora-célula blanco, o en el reciclamiento de las células NK activas (que lisan blancos celulares) después de la lisis, sino que fue el de una incapacidad de las células NK para matar a las células blanco enlazadas.

h) En pacientes con epidermólisis bulosa.

La actividad de las células NK se ha evaluado también en los pacientes con formas heredadas de epidermólisis bulosa (EB), y se ha encontrado que mientras la actividad de NK de los pacientes con EB simple no difiere de aquélla de los sujetos control, las personas con formas más severas de EB muestran disminuciones significativas en la actividad de NK.

El grado de esta reducción está directamente relacionado con la severidad del involucramiento de la piel por la EB, los pacientes con EB distrófica recesiva teniendo la actividad de NK más baja. Además, el número absoluto de células llevando marcadores de superficie de NK de la sangre periférica de los pacientes con EB distrófica recesiva no difiere de aquél de los sujetos control. Esta actividad reducida de NK pudiera ser al menos parcialmente responsable de la septicemia en algunas personas con formas severas de EB y del desarrollo del carcinoma de células escamosas metastáticas en los pacientes con EB distrófica (185).

VIII- METODOS DE LABORATORIO PARA ESTUDIAR LAS CELULAS NK-

En humanos, una gran variedad de tipos de células blanco han sido _
usados para medir la citotoxicidad de las células NK; éstos incluyen lí-
neas celulares derivadas de tumores de origen no linfóide o linfóide, cé-
lulas infectadas con virus, y también cepas de fibroblasto de mamífero. _
La sensibilidad de las diferentes líneas celulares a la citotoxicidad de
las células NK es altamente variable; pero, bajo condiciones óptimas, ca-
si cualquiera de ellas es eliminada. El blanco más sensible y ampliamen-
te usado es el K562 (198), una línea celular derivada de un paciente con
leucemia mieloide crónica (115).

La actividad citotóxica de las células NK es detectada comúnmente _
in vitro usando técnicas convencionales sobre la liberación de Cr^{51} , en-
las cuales el porcentaje observado de la lisis celular del blanco es una
medida de la frecuencia de NK inherente a la población de linfocitos y _
de la eficiencia o capacidad para el reciclamiento de las células efecto-
ras. En el ensayo de la liberación de Cr^{51} para la citotoxicidad, las _
preparaciones celulares conteniendo a las células NK son mezcladas con _
un número constante de células K562 ó de las células de otro blanco mar-
cadas con Cr^{51} , a una o más proporciones de célula efectora a célula del
blanco; y la lisis celular es evaluada, comúnmente después de 3 a 4 hrs.
de incubación a 37°C, midiendo la cantidad de Cr^{51} liberada en el fluido
sobrenadante. Sin embargo, el uso de este ensayo citotóxico para compa-
rar la actividad de NK de los pacientes, con aquélla de los controles _
normales, es complicado por una gran variabilidad de la actividad entre _
los donadores normales y por la variación, de un día a otro, en la sensi

bilidad del sistema de ensayo mismo (145). Por estas razones, los ensayos rutinarios de las células NK deben incluir, para la comparación con cada grupo de pacientes, al menos dos preparaciones de linfocitos frescos o criopreservados de un control normal, pues se ha encontrado que las células NK criopreservadas retienen niveles importantes de citotoxicidad, que la sensibilidad de ellas a el poli I:C, el IFN , o a la IL2 recombinante, permanece intacta, y que la composición de los subgrupos de linfocitos no cambia después de la criopreservación (94). La actividad citotóxica de las células NK de estas preparaciones control debe estar bien caracterizada, de manera que su actividad citotóxica natural sea conocida con relación a la actividad citotóxica media de NK de muchos donadores normales en varios ensayos separados. Alternativamente, un gran número de controles normales puede ser usado en cada ensayo y de terminado un promedio de citotoxicidad. En los pacientes, la evaluación de la actividad citotóxica de las células NK debe también incluir correcciones por varias condiciones fisiológicas (edad y sexo) y clínicas (tratamiento con drogas, infección viral, y si fuma o no) que pueden modificar la actividad citotóxica de las células NK (145, 172, 182).

El estudio de la interacción célula NK-célula blanco ha empleado las técnicas de la formación y enumeración de los conjugados célula efectora-célula blanco y la inmovilización de los conjugados en agar para permitir el análisis de las interacciones líticas particulares. En el ensayo de la citotoxicidad celular particular en agarosa, se permite formar conjugados a las células efectoras y las células blanco en suspensión por unos pocos minutos, y los conjugados son inmovilizados entonces

en frotis de medio semisólido (agarosa). Los frotis, en cajas Petri o en portaobjetos de microscopio, son incubados a 37°C por varios períodos de tiempo, y las células muertas son evaluadas por tinción de exclusión usando azul tripano. El ensayo celular particular permite la determinación de la proporción de células capaces de formar conjugados con las células blanco y la de la proporción de células efectoras, enlazadas a las células blanco, que son citotóxicas en el período del ensayo (60, 127). El ensayo celular particular, aunque laborioso y difícil para cuantificar, permite una aproximación del número de células NK activas en la preparación. Comparando el número de células NK activas (citotóxicas) con el número total de las células blanco lisadas en una suspensión de ensayo, uno puede evaluar la capacidad de reciclamiento de las células efectoras (107).

Se ha descrito y realizado prácticamente un método que permite calcular con un computador la cantidad de las células K activas en la población efectora, su avidéz por las células blanco, y la velocidad de la lisis de la célula blanco, sobre la base de una prueba citotóxica modificada por liberación de Cr^{51} de las células blanco. Recientemente, estos parámetros han sido estimados para la interacción de las células NK de sujetos normales con las células K562. Con ello ha sido demostrado que la reaparición cíclica de las células NK en el ciclo lítico desacelera bruscamente después de 1 a 2 vueltas, y la avidéz se disminuye (106).

La incapacidad para aislar grandes números de células efectoras altamente enriquecidas ha limitado la caracterización detallada de las células NK. Pero se ha provisto evidencia importante de que la leucemia es

pontánea de LGL en las ratas puede ayudar a librar esta dificultad. Es -
tas líneas celulares trasplantables de tumor mantienen sus característi-
cas morfológicas y funcionales (150). También, ciertos datos (9) indican
la utilidad del enlazamiento espontáneo de la Salmonella minnesota Rb _
345 (bacterias muertas) a los linfocitos de la sangre periférica humana,
para el enriquecimiento selectivo de las células que median la citotoxi-
cidad natural, en la fracción no enlazada con la Salmonella minnesota Rb.

Las células NK humanas citotóxicas contra fibroblastos y células de
línea celular han sido aisladas y caracterizadas morfológicamente usando
técnicas por medio de las cuales las células efectoras pueden ser absor-
bidas y eluidas de las células blanco (157, 179, 181). La técnica de la _
separación en gradiente discontinuo de densidad por centrifugación con _
Percoll (180) es muy útil en la separación de los LGL y se ha usado en _
varias investigaciones dirigidas a la caracterización de estas células _
(72, 135).

Las células de la médula ósea de los ratones exhiben normalmente u-
na actividad citotóxica muy baja de NK. Se ha descrito un sistema de cul-
tivo que puede generar células NK a partir de células de médula (102). A
sí, la inducción de la diferenciación de las células NK en cultivos de _
médula ósea proporciona la oportunidad de estudiar la ontogenia de las _
células NK.

Por último, el IPN pudiera ser usado como prueba funcional para di-
ferenciar las células NK de los monocitos, otro subgrupo distinto de cé-
lulas mononucleares con citotoxicidad natural (81).

IX- CONCLUSIONES-

Desde la mitad de los años setentas, las células NK han sido estudiadas numerosa y extensamente. Es así como se han hecho hallazgos importantes con relación a estas células y su efecto citotóxico. Para mencionar sólo algunos: una subpoblación pequeña, pero distinta, de linfocitos media la citotoxicidad natural, los cuales son granulares grandes (86, 104, 150); al menos un cierto porcentaje de los linfocitos de los humanos tienen el potencial y la capacidad para llevar a cabo funciones de NK y K (17); la destrucción de células tumorales por las células NK humanas y por las células fagocíticas activadas es mediada por mecanismos diferentes (3, 55); que el enlazamiento de las células NK a las células blanco es dependiente de Mg^{++} (73, 74, 146). Sin embargo, quedan cosas por aclarar como el camino de diferenciación el cual da origen a las células NK, entre otras cosas; y, ya que las células NK pudieran jugar un papel importante en la primera línea de defensa contra tumores, patógenos extraños, y tener in vivo un papel regulador de la hematopoyesis, será importante realizar más investigaciones al respecto.

X- BIBLIOGRAFIA-

- 1.- Aarstad H.J., Gaudernack G., and Seljelid R. "Stress causes reduced natural killer activity in mice". *Scand. J. Immunol.* 18:461-464, 1983.
- 2.- Abdallah R.M., Starkey J.R., and Meadows G.G. "Alcohol and related dietary effects on mouse natural killer-cell activity". *Immunology* 50:131-137, 1983.
- 3.- Abrams S.I., and Brahmī Z. "Compared mechanisms of tumor cytotoxicity by human natural killer cells and activated polymorphonuclear leukocytes". *J. Immunol.* 132:3192-3196, 1984.
- 4.- Abruzzo L.V., and Rowley D.A. "Homeostasis of the antibody response: immunoregulation by NK cells". *Science* 222:581-585, 1983.
- 5.- Ades E.W., and Hinson A. "Effector cell sensitivity to sugar moieties: inhibition of human natural killer cell activity by tunicamycin". *Cell. Immunol.* 72:326-331, 1982.
- 6.- Albright J.W., and Albright J.F. "Age-associated impairment of murine natural killer activity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6371-6375, 1983.
- 7.- Albright J.W., Hatcher F.M., and Albright J.F. "Interaction between murine natural killer cells and trypanosomes of different species". *Infect. Immun.* 44:315-319, 1984.
- 8.- Allavena P., and Ortaldo J.R. "Characteristics of human NK clones: target specificity and phenotype". *J. Immunol.* 132:2363-2369, 1984.
- 9.- Antonaci S., Jirillo E., Ventura M.T., Michalek S.M., Bonomo L., and McGhee J.R. "Relationship between immune system and gram-negative bacteria. II. Natural killer cytotoxicity of *Salmonella minnesota* Rb 345-unbound human peripheral blood lymphocytes". *J. Immunol.* 133:729-733, 1984.
- 10.- Arai S., Yamamoto H., Itoh K., and Kumagai K. "Suppressive effect of human natural killer cells on pokeweed mitogen-induced B cell differentiation". *J. Immunol.* 131:651-657, 1983.
- 11.- Bai Y., Beverley P.C.L., Knowles R.W., and Bodmer W.F. "Two monoclonal antibodies identifying a subset of human peripheral mononuclear

- cells with natural killer cell activity". *Eur. J. Immunol.* 13:521-527, 1983.
- 12.- Barlozzari T., Reynolds C.W., and Herberman R.B. "In vivo role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats". *J. Immunol.* 131:1024-1027, 1983.
- 13.- Biron C.A., Turgiss L.R., and Welsh R.M. "Increase in NK cell number and turnover rate during acute viral infection". *J. Immunol.* 131:1539-1545, 1983.
- 14.- Blazar B.A., Strome M., and Schooley R. "Interferon and natural killing of human lymphoma cell lines after induction of the Epstein Barr viral cycle by superinfection". *J. Immunol.* 132:816-820, 1984.
- 15.- Blinov M.N., Vartanyan N.L., Luganova I.S., Kulbovskaya N.I., and Alekseev N.A. "Natural killer activity at different phases of acute pediatric leukemia". *Vopr. Onkol.* 34:421-425, 1988.
- 16.- Bordignon C., Villa F., Allavena P., Introna M., Biondi A., Avallone R., and Mantovani A. "Inhibition of natural killer activity by human bronchoalveolar macrophages". *J. Immunol.* 129:587-591, 1982.
- 17.- Bradley T.P., and Bonavida B. "Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. IV. Natural killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity can be mediated by the same human effector cell as determined by the two-target conjugate assay". *J. Immunol.* 129:2260-2265, 1982.
- 18.- Brieva J.A., and Stevens R.H. "Involvement of the transferrin receptor in the production and NK-induced suppression of human antibody synthesis". *J. Immunol.* 133:1288-1292, 1984.
- 19.- Brieva J.A., Targan S., and Stevens R.H. "NK and T cell subsets regulate antibody production by human in vivo antigen-induced lymphoblastoid B cells". *J. Immunol.* 132:611-615, 1984.
- 20.- Brodt P., Feldman M., and Segal S. "Differences in the metastatic potential of two sublines of tumor 3LL selected for resistance to natural NK-like effector cells". *Cancer Immunol. Immunother.* 16:109-113, 1983.
- 21.- Brooks C.G., Burton R.C., Pollack S.B., and Henney C.S. "The presen

- ce of NK alloantigens on cloned cytotoxic T lymphocytes". *J. Immunol.* 131:1391-1395, 1983.
- 22.- Brooks C.G., Flannery G.R., Cantrell D.A., Gray J.D., Robins R.A., and Baldwin R.W. "Rat NK cells active against lymphoma and sarcoma tumor cells are probably identical". *J. Immunol.* 128:913-919, 1982.
- 23.- Brunda M.J., Taramelli D., Holden H.T., and Varesio L. "Suppression of in vitro maintenance and interferon-mediated augmentation of natural killer cell activity by adherent peritoneal cells from normal mice". *J. Immunol.* 130:1974-1979, 1983.
- 24.- Buettner M., and Bauer J. "The effects of dietary T-2 toxin on the NK-cell activity and on the reactivation of pseudorabies virus in NMRI mice". *J. Vet. Med. Ser. B.* 35:421-430, 1988.
- 25.- Bukowski J.F., Biron C.A., and Welsh R.M. "Elevated natural killer cell-mediated cytotoxicity, plasma interferon, and tumor cell rejection in mice persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus". *J. Immunol.* 131:991-996, 1983.
- 26.- Bukowski J.F., Woda B.A., Habu S., Okumura K., and Welsh R.M. "Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo". *J. Immunol.* 131:1531-1538, 1983.
- 27.- Burns G.F., Werkmeister J.A., and Triglia T. "A novel antigenic cell surface protein associated with T200 is involved in the post-activation stage of human NK cell-mediated lysis". *J. Immunol.* 133:1391-1396, 1984.
- 28.- Burton R.C., Bartlett S.P., Kumar V., and Winn H.J. "Studies on natural killer (NK) cells. II. Serologic evidence for heterogeneity of murine NK cells". *J. Immunol.* 127:1864-1868, 1981.
- 29.- Calvo C.-F., Boumsell L., Kolb J.-P., Laffy B., Bernard A., and Senik A. "Preferential elimination of NK and CTL functions by anti-D44 monoclonal antibody". *J. Immunol.* 132:2345-2349, 1984.
- 30.- Carpién O., Virtanen I., Lehto V.-P., and Saksela E. "Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells". *J. Immunol.* 131:2695-2698, 1983.
- 31.- Carpién O., Virtanen I., and Saksela E. "Ultrastructure of human natural killer cells: nature of the cytolytic contacts in relation to

- cellular secretion". *J. Immunol.* 128:2691-2697, 1982.
- 32.- Cauda R., Laghi V., Tumbarello M., Ortona L., and Whitley R.J. "Immunological alterations associated with recurrent herpes simplex genitalis". *Clin. Immunol. Immunopathol.* 51:294-302, 1989.
- 33.- Charriaut C., Senik A., Kolb J.-P., Barel M., and Frade R. "Inhibition of in vitro natural killer activity by the third component of complement: role for the C3a fragment". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6003-6007, 1982.
- 34.- Clark E.A., Engel D., and Windsor N.T. "Immune responsiveness of SM/J mice: hyper NK cell activity mediated by NK1⁺ Qa5⁻ cells". *J. Immunol.* 127:2391-2395, 1981.
- 35.- Cohen S.A., Salazar D., and Wicher J. "Adriamycin-induced activation of NK activity may initially involve LAF production". *Cancer Immunother.* 15:188-193, 1983.
- 36.- Combe B., Pope R., Darnell B., Kincaid W., and Talal N. "Regulation of natural killer cell activity by macrophages in the rheumatoid joint and peripheral blood". *J. Immunol.* 133:709-713, 1984.
- 37.- Conte R., Dinota A., Tazzari P.L., Belletti D., and Sermasi G. "Analysis of natural killer cells in patients with idiopathic autoimmune hemolytic anemia". *Vox. Sang.* 56:270-273, 1989.
- 38.- Deem R.L., and Targan S.R. "Evidence of a dynamic role of the target cell membrane during the early stages of the natural killer cell lethal hit". *J. Immunol.* 133:72-77, 1984.
- 39.- Deem R.L., and Targan S.R. "Sequential substages of natural killer cell-derived cytolytic factor (NKCF)-mediated cytolysis as defined by glutaraldehyde modulation of the target cell". *J. Immunol.* 133:1836-1840, 1984.
- 40.- Demeter J., Paloczki K., Lehoczky D., and Benczur M. "Hairy cell leukemia: observations on natural killer activity in different clinical stages of the disease". *Br. J. Haematol.* 71:239-244, 1989.
- 41.- Dempsey R.A., Dinarello C.A., Mier J.W., Rosenwasser L.J., Allegretta M., Brown T.E., and Parkinson D.R. "The differential effects of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor, T cell growth factor, and interferon on human natural killer activity". *J.*

- Immunol. 129:2504-2510, 1982.
- 42.- Dimanche-Boitrel M.T., Le Deist F., Quillet A., Fischer A., Griscelli C., and Lisowska-Groszpiere B. "Effects of interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) on the expression of LFA-1 in the moderate phenotype of leukocyte adhesion deficiency (LAD)". J. Clin. Immunol. 9:200-207, 1989.
- 43.- Domzig W., Stadler B.M., and Herberman R.B. "Interleukin2 dependence of human natural killer (NK) cell activity". J. Immunol. 130:1970-1973, 1983.
- 44.- Edwards B.S., Borden E.C., and Smith-Zaremba K. "Divergence in activation by poly I:C of human natural killer and killer cells". Cancer Immunol. Immunother. 13:158-163, 1982.
- 45.- Einhorn S., Blomgren H., Strander H., and Wasserman J. "Influence of human interferon- α therapy on cytotoxic functions of blood lymphocytes. Studies on lectin-dependent cellular cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and natural killer cell activity". Cancer Immunol. Immunother. 16:77-80, 1983.
- 46.- Farram E., and Targan S.R. "Identification of human natural killer soluble cytotoxic factor(s) (NKCF) derived from MK-enriched lymphocyte populations: specificity of generation and killing". J. Immunol. 130:1252-1256, 1983.
- 47.- Fast L.D., Beatty P., Hansen J.A., and Newman W. "T cell nature and heterogeneity of recognition structures of human natural killer (NK) cells". J. Immunol. 131:2404-2410, 1983.
- 48.- Fiatarone W.A., Morley J.E., Bloom E.T., Benton D., Solomon G.F., and Makinodan T. "The effect of exercise on natural killer cell activity in young and old subjects". J. Gerontol. 44:M37-M45, 1989.
- 49.- Fitzgerald P.A., Evans R., Kirkpatrick D., and Lopez C. "Heterogeneity of human NK cells: comparison of effectors that lyse HSV-1-infected fibroblasts and K562 erythroleukemia targets". J. Immunol. 130:1663-1667, 1983.
- 50.- Fitzgerald P.A., von Wussow P., and Lopez C. "Role of interferon in natural kill of HSV-1-infected fibroblasts". J. Immunol. 129:819-823, 1982.

- 51.- Flomenberg N., Welte K., Mertelsmann R., O'Reilly R., and Dupont B. "Interleukin 2-dependent natural killer (NK) cell lines from patients with primary T cell immunodeficiencies". *J. Immunol.* 130:2635-2643, 1983.
- 52.- Fox R.I., Fong S., Tsoukas C., and Vaughan J.H. "Characterization of recirculating lymphocytes in rheumatoid arthritis patients: selective deficiency of natural killer cells in thoracic duct lymph". *J. Immunol.* 132:2883-2887, 1984.
- 53.- Freund Y.R., and Blair P.B. "Depression of natural killer activity and mitogen responsiveness in mice treated with pristane". *J. Immunol.* 129:2826-2830, 1982.
- 54.- Gerstoft J., Dickmeiss E., and Mathiesen L. "Cytotoxic capabilities of lymphocytes from patients with the acquired immunodeficiency syndrome". *Scand. J. Immunol.* 22:463-470, 1985.
- 55.- Glibboney J.J., Haak R.A., Kleinhans F.W., and Brahmī Z. "ESR spectroscopy does not reveal hydroxyl radical production in activated natural killer lymphocytes". *J. Leukocyte Biol.* 44:545-550, 1988.
- 56.- Gibson P.R., Dow E.L., Selby W.S., Strickland R.G., and Jewell D.P. "Natural killer cells and spontaneous cell-mediated cytotoxicity in the human intestine". *Clin. Exp. Immunol.* 56:438-444, 1984.
- 57.- Goto T., Herberman R.B., Maluish A., and Strong D.M. "Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity". *J. Immunol.* 130:1350-1355, 1983.
- 58.- Greenberg A.H., Miller V., Jablonski T., and Pohajdak B. "Suppression of NK-mediated natural resistance by interferon treatment of murine lymphomas". *J. Immunol.* 132:2129-2134, 1984.
- 59.- Griffin J.D., Hercend T., Beveridge R., and Schlossman S.F. "Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells". *J. Immunol.* 130:2947-2951, 1983.
- 60.- Grimm E., and Bonavida B. "Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. I. Estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency". *J. Immunol.* 123:2861, 1979.
- 61.- Gui X.-E., Ho M., and Camp P.E. "Effect of cyclosporin A on murine

- natural killer cells". *Infect. Immun.* 36:1123-1127, 1982.
- 62.- Gui X.-E., Rinaldo C.R., Jr., and Ho M. "Natural killer cell activity in renal transplant recipients receiving cyclosporine". *Infect. Immun.* 41:965-970, 1983.
- 63.- Gupta S., and Fernandes G. "Natural killing and antibody-dependent cytotoxicity by T leukaemic blasts from acute lymphoblastic leukaemia". *Scand. J. Immunol.* 16:477-480, 1982.
- 64.- Gustafsson Å., Sundström S., Ny T., and Lundgren E. "Rapid induction of seven proteins in human lymphocytes by interferon; correlation to natural killer cell activity". *J. Immunol.* 129:1952-1959, 1982.
- 65.- Hall T.J., Chen S.-H., Brostoff J., and Lydyard P.M. "Modulation of human natural killer cell activity by pharmacological mediators". *Clin. Exp. Immunol.* 54:493-500, 1983.
- 66.- Hallquist N.A., Sherman A.R. "Effect of iron deficiency on the stimulation of natural killer cells by macrophage-produced interferon". *Nutr. Res.* 9:283-292, 1989.
- 67.- Hanna N., and Burton R.C. "Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo". *J. Immunol.* 127:1754-1758, 1981.
- 68.- Hanna N., and Schneider M. "Enhancement of tumor metastasis and suppression of natural killer cell activity by β -estradiol treatment". *J. Immunol.* 130:974-980, 1983.
- 69.- Hansson M., Beran M., Andersson B., and Kiessling R. "Inhibition of in vitro granulopoiesis by autologous allogeneic human NK cells". *J. Immunol.* 129:126-132, 1982.
- 70.- Hatcher F.M., and Kuhn R.E. "Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells". *Science* 218:295-296, 1982.
- 71.- Hauser W.E., Jr., Sharma S.D., and Remington J.S. "Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*". *J. Immunol.* 131:458-463, 1983.
- 72.- Heumann D., Colombatti M., and Mach J.-P. "Human large granular lymphocytes contain an esterase activity usually considered as specific for the myeloid series". *Eur. J. Immunol.* 13:254-258, 1983.

- 73.- Hidore M.R., and Murphy J.W. "Murine natural killer cell interactions with a fungal target, *Cryptococcus neoformans*". *Infect. Immunol.* 57:1990-1997, 1989.
- 74.- Hiserodt J.C., Britvan L.J., and Targan S.R. "Characterization of the cytolytic reaction mechanism of the human natural killer (NK) lymphocyte: resolution into binding, programming and killer cell in dependent steps". *J. Immunol.* 129:1782, 1982.
- 75.- Hiserodt J.C., Britvan L.J., and Targan S.R. "Inhibition of human natural killing by heterologous and monoclonal antibodies". *J. Immunol.* 129:2248-2254, 1982.
- 76.- Hiserodt J.C., Britvan L.J., and Targan S.R. "Differential effects of various pharmacologic agents on the cytolytic reaction mechanism of the human natural killer lymphocyte: further resolution of programming for lysis and KCIL into discrete stages". *J. Immunol.* 129:2266-2270, 1982.
- 77.- Hiserodt J.C., Britvan L.J., and Targan S.R. "Studies on the mechanism of the human natural killer cell lethal hit: analysis of the mechanism of protease inhibition of the lethal hit". *J. Immunol.* 131:2705-2709, 1983.
- 78.- Hiserodt J.C., Britvan L.J., and Targan S.R. "Studies on the mechanism of the human natural killer cell lethal hit: evidence for transfer of protease-sensitive structures requisite for target cell lysis". *J. Immunol.* 131:2710-2713, 1983.
- 79.- Holmberg L.A., Springer T.A., and Ault K.A. "Natural killer activity in the peritoneal exudates of mice infected with *Listeria monocytogenes*: characterization of the natural killer cells by using a monoclonal rat anti-murine macrophage antibody (M1/70)". *J. Immunol.* 127:1792-1799, 1981.
- 80.- Homchampa P., Sarasombath S., Suvatte V., and Vongskul M. "Natural killer cells in dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome". *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 6:95-102, 1988.
- 81.- Horwitz D.A., Bakke A.C., Abo W., and Nishiya K. "Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparations: discriminating effects of interferon and lactoferrin". *J. Immunol.* 132:

2370-2374, 1984.

- 82.- Hudig D., Haverly T., Fulcher C., Redelman D., and Mendelsohn J. "Inhibition of human natural cytotoxicity by macromolecular antiproteases". *J. Immunol.* 126:1569-1574, 1981.
- 83.- Hudig D., Redelman D., Minning L., and Carine K. "Inhibition of human lymphocyte natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by K-76 COONa, a reagent that blocks complement activity". *J. Immunol.* 133:408-414, 1984.
- 84.- Huhn D., Huber C., and Gastl G. "Large granular lymphocytes: morphological studies". *Eur. J. Immunol.* 12:985-988, 1982.
- 85.- Hurme M., and Sihvola M. "Natural killer (NK) cell activity during lymphatic regeneration: early appearance of Thy-1⁺ NK cells and highly interleukin 2-(IL2) receptive, Thy-1⁻ cells". *J. Immunol.* 131: 658-661, 1983.
- 86.- Itoh K., Suzuki R., Umezu Y., Hanaumi K., and Kumagai K. "Studies of murine large granular lymphocytes. II. Tissue, strain, and age-distributions of LAL and LGL". *J. Immunol.* 129:395-400, 1982.
- 87.- Jia F., et al. "Immunoregulatory effects of ascites of tumor-bearing mice". *Acta. Acad. Med. Sin.* 10:426-429, 1988.
- 88.- Kabelitz D., and Kunkel H.G. "Phorbol-ester-treated human lymphocytes are susceptible to natural killer cell-mediated cytotoxicity". *J. Immunol.* 130:2505-2507, 1983.
- 89.- Kadish A.S., Doyle A.T., Steinhauer E.H., and Ghossein N.A. "Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease". *J. Immunol.* 127:1817-1822, 1981.
- 90.- Kaminsky S.G., Nakamura I., and Cudkovicz G. "Selective defect of natural killer and killer cell activity against lymphomas in SJL mice: low responsiveness to interferon inducers". *J. Immunol.* 130: 1980-1984, 1983.
- 91.- Katz P., Whalen G., Cupps T.R., Mitchell S.R., and Evans M. "Natural killer cells can enhance the proliferative responses of B lymphocytes". *Cell. Immunol.* 120:270-276, 1989.
- 92.- Katz P., Zaytoun A.M., and Lee J.H., Jr. "Mechanisms of human cell-

- mediated cytotoxicity. III. Dependence of natural killing on microtubule and microfilament integrity". *J. Immunol.* 129:2816-2825, 1982.
- 93.- Kawai P., Zaytoun A.M., Lee J.H., Jr., Panush R.S., and Longley S. "Abnormal natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus: an intrinsic defect in the lytic event". *J. Immunol.* 129:1966-1971, 1982.
- 94.- Kawai H., Komiyama A., Katoh M., Yabuhara A., Miyagawa Y., and Akabane T. "Induction of lymphokine-activated killer and natural killer cell activities from cryopreserved lymphocytes". *Transfusion* 28:531-535, 1988.
- 95.- Kay H.D., and Smith D.L. "Regulation of human lymphocyte-mediated natural killer (NK) cell activity. I. Inhibition in vitro by peripheral blood granulocytes". *J. Immunol.* 130:475-483, 1983.
- 96.- Keong A., Herman J., and Rabson A.R. "Supernatant derived from a human hepatocellular carcinoma cell line (PLC/PRF/5) depresses natural killer (NK) cell activity". *Cancer Immunol. Immunother.* 15:183-187, 1983.
- 97.- Klarlund K., Pedersen B.K., Theander T.G., and Andersen V. "Depressed natural killer cell activity in acute myocardial infarction". *Clin. Exp. Immunol.* 70:209-216, 1987.
- 98.- Kohl S. "Additive effects of acyclovir and immune transfer in neonatal herpes simplex virus infection in mice". *Infect. Immun.* 39:480-482, 1983.
- 99.- Kohl S., and Moore C.M. "Human antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killer cytotoxicity to herpes simplex virus-infected autologous and allogeneic cells". *Immunology* 48:187-193, 1983.
- 100.-Kohl S., Pickering L.K., and Loo L.S. "Virus-induced colostral cell cytokine stimulation of human leukocyte natural killer cytotoxicity". *Infect. Immun.* 36:691-695, 1982.
- 101.-Koo G.C., Peppard J.R., and Hatzfeld A. "Ontogeny of Nk-1⁺ natural killer cells. I. Proportion of Nk-1⁺ cells in fetal, baby, and old mice". *J. Immunol.* 129:867-871, 1982.
- 102.-Koo G.C., Peppard J.R., and Mark W.H. "Natural killer cells genera-

- ted from bone marrow culture". J. Immunol. 132:2300-2304, 1984.
- 103.-Koren H.S., Anderson S.J., Fischer D.G., Copeland C.S., and Jensen P.J. "Regulation of human natural killing. I. The role of monocytes, interferon, and prostaglandins". J. Immunol. 127:2007-2013, 1981.
- 104.-Kumagai K., Itoh K., Suzuki R., Hinuma S., and Saitoh F. "Studies of murine large granular lymphocytes. I. Identification as effector cells in NK and K cytotoxicities". J. Immunol. 129:388-394, 1982.
- 105.-Kumar V., Barnes M.C., Bennett M., and Burton R.C. "Differential lysis of endogenous and activated natural killer cells by anti-NK-1.2 antibody and complement". J. Immunol. 128:1482-1484, 1982.
- 106.-Kuznetsov V.A., Ivshina A.V., and Kadagidze Z.G. "Computer-assisted estimation of the amount of active natural killers, their avidity and cyclic recurrence rate in the lytic cycle". Immunologiya 0:27-30, 1988.
- 107.-Lanier L.L., Le A.M., Phillips J.H., Warner N.L., and Babcock G.F. "Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens". J. Immunol. 131:1789-1796, 1983.
- 108.-Leung K.H., and Koren H.S. "Regulation of human natural killing. III. Mechanism for interferon induction of loss of susceptibility to suppression by cyclic AMP elevating agents". J. Immunol. 132:1445-1450, 1984.
- 109.-Lillehoj H.S. "Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to elmerian infections in inbred chickens". Infect. Immun. 57:1879-1884, 1989.
- 110.-Lin Y., Collins J.L., Patek P.Q., and Cohn M. "An analysis of the sensitivity of somatic cell hybrids to natural killer cell- and natural cytotoxic cell-mediated lysis". J. Immunol. 131:1154-1159, 1983.
- 111.-Lopez C., Kirkpatrick D., Read S.E., Fitzgerald P.A., Pitt J., Pahwa S., Ching C.Y., and Smithwick E.M. "Correlation between low natural killing of fibroblasts infected with herpes simplex virus type 1 and susceptibility to herpesvirus infections". J. Infect. Dis. 147:1030-1035, 1983.

- 112.-Lotzová E., Savary C.A., Gutterman J.U., and Hersh E.M. "Modulation of natural killer cell-mediated cytotoxicity by partially purified and cloned interferon- α ". *Cancer Res.* 42:2480-2488, 1982.
- 113.-Lotzová E., Savary C.A., Khan A., and Stringfellow D.A. "Stimulation of natural killer cells in two random-bred strains of athymic rats by interferon-inducing pyrimidinone". *J. Immunol.* 132:2566-2570, 1984.
- 114.-Lotzová E., Savary C.A., and Stringfellow D.A. "5-Halo-6-phenyl pyrimidinones: new molecules with cancer therapeutic potential and in interferon-inducing capacity are strong inducers of murine natural killer cells". *J. Immunol.* 130:965-969, 1983.
- 115.-Lozzio B.B., Lozzio C.B., and Machado E. "Human myelogenous (Ph¹⁺) leukemia cell line: transplantation into athymic mice". *J. Natl. Cancer Inst.* 56:627, 1976.
- 116.-Lukomska B., Olszewski W.L., Engeset A., and Kolstad P. "The effect of surgery and chemotherapy on blood NK cell activity in patients with ovarian cancer". *Cancer* 51:465-469, 1983.
- 117.-Mackay I.R., Goodyear M.D.E., Riglar C., and Penschow J. "Effect on natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity of adjuvant cytotoxic chemotherapy including melphalan in breast cancer". *Cancer Immunol. Immunother.* 16:98-100, 1983.
- 118.-Maluish A.E., Ortaldo J.R., Conlon J.C., Sherwin S.A., Leavitt R., Strong D.M., Weirnik P., Oldham R.K., and Herberman R.B. "Depression of natural killer cytotoxicity after in vivo administration of recombinant leukocyte interferon". *J. Immunol.* 131:503-507, 1983.
- 119.-Manara G.D. "Ultrastructural features of NK cell subsets". *Eos-Riv. Immunol. Immunofarmacol.* 8:139-142, 1988.
- 120.-Melder R.J., and Ho M. "Modulation of natural killer cell activity in mice after interferon induction: depression of activity and depression of in vitro enhancement by interferon". *Infect. Immun.* 36:990-995, 1982.
- 121.-Mellen P.F., Lust J.A., Bennett M., and Kumar V. "Analysis of low natural killer cell activity in ⁸⁹Sr-treated mice". *Eur. J. Immunol.* 12:442-445, 1982.

- 122.-Miller S.C. "Production and renewal of murine natural killer cells in the spleen and bone marrow". *J. Immunol.* 129:2282-2286, 1982.
- 123.-Minarovits J., Karczag E., and Foldes I. "Enhanced take of spontaneous murine tumors in mice treated with inhibitors of macrophage and/or NK cell function". *Neoplasma* 36:3-10, 1989.
- 124.-Moon T.D., Morley J.E., Vessella R.L., and Lange P.H. "The role of calmodulin in human natural killer cell activity". *Scand. J. Immunol.* 18:255-258, 1983.
- 125.-Murphy J.W., and McDaniel D.O. "In vitro reactivity of natural killer (NK) cells against *Cryptococcus neoformans*". *J. Immunol.* 128:1577-1583, 1982.
- 126.-Nair M.P.N., Gray R.H., Boxer L.A., and Schwartz S.A. "Deficiency of inducible suppressor cell activity in the Chediak-Higashi syndrome". *Am. J. Hematol.* 26:55-66, 1987.
- 127.-Neville M.E., Grimm E., and Bonavida B. "Frequency determination of K cells by a single cell cytotoxic assay". *J. Immunol. Methods.* 36:255-268, 1980.
- 128.-Newman W., Fast L.D., and Rose L.M. "Blockade of NK cell lysis is a property of monoclonal antibodies that bind to distinct regions of T-200". *J. Immunol.* 131:1742-1747, 1983.
- 129.-Newman R.A., Warner J.P., and Dennert G. "NK recognition of target structures: is the transferrin receptor the NK target structure?". *J. Immunol.* 133:1841-1845, 1984.
- 130.-Nieminen P., Paasivuo R., and Saksela E. "Effect of a monoclonal anti-large granular lymphocyte antibody on the human NK activity". *J. Immunol.* 128:1097-1101, 1982.
- 131.-Nieminen P., and Saksela E. "A shared antigenic specificity of human large granular lymphocytes and precursors of NK-like and allo-specific cytotoxic effector cells". *J. Immunol.* 133:702-708, 1984.
- 132.-Ojo-Amaize E.A., Vilcek J., Cochrane A.H., and Nussenzweig R. "Plasmodium berghei sporozoites are mitogenic for murine T cells, induce interferon, and activate natural killer cells". *J. Immunol.* 133:1005-1009, 1984.
- 133.-Oleson D., Grierson H., Goldsmith J., Purtilo D.T., and Johnson D.

- "Augmentation of natural cytotoxicity by leucine enkephalin in cultured peripheral blood mononuclear cells from patients infected with human immunodeficiency virus". Clin. Immunol. Immunopathol. 51:386-395, 1989.
- 134.-Ortaldo J.R., Mason A.T., Gerard J.P., Henderson L.E., Farrar W., Hopkins III R.F., Herberman R.B., and Rabin H. "Effects of natural and recombinant IL2 on regulation of IFN production and natural killer activity: lack of involvement of the Tac antigen for these immunoregulatory effects". J. Immunol. 133:779-783, 1984.
- 135.-Ortaldo J.R., Sharrow S.O., Timonen T., and Herberman R.B. "Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies". J. Immunol. 127:2401-2409, 1981.
- 136.- Ostrovskii A.B. "Natural killer and T-suppressor cells in patients with chronic gastritis". Vopr. Onkol. 34:1464-1468, 1988.
- 137.-Patek P.Q., Collins J.L., and Cohn M. "Evidence that cytotoxic T cells and natural cytotoxic cells use different lytic mechanisms to lyse the same targets". Eur. J. Immunol. 13:433-436, 1983.
- 138.-Pedersen B.K., Tvede N., Christensen L.D., Klarlund K., Kragbak S., and Halkjær-Kristensen J. "Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons". Int. J. Sports Med. 10:129-131, 1989.
- 139.-Perussia B., Fanning V., and Trinchieri G. "A human NK and K cell subset shares with cytotoxic T cells expression of the antigen recognized by antibody OKT8". J. Immunol. 131:223-231, 1983.
- 140.-Perussia B., and Trinchieri G. "Antibody 3G8, specific for the human neutrophil Fc receptor, reacts with natural killer cells". J. Immunol. 132:1410-1415, 1984.
- 141.-Peter H.H., Friedrich W., Dopfer R., Müller W., Kortmann C., Pichler W.J., Heinz F., and Rieger C.H.L. "NK cell function in severe combined immunodeficiency (SCID): evidence of a common T and NK cell defect in some but not all SCID patients". J. Immunol. 131:2332-2339, 1983.
- 142.-Poffenbarger E.M., Klausner J.S., and Miller W.J. "Natural killer

- cell function in the selenium deficient rat". *Nutr. Res.* 9:581-584, 1989.
- 143.-Poppema S., Visser F., and De Leij L. "Reactivity of presumed anti-natural killer cell antibody Leu7 with intrafollicular T lymphocytes". *Clin. Exp. Immunol.* 54:834-837, 1983.
- 144.-Pross H.F., and Baines M.G. "Studies of human natural killer cells. I. In vivo parameters affecting normal cytotoxic function". *Int. J. Cancer* 29:383-390, 1982.
- 145.-Pross H.F., Rubin P., and Baines M. "The assessment of natural killer cell activity in cancer patients". In *NK Cells and Other Natural Effector Cells*, edited by Herberman R.B., p. 1175. New York, Academic Press, 1982.
- 146.-Quan P.-C., Ishizaka T., and Bloom B.R. "Studies on the mechanism of NK cell lysis". *J. Immunol.* 128:1786-1791, 1982.
- 147.-Quayle A.J., Kelly R.W., Hargreave T.B., and James K. "Immunosuppression by seminal prostaglandins". *Clin. Exp. Immunol.* 75:387-391, 1989.
- 148.-Ransom J.H., and Evans C.H. "Lymphotoxin enhances the susceptibility of neoplastic and preneoplastic cells to natural killer cell mediated destruction". *Int. J. Cancer* 29:451-458, 1982.
- 149.-Reddy M.M., Pinyavat N., and Grieco M.H. "Interleukin 2 augmentation of natural killer cell activity in homosexual men with acquired immune deficiency syndrome". *Infect. Immun.* 44:339-343, 1984.
- 150.-Reynolds C.W., Bere E.W., Jr., and Ward J.M. "Natural killer activity in the rat. III. Characterization of transplantable large granular lymphocyte (LGL) leukemias in the F344 rat". *J. Immunol.* 132:534-540, 1984.
- 151.-Reynolds C.W., and Herberman R.B. "In vitro augmentation of rat natural killer (NK) cell activity". *J. Immunol.* 126:1581-1585, 1981.
- 152.-Reynolds C.W., Sharrow S.O., Ortaldo J.R., and Herberman R.B. "Natural killer activity in the rat. II. Analysis of surface antigens on LGL by flow cytometry". *J. Immunol.* 127:2204-2208, 1981.
- 153.-Riccardi C., Barlozzari T., Santoni A., Herberman R.B., and Cesarini C. "Transfer to cyclophosphamide-treated mice of natural killer

- (NK) cells and in vivo natural reactivity against tumors". *J. Immunol.* 126:1284-1289, 1981.
- 154.-Rola-Pleszczynski M., and Lieu H. "Natural cytotoxic cell activity linked to time of recurrence of herpes labialis". *Clin. Exp. Immunol.* 55:224-228, 1984.
- 155.-Rozental J.M., Kaminska G.M., and Kaminski M.J. "Cultured brain endothelium inhibits the cytotoxic action of natural killer cells on glioma". *J. Neuro-Oncol.* 7:65-70, 1989.
- 156.-Ruco L.P., Procopio A., Uccini S., Marcorelli E., and Baroni C.D. "Natural killer activity in spleens and lymph nodes from patients with Hodgkin's disease". *Cancer Res.* 42:2063-2068, 1982.
- 157.-Saksela E., Timonen T., Rauki A., and Häyry P. "Fractionation, morphological and functional characterization of effector cell responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and cell line targets". *Immunol. Rev.* 44:71, 1979.
- 158.-Salata R.A., Schacter B.Z., and Ellner J.J. "Recruitment of OKM1 staining lymphocytes with selective binding to K562 tumor targets by interferon". *Clin. Exp. Immunol.* 52:185-190, 1983.
- 159.-Savula M.M., and Slivka Y.I. "Natural killer cells in the peripheral blood of patients with tuberculosis, pneumonia and lung cancer". *Probl. Tuberk.* 0:47-49, 1988.
- 160.-Schacter B., Lederman M.M., Levine M.J., and Ellner J.J. "Ultraviolet radiation inhibits human natural killer activity and lymphocyte proliferation". *J. Immunol.* 130:2484-2487, 1983.
- 161.-Schmidt A., Ortaldo J.R., and Herberman R.B. "Inhibition of human natural killer cell reactivity by exogenous adenosine 5'-triphosphate". *J. Immunol.* 132:146-150, 1984.
- 162.-Schroder J., Nikinmaa B., Kavathas P., and Herzenberg L.A. "Fluorescence-activated cell sorting of mouse-human hybrid cells aids in locating the gene for the Leu7 (HNK-1) antigen to human chromosome 11". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3421-3424, 1983.
- 163.-Serrano R., Corona A., Solana R., Monserrat J., Munoz J., and Peña J. "Identification of a tumor factor inducing resistance to NK cell lysis". *Immunol. Lett.* 20:311-316, 1989.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 164.-Shau H., and Dawson J.R. "Regulation of human natural killing by le
vamisole". Cancer Immunol. Immunother. 13:24-29, 1982.
- 165.-Shau H., and Golub S.H. "Modulation of natural killer-mediated ly -
sis by red blood cells". Cell. Immunol. 116:60-72, 1988.
- 166.-Sheil J.M., Gallimore P.H., Zimmer S.G., and Sopori M.L. "Suscepti-
bility of adenovirus 2-transformed rat cell lines to natural killer
(NK) cells: direct correlation between NK resistance and in vivo tu
morigenesis". J. Immunol. 132:1578-1582, 1984.
- 167.-Si L., and Whiteside T.L. "Tissue distribution of human NK cells _
studied with anti-Leu7 monoclonal antibody". J. Immunol. 130:2149-
2155, 1983.
- 168.-Son K., Kew M., and Rabson A.R. "Depressed natural killer cell acti
vity in patients with hepatocellular carcinoma. In vitro effects of
interferon and levamisole". Cancer 50:2820-2825, 1982.
- 169.-Steinhauer E.H., Doyle A.T., Reed J., and Kadish A.S. "Defective na
tural cytotoxicity in patients with cancer: normal number of effec
tor cells but decreased recycling capacity in patients with advan -
ced disease". J. Immunol. 129:2255-2259, 1982.
- 170.-Stein-Streilein J., Bennett M., Mann D., and Kumar V. "Natural ki -
ller cells in mouse lung: surface phenotype, target preference, and
response to local influenza virus infection". J. Immunol. 131:2699-
2704, 1983.
- 171.-Sulica A., Gherman M., Galatiuc C., Manciuiea M., and Herberman R.B.
"Inhibition of human natural killer cell activity by cytophilic i -
mmunoglobulin G". J. Immunol. 128:1031-1036, 1982.
- 172.-Takeuchi M., Nagai S., and Izumi T. "Effect of smoking on natural _
killer cell activity in the lung". Chest 94:688-693, 1988.
- 173.-Talpaz M., Bielski M., and Hersh E.M. "Studies of natural killer _
cell activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity a -
mong patients with acute leukemia in complete remission". Cancer I -
mmunol. Immunother. 14:96-98, 1982.
- 174.-Targan S.R., and Newman W. "Definition of a "trigger" stage in the
NK cytolytic reaction sequence by a monoclonal antibody to the gly-
coprotein T-200". J. Immunol. 131:1149-1153, 1983.

- 175.-Targan S.R., and Oseas R. "The "lazy" NK cells of Chediak-Higashi syndrome". J. Immunol. 130:2671-2674, 1983.
- 176.-Targan S., and Stebbing N. "In vitro interactions of purified cloned human interferons on NK cells: enhanced activation". J. Immunol. 129:934-935, 1982.
- 177.-Tedder T.F., Fearon D.T., Gartland G.L., and Cooper M.D. "Expression of C3b receptors on human B cells and myelomonocytic cells but not natural killer cells". J. Immunol. 130:1668-1673, 1983.
- 178.-Timonen T., Ortaldo J.R., and Herberman R.B. "Analysis by a single cell cytotoxicity assay of natural killer (NK) cell frequencies among human large granular lymphocytes and of the effects of interferon on their activity". J. Immunol. 128:2514-2521, 1982.
- 179.-Timonen T., Ranki A., Saksela E., and Hayry P. "Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts.III. Morphological and functional characterization of the effector cells". Cell. Immunol. 48:121, 1979.
- 180.-Timonen T., and Saksela E. "Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation". J. Immunol. Methods. 36:285-291, 1980.
- 181.-Timonen T., Saksela E., Ranki A., and Hayry P. "Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell line targets". Cell. Immunol. 48:133, 1979.
- 182.-Tollerud D.J., Clark J.W., Brown L.M., Neuland C.Y., Mann D.L., Panikw-Trost L.K., Blattner W.A., and Hoover R.N. "Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells". Am. Rev. Respir. Dis. 139:194-198, 1989.
- 183.-Truesdale A.T., Johnson D.A., Bedigian H.G., Outzen H.C., and Carlson G.A. "Resistance to Moloney murine sarcoma virus-induced tumorigenesis in NK-deficient beige mice". Cell. Immunol. 74:120-125, 1982.
- 184.-Tursz T., Dokhelar M.-C., Lipinski M., and Amiel J.-L. "Low natural killer cell activity in patients with malignant lymphoma". Cancer 50:2333-2335, 1982.
- 185.-Tyring S.K., Chopra V., Johnson L., and Fine J.-D. "Natural killer

- cell activity is reduced in patients with severe forms of inherited epidermolysis bullosa". Arch. Dermatol. 125:797-800, 1989.
- 186.-Uksila J., Lassila O., Hirvonen T., and Toivanen P. "Development of natural killer cell function in the human fetus". J. Immunol. 130: 153-156, 1983.
- 187.-Ullberg M., and Jondal M. "Recycling and target binding capacity of human natural killer cells". J. Exp. Med. 153:615, 1981.
- 188.-Umeda Y., Sakamoto A., Nakamura J., Ishitsuka H., and Yagi Y. "Thymosin α 1 restores NK-cell activity and prevents tumor progression in mice immunosuppressed by cytostatics or X-rays". Cancer Immunol. Immunother. 15:78-83, 1983.
- 189.-Verhoef J., and Sharma S.D. "Inhibition of human natural killer activity by lysosomotropic agents". J. Immunol. 131:125-131, 1983.
- 190.-Voth R., Rossol S., Gallati H., Pracht I., Laubenstein H.P., Hess G., Mueller W.E.G., Schroeder H.C., Jochum C., and Meyer Zum Bueschenfelde K.M. "In vivo and in vitro induction of natural killer cells by cloned human tumor necrosis factor". Cancer Immunol. Immunother. 27:128-132, 1988.
- 191.-Ward J.M., Argilan F., and Reynolds C.W. "Immunoperoxidase localization of large granular lymphocytes in normal tissues and lesions of athymic nude rats". J. Immunol. 131:132-139, 1983.
- 192.-Watanabe M. "Basic studies on the immunologic effects of fever (hyperthermia)". Nagasaki Igakkai Zasshi 62:171-179, 1987.
- 193.-Weigent D.A., Langford M.P., Fleischmann W.R., Jr., and Stanton G.J. "Potentiation of lymphocyte natural killing by mixtures of alpha or beta interferon with recombinant gamma interferon". Infect. Immun. 40:35-38, 1983.
- 194.-Weigent D.A., Stanton G.J., and Johnson H.M. "Interleukin 2 enhances natural killer cell activity through induction of gamma interferon". Infect. Immun. 41:992-997, 1983.
- 195.-Weindruch R., Devens B.H., Raff H.V., and Walford R.L. "Influence of dietary restriction and aging on natural killer cell activity in mice". J. Immunol. 130:993-996, 1983.
- 196.-Werkmeister J.A., Burns G.F., and Triglia T. "Anti-idiotype antibo-

- dies to the 9.1C3 blocking antibody used to probe the lethal hit stage of NK cell-mediated cytotoxicity". *J. Immunol.* 133:1385-1390, 1984.
- 197.-Werkmeister J.A., Helfand S.L., Hallotis T., Pross H.F., and Roder J.C. "The effect of target cell differentiation on human natural killer cell activity: a specific defect in target cell binding and early activation events". *J. Immunol.* 129:413-418, 1982.
- 198.-West W.H., Cannon G.B., Kay H.D., Bonnard G.D., and Herberman R.B. "Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells". *J. Immunol.* 118:355-361, 1977.
- 199.-Williams B.R.G., Read S.E., and Gelfand E.W. "In vitro hyporeactivity to α -interferon in children with severe combined immunodeficiency disease". *Clin. Exp. Immunol.* 56:34-38, 1984.
- 200.-Woda B.A., McFadden M.L., Welsh R.M., and Bain K.M. "Separation and isolation of rat natural killer (NK) cells from T cells with monoclonal antibodies". *J. Immunol.* 132:2183-2184, 1984.
- 201.-Won S.J., Huang K.Y., Kind P., Hung M.Y., and Lin M.T. "Effect of *alpha* agglutinin on natural cytotoxicity of peripheral lymphocytes from normal individuals and patients with nasopharyngeal carcinoma". *Asia Pac. J. Pharmacol.* 3:221-230, 1989.
- 202.-Wright S.C., and Bonavida B. "Selective lysis of NK-sensitive target cells by a soluble mediator released from murine spleen cells and human peripheral blood lymphocytes". *J. Immunol.* 126:1516-1521, 1981.
- 203.-Wright S.C., and Bonavida B. "Studies on the mechanism of natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity (CMC). I. Release of cytotoxic factors specific for NK-sensitive target cells (NKCF) during co-culture of NK effector cells with NK target cells". *J. Immunol.* 129:433-439, 1982.
- 204.-Wright S.C., and Bonavida B. "Studies on the mechanism of natural killer cytotoxicity. III. Activation of NK cells by interferon augments the lytic activity of released natural killer cytotoxic factors (NKCF)". *J. Immunol.* 130:2960-2964, 1983.

- 205.-Yamamoto J.K., Blalock J.E., and Johnson H.M. "Human natural killer-like activity against mouse spleen cells". *Eur. J. Immunol.* 12: 222-227, 1982.
- 206.-Yasukawa M., and Zarling J.M. "Autologous herpes simplex virus-infected cells are lysed by human natural killer cells". *J. Immunol.* 131:2011-2016, 1983.
- 207.-Zaenker K.S., and Kroczeck R.M. "Immunophenotyping, immunointervention and depression in cancer patients: a follow-up study in five bereaved patients". *Int. J. Immunother.* 4:235-242, 1988.
- 208.-Zarling J.M., Clouse K.A., Biddison W.E., and Kung P.C. "Phenotypes of human natural killer cell populations detected with monoclonal antibodies". *J. Immunol.* 127:2575-2580, 1981.
- 209.-Zoller M., Andrighetto G., and Heyman B. "Natural and antibody-dependent killer cells in the thymus". *Eur. J. Immunol.* 12:914-921, 1982.
- 210.-Zucker-Franklin D., Grusky G., and Yang J.-S. "Arylsulfatase in natural killer cells: its possible role in cytotoxicity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6977-6981, 1983.
- 211.-Zucker-Franklin D., Yang J., and Fuks A. "Different enzyme classes associated with human natural killer cells may mediate disparate functions". *J. Immunol.* 132:1451-1455, 1984.