

03062

2A

2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

"DISTINTOS MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL
GENERADOS POR LA CEPA DE RATONES C57BL/6J CONTRA DOS
CELULAS TUMORALES DE ORIGEN MURINO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

RAUL BARRERA RODRIGUEZ

México, D.F.

1990

TESIS CON
FALLA 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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE.

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
Complejo principal de histocompatibilidad	2
Antigenos de linfocitos T	6
Funciones asociadas a la célula T	7
Antigenos menores de histocompatibilidad	12
Mecanismos de evasión a la respuesta inmune	13
Antigenos asociados a células tumorales	14
II. ANTECEDENTES DE LR.4	16
III. ANTECEDENTES DE S.180	17
IV. OBJETIVO	18
V. MATERIAL Y METODOS	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	31
VII. CONCLUSIONES	72
VIII.REFERENCIAS	73
IX. ANEXOS	83

INTRODUCCION.

El término cáncer agrupa un conjunto de enfermedades cuya característica más evidente es la de presentar un crecimiento celular anormal. En algunas ocasiones, la célula cancerosa tiene la capacidad de diseminarse desde el lugar de origen y alcanzar el torrente sanguíneo o el sistema linfático y producir metástasis (1,2).

Son muchos los factores que han sido atribuidos como posibles causantes del cáncer, por ejemplo: radiaciones, agentes químicos, o infecciones virales; todos ellos son capaces de producir neoplasias malignas pero no todos ellos producen los mismos tipos de cancer (2,3).

El sistema inmunológico de los animales juega un papel muy importante en el control del crecimiento de una célula cancerosa. Este sistema es el responsable de vigilar y destruir aquellas células que han sufrido una transformación maligna (2,3, 4).

El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue inicialmente propuesto por Burnet en 1947 con la teoría de la "Sobrevivencia Inmunológica" (ANEXO 1). Esta teoría ha sido comprobada en varios modelos experimentales, ejemplificados por el crecimiento de tumores de distintas especies en ratones desnudos, por el incremento en la aparición de tumores en animales timentomizados, y en humanos que presentan inmunosupresión (3).

En el reconocimiento de una célula tumoral por los

componentes celulares del sistema inmune, las proteínas presentes en la superficie de la membrana de ambos tipos celulares desempeñan un papel muy importante. Estas proteínas incluyen los antígenos clásicos de trasplante, los antígenos Ly y proteínas expresadas de novo como consecuencia de la transformación maligna.

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH).

Los genes del Complejo principal de histocompatibilidad (CPH), que en el ratón se denomina H-2, se encuentran localizados en el cromosoma 17. Estos genes son muy polimórficos y codifican para un grupo de glicoproteínas las cuales se encuentran distribuidas en la mayoría de las células nucleadas del organismo (5,6). Algunas de las funciones asociadas con estas moléculas están relacionadas con el reconocimiento celular y la regulación de la respuesta inmune.

Al conjunto de alelos que comprenden el H-2 de un ratón se le conoce como haplotipo, el cual se denota con una letra minúscula (por ejemplo, la letra d define el haplotipo de BALB/c).

Debido a la alta homología y función de los genes que comprenden el sistema H-2, estos han sido agrupados en tres clases.

A) Moléculas clase I.

Los genes pertenecientes a la clase I (FIG. 1), están comprendidos en los loci K, D/L, Qa y TL, encontrándose el locus

genico K hacia el centrómero y el locus IL hacia el telómero.

La región que comprende los loci K, D/L está constituida por una familia de 25-35 genes estructuralmente homólogos (5-8). Estos genes codifican para una glicoproteína de 45 KDa (cadena α), la cual se asocia de manera no covalente con una proteína no glicosilada de 12 KDa denominada β -2m (cadena β). Esta última cadena es codificada por un locus genico distinto al de H-2 el cual se localiza en el cromosoma 2.

La asociación de β -2m con las moléculas de clase I es requerida para la expresión del complejo en la membrana plasmática (9,10). En la membrana, este complejo se caracteriza por la presencia de cuatro dominios extracelulares, tres de los cuales pertenecen a la cadena α (α 1, α 2 y α 3) y el cuarto pertenece a la β -2m (5,6).

La diversidad presente en las moléculas de clase I se piensa que confiere ventaja en la función de estas proteínas como elementos presentadores de antígeno a los linfocitos Tc (11).

La función de las moléculas codificadas por los loci Qa y IL es desconocida, pero debido a su alta homología con los productos de los loci K y D/L y a que se expresan en células linfoides se ha sugerido que pueden desempeñar algún papel en las interacciones celulares. Estos loci presentan un menor grado de polimorfismo comparado con los loci K y D/L (5,6,12-15).

B) Moléculas clase II.

En el ratón existen siete genes clase II (FIG. 1),

denominados $A\beta 3$, $A\beta 2$, $A\beta 1$, $A\alpha$, $E\beta$, $E\beta 2$, $E\alpha$, y $E\beta 3$, los cuales están localizados en los loci I-A e I-E (5,6,16,17).

A diferencia de los antígenos de clase I, los productos de los genes de clase II presentan una distribución más restringida, siendo expresados por células B, $M\phi$ y células epiteliales (5,6,16).

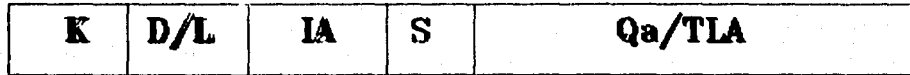
Los productos de estos genes forman un heterodímero compuesto por dos cadenas glicoproteicas denominadas α y β , unidas por un puente disulfuro. Cada una de las cadenas presenta dos dominios extracelulares, una región transmembranal y una región citoplásmica. La cadena α tiene un peso molecular de 34 KDa y la cadena β de 28 KDa (16,17). La función de las moléculas de clase II se asocia con la presentación de antígeno hacia los linfocitos T_H (18).

C) Moléculas clase III.

Los genes de clase III comprenden un grupo de genes cuyos productos tienen funciones distintas a las dos clases anteriores. Así, por ejemplo encontramos cuatro genes para proteínas del complemento (C2, Bf, C4A, y C4B), el gene B de hidroxilasa de ésteres, dos genes para los FNT α y β y un gene para una proteína de choque térmico ("heat shock", HSP) (5,6)

COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD. (H-2).

A)



B)

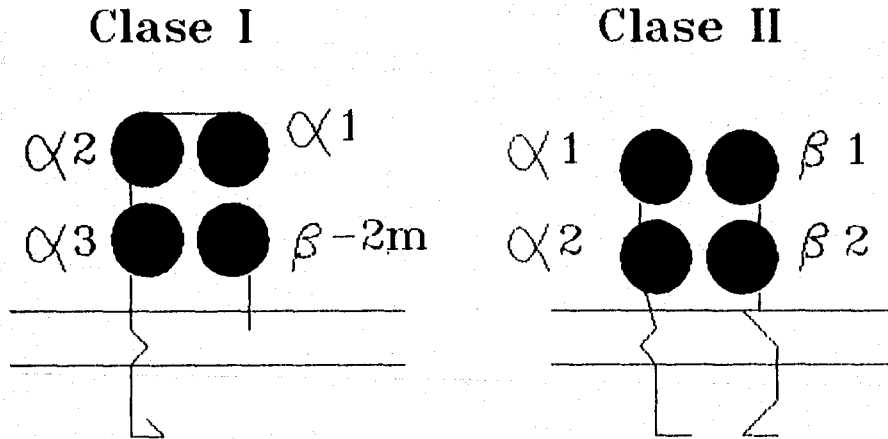


Fig. 1. a) Distribución de las regiones del H-2 en el cromosoma 17; b) Representación esquemática de las moléculas de clase I y clase II del H-2.

ANTIGENOS DE LINFOCITOS T.

Los linfocitos T expresan un gran número de moléculas en la superficie de su membrana, algunas de las cuales fueron inicialmente definidas por el uso de xenoantisueros y más recientemente por el uso de AcMo (19,20).

La población de células T maduras ha sido dividida funcionalmente en varias subpoblaciones las cuales tienen la capacidad de desempeñar funciones específicas (citotóxicas (Tc), supresoras (Ts), ayudadoras (Ta), asesinas naturales (AN). Estas subpoblaciones generalmente expresan antígenos específicos, los cuales han sido utilizados como marcadores para identificar cada uno de estos tipos celulares.

A las proteínas presentes en la superficie de la célula T se les conoce genéricamente como antígenos Ly y a la fecha se conocen cerca de 40 loci que codifican para un número equivalente de proteínas, algunas con formas alélicas (20).

Se ha encontrado que los antígenos Ly son expresados por células T que presentan actividades celulares específicas, y algunos de estos antígenos se presentan en la TABLA I.

TABLA I.

ALGUNOS ANTIGENOS Ly ASOCIADOS CON RECONOCIMIENTO Y PROLIFERACION DE LA CELULA T.

ANTIGENO	PESO MOLECULAR (KDa)	DISTRIBUCION CELULAR	FUNCION	REF
Ly-2 (CD8)	30	LTC	Adhesión	21
Ly-4 (CD4)	52	Ta/Ts	Molécula accesoria en la interacción involucra Ag II del H-2	22
Ly-15 (LFA-1)	177	Tc	Adhesión	23
Ly-37 (CD2)	55-60	T/B	Activación	23
Ly-43 (CD25)	47-53	T/B	Receptor de IL-2	24
Thy-1	25-30	T	Activación	25
RCT		T		
	α, β 45,40		Reconocimiento de Ag y productos del H-2	26
	γ, δ 45,40			
CD3		T	Transducción de señales.	26,27
	ϵ 25-28			28
	δ 20			
	ζ 20			
	η 14			
	θ 10			

FUNCIONES ASOCIADAS A LA CELULA T.

En el rechazo de una célula tumoral por el sistema inmune, éste tiene la capacidad de responder con dos mecanismos básicos: a) mediante una respuesta de tipo celular en la cual proliferan células T reactivas contra el tumor y b) mediante una respuesta humoral en la cual se producen anticuerpos dirigidos contra antígenos propios de la célula tumoral.

A continuación se describen algunas de las actividades celulares con capacidad antitumoral:

a) Tc. Son células con actividad lítica, las cuales reconocen antígenos presentes en las células transformadas (3,5,11).

La proliferación de linfocitos T se origina como una respuesta a antígenos "extraños", los cuales son reconocidos a través del RCT durante las interacciones celulares (18,26,29).

Varios experimentos han mostrado que células presentadoras de antígenos (CPA) primero "procesan" estos antígenos y después los presentan a células Ta en asociación con moléculas de clase II del H-2 (18,30). Durante las interacciones celulares el RCT lleva a cabo un reconocimiento dual, interaccionando concomitantemente con el antígeno y con la moléculas de clase I en el caso de Tc y con moléculas de clase II del H-2 cuando se trata de células Ta (30). Durante las interacciones celulares también están implicadas otras proteínas como CD4 y/o CD8, CD2 y LFA-1 (21-23,29). Datos experimentales recientes sugieren que estas moléculas accesorias no solo desempeñan un papel importante en la adhesión celular, sino que también contribuyen positivamente o negativamente en las primeras fases de la activación de la célula T (31).

El evento de lisis ocurre después del reconocimiento del antígeno por el RCT. Inicialmente se lleva a cabo un estrecho contacto entre la célula efectora y la célula blanco parecido al que se presenta en la terminal sináptica. Posteriormente se

observa una polarización y liberación de granulos secretorios en el Tc dirigidos hacia la membrana de la célula blanco, los cuales contienen enzimas proteolíticas, así como una proteína relacionada a la molécula de C9 llamada perforina o citolisina. Esta última proteína la que parece iniciar el fenómeno de lisis formando poros en la membrana plasmática de la célula blanco, lo cual ocasiona un desequilibrio osmótico y/o la penetración de enzimas proteolíticas Fig 2, (32-34).

b) AN. La actividad de AN se encuentra generalmente asociada a una subpoblación de linfocitos los cuales pueden ser identificados morfológicamente como células de granulos grandes. Esta subpoblación representa el 5% de la población total de linfocitos en la sangre periférica (35).

Característicamente las células AN no presentan capacidad de adherencia, ni capacidad fagocítica y en su tipificación fenotípica se ha encontrado que carecen de inmunoglobulina de superficie y del receptor para la subunidad C3b del complemento. Se ha reportado en estas células la presencia de receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas, lo que permite que estas células puedan llevar a cabo el fenómeno de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (CCDA) (35). Finalmente, otros marcadores también se han reportado, como son: Ly-2 (CD8a), Ly-37 (CD2), Ly-40 (CD11b) B73.1, CD56 y GM-1 (35,36).

CITOTOXICIDAD CELULAR.

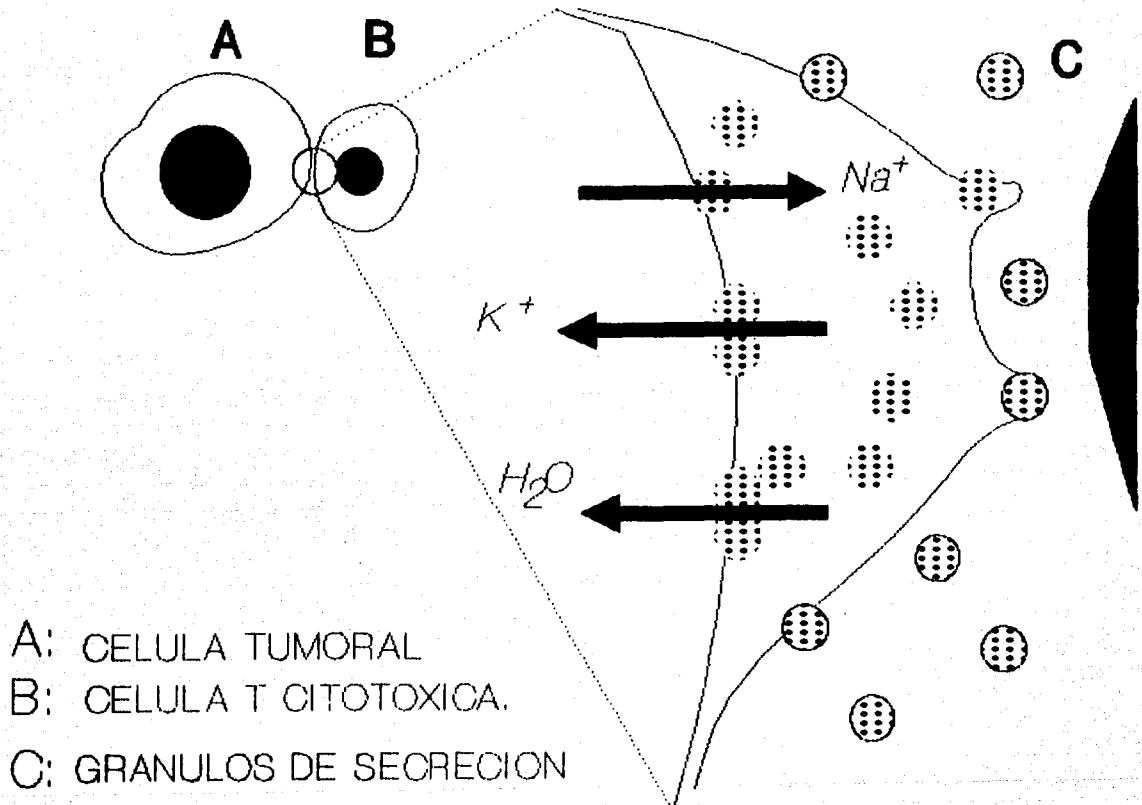


Fig. 2. Citotoxicidad celular. El contacto estrecho entre la célula efectora y la célula blanco, permite que se libere la proteína perforina, formandose poros en la membrana y ocasionando un desequilibrio osmótico, lo cual conduce a la lisis celular.

La actividad de las células AN se ha considerado como una actividad de resistencia natural contra tumores, la cual no se ha encontrado que presente memoria. Las células AN no son las únicas células efectoras de la inmunidad natural, pero durante muchos años han sido reconocidas como células que desempeñan un papel importante en la resistencia natural a tumores (35).

A diferencia de los Tc, el reconocimiento de las AN no está restringido por moléculas clase I del H-2 y se ha encontrado que presentan una fuerte reactividad citotóxica contra células que carecen de la expresión de moléculas clase I del H-2, como es el caso de los carcinomas embrionarios o células que por algún problema genómico (represión de la transcripción por virus, metilación, mutaciones) presentan defectos en la expresión de estas moléculas (35,37-39).

c) LAK. Es una subpoblación de células T la cual se encuentra representada en baja proporción en células T de sangre periférica de un animal adulto. Las células LAK han sido generadas incubando células de bazo en presencia de IL-2 por tiempos prolongados (40). Se ha reportado que esta subpoblación celular presenta un precursor con actividad de AN y capacidad de responder a IL-2 (36). Fenotípicamente las células LAK son CD3⁺ CD4⁻CD8⁻, y se ha encontrado que algunas clonas celulares expresan un RCT $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{1}$ (41). Esta población no es homogénea ya que en estos cultivos pueden encontrar células con actividad de AN, así como células con actividad semejante a Tc (36). Tal y como ocurre con las células AN las células LAK presentan una

actividad lítica no restringida por H-2 (42).

Experimentos in vitro sugieren que la activación de estas células no solo depende de la presencia de IL-2, sino que también FNT desempeña un papel importante (43).

Estas células han sido muy utilizadas en experimentos de inmunoterapia adoptiva tanto en animales de laboratorio, como en humanos; sin embargo, los resultados obtenidos han sido variables (40,42,44).

d) M ϕ . Se ha reportado que los macrófagos bajo ciertas condiciones son capaces de llevar a cabo una acción citotóxica contra células tumorales. Los macrófagos al ser activados, son capaces de producir citocinas como IL-1, FNT- α y β y proteínas del complemento (C1q), para las cuales se ha encontrado una actividad antitumoral (45,46).

Este tipo celular no presenta proteínas que le confieran especificidad hacia antígenos particulares de la célula tumoral; sin embargo, se ha reportado que la unión de anticuerpos a través de receptores para la fracción Fc, presentes en la membrana, pueden conferirle esta especificidad (CCDA) (46-48).

ANTIGENOS MENORES DE HISTOCOMPATIBILIDAD (AmH).

En el rechazo a una célula tumoral no solo los antígenos mayores son importantes, sino que muchas veces en una célula que carece de los mismos, el rechazo puede estar mediado a través de los AmH (49,50).

La naturaleza de los AmH ha sido desde hace algún tiempo un

enigma. En el ratón se ha reportado que existen cerca de 40 loci distribuidos en todo el genoma. Estos genes parecen ser expresados por todas las células del organismo (51).

Estos antígenos fueron originalmente definidos por respuestas de rechazo a injerto y más recientemente por Tc específicos.

Los protocolos diseñados para la producción de AcMo dirigidos contra productos AmH han sido infructuosos y los sueros producidos entre cepas que expresan el mismo H-2 principalmente contienen especificidades contra otros antígenos pero no contra AmH. Parece ser que los AmH únicamente pueden ser reconocidos cuando se encuentran asociados con la molécula de H-2, siendo esta la razón por lo que solo pueden generar una respuesta de tipo celular (52).

Se ha sugerido que los virus pudieran estar involucrados en la generación de algunos AmH. Colombo *et al* en 1987 (53), describieron la adquisición de nuevos AmH en ratones transgénicos los cuales fueron producidos por la inserción de un retrovirus en el genoma de embriones de las cepas singénicas C57B1/6J y 129/J.

Debido a la dificultad para inducir anticuerpos contra este tipo de antígenos, las características bioquímicas de las moléculas codificadas por los genes AmH es aun desconocida.

MECANISMOS DE EVASION A LA RESPUESTA INMUNE.

Muchos son los factores involucrados para que una célula tumoral pueda crecer eficientemente en un organismo.

La pérdida de los antígenos de clase I ha sido

frecuentemente observada en células tumorales tanto en modelos murinos como humanos. Estas células presentan un aumento en su agresividad, así como también en su capacidad metastásica. La falta de expresión estos antígenos en la superficie de la membrana, impide que esta pueda ser reconocida por los Tc y de esta forma escapa a la vigilancia inmunológica (54,55).

En algunas ocasiones las células que expresan los antígenos clase I del H-2, también expresan proteínas las cuales tienen la capacidad de unirse a los antígenos clase I, transformando a la célula tumoral en un fenotipo H-2⁻ (56).

Dentro de los mecanismos de evasión a la respuesta inmune algunas células tumorales tiene la capacidad de secretar proteínas con alta capacidad inmunogénica impidiendo de esta manera que anticuerpos específicos puedan llegar hasta ella (57). Además, se ha reportado que algunas células tumorales carecen de inmunogenicidad, como es el caso de algunos tumores espontáneos humanos (58).

Finalmente algunos tumores tienen la capacidad de estimular una respuesta supresora local, la cual impide que células del sistema inmune logren atacar al tumor (59-61).

ANTIGENOS ASOCIADOS A CELULAS TUMORALES.

Durante muchos años se ha intentado identificar antígenos particulares de una célula tumoral. Al menos tres tipos de antígenos han sido identificados: a) los que son específicos para una célula tumoral (AET); b) aquellos compartidos por varios

tipos de células tumorales (ACT); y c) los antígenos oncofetales (AOF).

Los AET han sido frecuentemente encontrados en tumores generados por agentes químicos o físicos y en algunas ocasiones en tumores espontáneos. Se conocen varios AET y algunos ejemplos de ellos los encontramos en los antígenos expresados en los melanomas humanos y en tumores murinos inducidos en ratones con el uso de agentes físicos o químicos (62-64). Se piensa que los AET corresponden a: 1) versiones alteradas de los antígenos clásicos de trasplante; 2) antígenos inducidos por una infección viral; y 3) modificaciones o rearreglo de moléculas ya existentes.

Los ACT se han encontrado en células transformadas por virus y frecuentemente corresponden a productos de genes virales. Un ejemplo de estos antígenos lo encontramos en la líneas celulares tumorales transformadas por retrovirus (65,66).

Los AOF han sido encontrados en células tumorales en un estadio de diferenciación temprano. Este tipo de antígenos son normalmente expresados durante el desarrollo embrionario (67).

La identificación bioquímica de estos antígenos ha sido difícil y generalmente se han utilizado xenoantisueros o bien AcMo (19).

ANTECEDENTES DE LR.4.

L5178Y es una línea celular linfoide de estirpe T, la cual fué originada por Metil-colantreno en ratones DBA/2 (68). Una clona (LR) obtenida en el laboratorio, mostró capacidad de crecer en cepas de ratones singénicos representantes de distintos haplotipos; i. e. BALB/cAnN, DBA/2J (H-2^d); C57B1/6J y BALB.b (H-2^b); AKR/J y BALB.k (H-2^k). En la mayoría de estas cepas la línea celular creció y causó la muerte del 100% de los animales. Sin embargo, se encontró que la cepa de ratones C57B1/6J fue capaz de controlar y rechazar a esta línea celular.

Esta línea celular fue posteriormente clonada y seleccionada por su resistencia a 5-Bromodeoxiuridina, obteniendose una clona TK⁻ con un cariotipo estable, la cual fue denominada LR.4.

La clona celular presentó las mismas características de crecimiento a través de barrera alogénicas que la línea original, por lo que fue utilizada en todos los experimentos posteriores.

Ensayos de citotoxicidad mediados por anticuerpos, mostraron que antisueros contra moléculas clase I del H-2 fueron incapaces de lisar a las células LR.4 independientemente de la especificidad del antisuero, mientras que las células blancos utilizadas como control fueron lisadas eficientemente. Así mismo, Tc reactivos contra distintas especificidades de H-2 tampoco fueron capaces de lisar a las células LR.4.

Por otra parte, estudios de biología molecular permitieron explicar las bases genéticas del fenotipo de las células LR.4. Hibridaciones en fase solida tipo "Southern" revelaron que la

línea celular LR.4 no contenía transcritos para moléculas clase I del H-2 ni para β -2m. En el caso de los genes que codifican para moléculas clase I no se detectaron arreglos o deleciones en esta región del genoma; sin embargo, el análisis con enzimas de restricción apropiadas mostró niveles elevados de metilación, lo que explica parcialmente la ausencia de transcritos. Por lo que se refiere a β -2m, las células LR.4 tienen deleciones extensas y posiblemente uno de los alelos esté deletado. Todas estas evidencias indicaron que la línea celular LR.4 presenta un fenotipo H-2⁻, el cual permite que esta célula tenga la capacidad de crecer a través de barreras alogénicas.

Experimentos preliminares con varias cepas de ratones transplantados con las células LR.4 mostraron que la cepa C57B1/6J fue la única en donde se generaron anticuerpos con capacidad citotóxica.

ANTECEDENTES DE S.180.

S.180 es una línea celular la cual surgió espontáneamente en la axila de ratones suizos (H-2^o) (69). Debido a que los ratones suizos no son una cepa singénica, el haplotipo de la línea celular fue desconocido.

Las células S.180 han sido utilizadas por su capacidad de crecer a través de barreras alogénicas para la obtención de líquido de ascitis rico en Igs de animales inmunes.

OBJETIVO.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

a) Analizar los mecanismos inmunológicos a través de los cuales la cepa de ratones C57B1/6J es capaz rechazar a la línea celular LR.4, así como también caracterizar el antígeno(s) involucrado en el rechazo.

b) Estudiar con otro modelo celular, el papel de H-2 en el mecanismo de progresión tumoral y la manipulación del sistema inmune para generar una respuesta protectora contra el crecimiento tumoral.

MATERIAL Y METODOS

AMORTIGUADORES UTILIZADOS:

Amortiguador de fosfatos (PBS).

NaCl.....	0.15	M
KCl.....	0.0026	M
NaH ₂ PO ₄	0.008	M
KH ₂ PO ₄	0.0014	M
pH 7.4		

PBS-ASB.

FBS.....	100	ml
ASB.....	3	g
NaN ₃	0.05	g
pH 7.4		

Amortiguador de lisis.

Tris-HCl.....	50	mM
NaCl.....	150	mM
EDTA.....	5	mM
NP40.....	0.5	%
PMSF.....	1	mM
pH 7.4		

Amortiguadores de electroforesis:

Amortiguador de corrida.

Tris-base.....	7.55	g
Glicina.....	14.4	g
SDS.....	1.0	g
H ₂ O.....	1.0	l
pH 8.3		

Amortiguador de muestra.

Tris-HCl.....	80	mM
Glicerol.....	10	%
SDS.....	2	%
Azul de Bromofenol.....	0.001	%
pH 6.8		

Amortiguador concentrador.

Acril-Bis.....	5	%
Tris-HCl.....	125	mM
SDS.....	0.1	%
pH 6.8		

Amortiguador separador.

Acril-Bis.....	10	%
Tris-HCl.....	375	mM
SDS.....	0.1	%
pH 8.8		

Medios de cultivo.**Medio RPMI.**

RPMI-1640.....	10.39	g/l
C ₆ H ₁₂ O ₆	2.5	g/l
NaHCO ₃	2.0	g/l

Medio RPMI-Suplementado.

RPMI.....	1	l
Suero fetal bovino.....	10	%
L-Glutamina.....	2	mM
Piruvato de sodio.....	1	mM
amino-acidos no-esenciales...	0.1	mM
Anfotericina-B.....	50	µg/ml
Sulfato de estreptomicina....	100	µg/ml

Animales:

Se utilizaron ratones de las cepas singénicas BALB/cAnN, DBA/2 (H-2^d); C57BL/6J (H-2^b); CBA/J, C3HeB/FeJ y C3H/HeJ (H-2^k); y A/J (H-2^a); así como ratones de las cepas congénicas BALB/c.C57B1/6-H-2^b (BALB.b) y BALB/c.C3H-H-2^k (BALB.k), del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. Los ratones se alimentaron ad libitum con tabletas de purina y agua.

Ratones hembras de 10-12 semanas fueron utilizados en todos los experimentos.

Líneas celulares:

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se presentan en la TABLA II.

TABLA II.

ORIGEN Y ESTIRPE DE LAS LINEAS CELULARES.

LINEA CELULAR	HAPLOTIPO	CEPA	ORIGEN	ESTIRPE	REF
* LR.4	-	DBA/2	MEC	T	68
* LW.1	d	DBA/2	MEC	T	68
# EL4.4	b	C57B1/6J	DMB	T	70
YAC-1	a	A/Sn	Mo-MuLV	T	71
BW5147	k	AKR/J	Es	T	72
B82	k	C3HeB/FeJ	Es	F	73
L1210	d	DBA/2	MEC	L	74
** 5ab-1	b	C57B1/6J	Es	M	75
** F10-2	b	C57B1/6J	Es	M	76
S.180	?	Suizos	Es	E	69

MEC: Metil colantreno; DMB: 9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno; Es: Espontáneo; Mo-MuLV: Virus de linfoma murino tipo Moloney. T: Linfóide T; L: Leucémico; M: Melanoma; E: Epitelial; F: Fibroblastos

*: clonas derivadas de L5178Y; **: clonas derivadas de la línea de melanoma B16. #: clona celular derivada de la línea celular EL4.4; B82: Fibroblastos de células L

Cultivos celulares:

Las células tumorales se mantuvieron en cultivos in vitro, utilizando medio de cultivo RPMI suplementado. Todos los cultivos in vitro se incubaron a 37°C bajo una atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

La viabilidad celular se determinó por exclusión del

colorante azul tripano.

Propagación in vivo:

El protocolo de propagación consistió en transplantar 1×10^4 células tumorales en animales compatibles (células EL4.4 en C57B1/6J). Sólo en el caso de las líneas celulares LR.4 y S.180 (ambas H-2^d) se utilizaron ratones BALB.k y C57B1/6J respectivamente. Después de dos o tres semanas las células tumorales se obtuvieron de la cavidad peritoneal de los animales y se lavaron con PBS por centrifugación a 200 g durante 10 min.

Tratamiento con Mit-C (77):

Se obtuvieron células LR.4 de la cavidad peritoneal de un ratón, se lavaron 3X con PBS y se determinó su viabilidad. Se trataron 5×10^4 células LR.4 con Mit-C a una concentración final de 25 $\mu\text{g/ml}$ y posteriormente se incubaron a 37°C durante 30 min. Al término de la incubación, las células se lavaron 3X con PBS y se resuspendieron a una concentración de 5×10^4 cels/ml.

Tratamiento con Tunicamicina (78):

Para la depleción de glicoproteínas de membrana, 1×10^7 células tumorales o células provenientes de timo, se incubaron durante 48 hrs en medio de cultivo RPMI completo, suplementado con 5 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina. Al final del tratamiento, las células se lavaron 3X con PBS y 1×10^4 células se utilizaron en el ensayo de inmunofluorescencia.

Marcaje radiactivo con Na^{125}I (79):

Se lavaron 2×10^7 células 3X con PBS y se resuspendieron en un volúmen final de 200 μl . Posteriormente 1×10^7 células en un volúmen de 100 μl se incubaron en una mezcla de reacción preparada con: 300 μCi de Na^{125}I (actividad específica 3.7 GBq/ml), 10 μl de lactoperoxidasa (2 mg/ml), 10 μl de glucosa oxidasa (2 u.i./ml) y 10 μl de glucosa (1.8 mg/ml). La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó incubar durante 20 min/4°C. Posteriormente se adicionaron 9 ml de PBS a 4°C y se lavó 2X por centrifugación a 200 g durante 10 min. El paquete celular resultante se resuspendió en 10 ml de PBS, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 200 g durante 10 min.

Marcaje radiactivo con $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (80):

Se tomaron 1×10^7 células tumorales obtenidas de un cultivo in vitro, se lavaron por centrifugación con PBS y se resuspendieron en 500 μl de medio RPMI. Posteriormente, se adicionaron 300 μCi de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (actividad específica 9.25-18.5 GBq/mg) y se dejó incubando durante 1 hr/37°C. Terminada la incubación las células se lavaron 2X con PBS, se resuspendieron una vez más en 500 μl de PBS y se incubaron una vez más durante 1 hr/37°C. Las células se lavaron con PBS y la concentración celular se ajustó a 1×10^6 cels/ml en RPMI completo .

Extracción de timocitos:

Para la obtención de timocitos se utilizaron ratones de la cepa BALB.b de seis semanas de edad. Los ratones fueron sacrificados por intoxicación con éter y los timos se retiraron quirúrgicamente de la cavidad torácica. Los timos se colocaron en una caja Petri de 35 mm con 10 ml de PBS y posteriormente se disgregaron con la ayuda de dos agujas (20 x 22). Las células obtenidas se lavaron 3X con PBS y la viabilidad se determinó con azul tripano.

Obtención de células de varios tejidos linfoides.

Las células derivadas de médula ósea se obtuvieron mediante la perfusión del fémur con 2-3 ml de medio RPMI al cual se le adicionó heparina para evitar la formación de coágulos.

Los ganglios linfáticos axilares y el bazo se extrajeron con la ayuda de agujas y tijeras finas. Las células derivadas de estos órganos se recuperaron por medio de la disgregación con agujas (20 X 22), como en el caso del timo.

En el caso de las células linfoides de sangre periférica, se colectó sangre de la arteria axilar en tubos heparinizados y las células mononucleares se separaron en un gradiente de Ficoll-hypaque.

Todas las preparaciones celulares se lavaron 3X con PBS, antes de realizar el ensayo de inmunofluorescencia.

Lisis celular (81):

Se lavaron 1×10^7 células se lavaron 2X por centrifugación en PBS y se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de lisis y se incubaron 20 min/4°C con agitación frecuente y vigorosa. Terminada la incubación, el solubilizado se centrifugó a 10,000 g durante 5 min y el sobrenadante se recuperó y almacenó a -70°C.

Protocolos de inmunización:**a) Inmunización contra células LR.4 por crecimiento y rechazo**

Se inocularon ratones C57BL/6J por vía i.p. con 5×10^4 células LR.4. Después de que el tumor creció y fue rechazado (40 días aproximadamente), los animales se inmunizaron 6 veces i.p., con intervalos semanales, con 5×10^4 células vivas de la línea LR.4. Los animales se sangraron 5 días después de la última inmunización y el suero obtenido se almacenó a -20°C.

b) Inmunización con células de LR.4 tratadas con Mit-C.

Se inocularon ratones C57BL/6J por vía i.p. con 5×10^4 células LR.4 tratadas con Mit-C una vez por semana durante 6 ocasiones. Los ratones se sangraron 5 días después de la última inmunización y el suero recuperado se almacenó a -20°C.

c) Inmunización con células derivadas del timo de BALB.b.

Se inocularon ratones de la cepa C57BL/6J con 5×10^4 células del timo de la cepa BALB.b por vía i.p. una vez por semana durante 6 ocasiones. Los ratones se sangraron 5 días después de la última inmunización y el suero se almacenó a -20°C.

Titulación de los antisueros:

Los distintos antisueros en diluciones crecientes se incubaron con los blancos apropiados y sus controles. El título de anticuerpo reactivo se determinó mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta. La dilución mayor a la cual las células presentan fluorescencia perceptible se escogió como dilución de trabajo.

Adsorción de antisueros:

Se incubaron 1×10^7 células de un cultivo apropiado con 100 μ l de antisuero específico durante 1 hr/4°C. El antisuero adsorbido se recuperó por centrifugación y se probó contra blancos y controles adecuados por inmunofluorescencia indirecta.

Inmunofluorescencia indirecta (82):

Las suspensiones celulares obtenidas de un cultivo in vitro o de distintos tejidos linfoides se lavaron 3X con PBS-ASB. Se incubó 1×10^6 células durante una 1 hr/4°C con un antisuero diluido 1:10, en un volumen final de 100 μ l. Al término de la incubación, las células se lavaron 3X en PBS-ASB y resuspendidas en 100 μ l del mismo amortiguador. Posteriormente, las células se incubaron con un segundo anticuerpo anti-Ig de ratón obtenido en cabra, conjugado con isotiocianato de fluoresceína diluido 1:10. Terminada la incubación, las células se lavaron 3X con PBS-ASB y la positividad de la reacción se determinó bajo un microscopio de epifluorescencia Zeiss con lámpara de tungsteno. El porcentaje de

células fluorescentes se determinó contando el número de células positivas con fluorescencia en cien células contadas en campo claro.

Desafío a corto y largo plazo:

En estos experimentos los animales se sincronizaron en los esquemas de inmunización.

(a) En el desafío a corto plazo, tres grupos de 7-10 animales se inmunizaron dos (2X) o cuatro veces (4X) con células LR.4 tratadas con Mit-C. Los animales se desafiaron 5 días después de la última inmunización con 5×10^4 células de LR.4, S.180 ó S.180 respectivamente. En todos los grupos, el experimento se dió por terminado 120 días después de la segunda inmunización y el número de sobrevivientes registrado.

(b) En estos experimentos el protocolo de inmunización fue similar al descrito en (a), aunque los animales se desafiaron 120 días después de la última inmunización con 5×10^4 células de las líneas LR.4 ó S180.

Determinación de proteínas (83):

La determinación de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Lowry-Follin.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (81):

Para la separación de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se utilizó el sistema de amortiguador discontinuo

descrito por Laemmli. La concentración de acrilamida en el gel concentrador fue de 5%, mientras que la del separador fue de 10%. Los geles se corrieron durante 4 h a 100 volts y posteriormente se fijaron con una solución de 50% de metanol y 10 % de ácido acético. El gel fue teñido con azul de Coomassie y posteriormente desteñido con 5% de metanol y 7% de ácido acético.

Inmunoprecipitación (81):

Se trató 1 ml de un lisado de células marcadas isotópicamente con 15 μ l de suero normal de ratón y se incubó 1 hr/37°C. Posteriormente se adicionaron 100 μ l de una suspensión al 10% de Proteína-A-Sefarosa-4B seguida de incubación durante 1 hr/37°C. Las esferas de sefarosa se recuperaron por centrifugación a 10,000 g durante 15 seg. Se tomaron 100 μ l del sobrenadante obtenido y se hicieron reaccionar con 30 μ l del antisuero durante 4 hr/37°C. Los complejos inmunes se recuperaron por la adición de Proteína-A-sefarosa, lavando secuencialmente con: (a) 150 μ l de 0.5 % NP40 en amortiguador Tris-NaCl, (b) 150 μ l de 0.5 % SDS en amortiguador Tris-NaCl y (c) 150 μ l de amortiguador Tris-NaCl. La sefarosa proveniente del último lavado se resuspendió en 20 μ l de urea 8 M y 20 μ l de amortiguador de muestra de electroforesis y posteriormente se hirvió durante 3 min. Los inmunoprecipitados se analizaron en geles de SDS-PAGE y autorradiografía.

Citotóxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (84):

La obtención de M ϕ peritoneales se llevó a cabo inyectando ratones C57Bl/6J hiperinmunes contra la línea celular LR.4, con 5×10^4 células vivas de la misma línea celular. La cavidad peritoneal se lavó 5 días después con 0.34 M de sacarosa a 4°C; las células obtenidas se diluyeron en FBS, se lavaron 2X en FBS y resuspendieron en medio de cultivo RPMI a una concentración final de 1×10^4 cels/ml. La suspensión celular se adicionó en un volumen final de 100 μ l a cada pozo de una placa con 96 y se incubó durante toda la noche. La población de M ϕ se seleccionó por su capacidad de adherencia a las placas después de tres lavados con FBS. En general, el rendimiento en estas condiciones experimentales fue de 1×10^4 M ϕ por pozo.

El sobrenadante de cada pozo se eliminó después de 24 hrs de incubación y en su lugar se adicionaron: 100 μ l células tumorales (1×10^3 células) marcadas con Na 251 CrO $_4$ y 100 μ l de anti-LR.4 o SN de ratón en una de distintas diluciones realizadas en RPMI suplementado. Cada una de estas reacciones se hizo por triplicado. Para facilitar las interacciones celulares, las placas se centrifugaron a 200 g durante 30 seg. El cultivo se incubó 48 hrs/37°C. Al término de la incubación se retiraron 100 μ l de cada pozo y se determinó la cantidad de Na 251 CrO $_4$ liberada bajo las condiciones experimentales utilizando un contador para radiaciones gamma.

El porcentaje de lisis se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CCDA} = (RM - RE / RT - RE) (100)$$

RM= Radiactividad liberada por M₀ y anticuerpos.

RE= Radiactividad liberada por M₀.

RT= Radiactividad total.

Citotoxicidad mediada por anticuerpos (B0):

Se colocaron 1×10^5 células tumorales previamente marcadas con $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ en placas de 96 pozos y se lavaron una vez con PBS. La pastilla celular se resuspendió en 100 μl de antisuero o suero normal a diluciones crecientes con medio RPMI, y se incubó durante 1 hr/4°C. Posteriormente se adicionó en cada pozo 100 μl de complemento de conejo al 12% y se incubó durante 1 hr/37°C. Al término de la incubación, la cantidad de radiactividad liberada en el ensayo se determinó en 100 μl de sobrenadante, utilizando un contador para radiaciones gamma.

El porcentaje de lisis se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = (RTL - REL / RT - RE) (100)$$

RTL: Radiactividad total liberada por el atisuero y complemento.

REL: Radiactividad liberada espontáneamente.

RT : Radiactividad total.

RESULTADOS Y DISCUSION.

CRECIMIENTO Y RECHAZO ALOGENICO

En la Fig 3 se presenta el crecimiento y rechazo alógeno de 1×10^4 células de LR.4 transplantadas en la cepa C57B1/6J. Este se caracterizó inicialmente por un aumento sincrónico en el peso corporal, derivado de un aumento en el volumen presente en la cavidad peritoneal y posteriormente por una disminución gradual asincrónica, en el cual los animales tienden a recuperar su peso inicial.

En la literatura se han reportado varios mecanismos de control y rechazo alógeno de tumores, los cuales están mediados por la acción de Tc dirigidos contra antígenos de transplante (85,86) o contra proteínas específicas de tumores (87). En el rechazo a la línea celular LR.4 la participación de los Tc quedó descartada debido a que la células presentan un defecto en la expresión de los antígenos clásicos de transplante. Cabe destacar sin embargo, que el tiempo transcurrido durante el crecimiento y rechazo fue semejante al reportado en los modelos anteriormente mencionados.

ANALISIS DEL SUERO ANTI-LR.4.

Con la finalidad de determinar los mecanismos a través de los cuales la cepa de ratones C57B1/6J es capaz de controlar y rechazar la línea celular LR.4, analizamos mediante un ensayo de

inmunofluorescencia indirecta, el suero de ratones hiperinmunizados con las células LR.4 (antisuero anti-LR.4) (MATERIAL Y METODOS).

Como se muestra en la TABLA III, el antisuero anti-LR.4 reconoció varias líneas celulares representantes de distintas estirpes, así como también células normales obtenidas del timo de la cepa BALB/cAnN. Por otra parte, el antisuero no reconoció dos clonas celulares denominadas F10-2 y 5ab-1, ambas derivadas de la línea de melanoma B16 (TABLA II). Estos resultados mostraron que el antisuero anti-LR.4 no tiene un reconocimiento específico hacia la línea celular LR.4.

Debido a la reactividad cruzada encontrada con este antisuero, se decidió posteriormente determinar el número de especificidades presentes. Para esto se realizaron adsorciones diferenciales, utilizando en forma independiente la línea celular B82, células obtenidas del timo de BALB/cAnN o ambos tipos celulares (MATERIAL Y METODOS).

En la TABLA IV observamos que el antisuero anti-LR.4 presenta al menos tres especificidades las cuales correspondieron a las líneas celulares LR.4, B82 y a las células linfoides del timo de la cepa BALB/cAnN.

Utilizando otras líneas celulares, cabe la posibilidad de que puedan identificarse más especificidades a antígenos.

Un análisis de microscopía electrónica de la línea celular LR.4 mostró partículas virales en el citoplasma y membrana de algunas células; sin embargo, el tipo de virus no fue identificado (Dr. G. Alfaro, comunicación personal). Otros ejemplos de la existencia de partículas o proteínas de origen viral han sido reportados para las líneas celulares YAC-1 (71) L1210 (88), BW5147 (89) y S.180 (90).

Se ha reportado que todas las cepas de ratones singénicas presentan secuencias de retrovirus insertadas en su genoma y muchas de éstas se encuentran asociadas con los antígenos de diferenciación de linfocitos (Ly) (91). Se desconoce, sin embargo, si estas secuencias de retrovirus corresponden también a los antígenos Ly o bien regulan su expresión (92).

En este estudio, se determinó que el antisuero anti-LR.4 reconoció todas las líneas celulares anteriormente mencionadas así como también las células del timo, por lo que cabe la posibilidad de que uno de los antígenos reconocidos por el antisuero se trate de una proteína de origen viral.

ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL in vivo.

Debido a la reactividad cruzada encontrada in vitro por el antisuero anti-LR.4, se decidió explorar si en experimentos in vivo existía también una protección cruzada contra el crecimiento tumoral de tres líneas celulares, que tienen la capacidad de crecer en la cepa C57B1/6J.

Tres grupos de diez animales de la cepa C57B1/6J que

crecieron y rechazaron las células LR.4 se desafiaron 120 días después del trasplante con 5×10^4 células de las líneas celulares LR.4, EL4.4 ó S.180.

Los resultados mostraron que el grupo de ratones desafiados con las células LR.4 permanecieron inmunes al crecimiento tumoral, mientras que aquellos desafiados con las líneas EL4.4 y S.180, fueron susceptibles al crecimiento del tumor, no siendo protegidos por la inmunización creada por el crecimiento de la línea celular LR.4 y murieron en el mismo lapso que el grupo de ratones no inmunes (FIG. 4).

Cabe mencionar que en un animal de cada uno de los grupos desafiados con las líneas celulares EL4.4 y S.180 respectivamente, el crecimiento tumoral se evidenció más tardíamente con respecto a los grupos control; sin embargo, el crecimiento de las células malignas causó finalmente la muerte de estos ratones. (30 días con las células EL4.4 y 50 días con las células S.180).

De este experimento se puede concluir que la respuesta inmune generada por crecimiento de las células LR.4 es específica in vivo y no confiere protección contra el crecimiento de las líneas celulares de EL4.4 y S.180, al menos con las dosis utilizadas en el experimento.

La inmunidad anti-LR.4 se mantiene activa al menos durante 80 días, ya que el crecimiento y rechazo de las células LR.4 tiene una duración aproximada de 40 días y el desafío se llevó a cabo 120 días después del trasplante.

Los resultados de este experimento contrastan con el análisis del antisuero anti-LR.4, ya que este antisuero reconoció in vitro a las líneas celulares EL4.4 y S.180. Sin embargo, esta reactividad cruzada no permitió que animales inmunes contra las células LR.4 puedan controlar el crecimiento de las líneas EL4.4 y S.180.

Estos resultados sugieren que en los ratones C57B1/6J el rechazo a las células LR.4 es consecuencia de un mecanismo de control complejo, que parece no depender únicamente de la presencia de anticuerpos reactivos contra la línea tumoral y que tal vez involucra también la participación de células reactivas contra el tumor.

ANÁLISIS DE LA DE LA RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL in vivo.

A) DESAFIOS A CORTO Y LARGO PLAZO.

Con la finalidad de determinar el tiempo y el número de inmunizaciones necesarias para que se genere una respuesta inmune capaz de conferir protección contra el crecimiento de la línea celular LR.4, se llevaron a cabo protocolos de inmunización en la cepa C57B1/6J utilizando como inmunógeno células LR.4 tratadas con Mit-C. Se inmunizaron grupos de 10 animales con dos o cuatro inoculaciones de células LR.4 tratadas con Mit-C, y se desafiaron 5 días después de la última inmunización con una de las siguientes líneas celulares: LR.4, EL4.4 ó S.180 (MATERIAL Y METODOS).

Así mismo, con la finalidad de determinar la duración de la respuesta inmune protectora al crecimiento de la línea celular LR.4, se inmunizaron grupos de 10 animales dos o cuatro veces y se desafiaron 100 días después de la última inmunización con las líneas celulares LR.4 ó S.180 (MATERIAL Y METODOS).

Los resultados encontrados mostraron que dos o cuatro inmunizaciones son suficientes para proteger a los animales contra el crecimiento de las células LR.4, cuando el desafío se realiza poco tiempo después de la inmunización. En esta protección, la respuesta inmune temprana parece desempeñar un papel importante, ya que solo 12 días (dos inmunizaciones) fueron suficientes para proteger al 90% de los animales (TABLA V, Exp.A).

Cuando el desafío con las células LR.4 se llevó a cabo 100 días después de la última inmunización, se observó que la inmunidad anti-LR.4 tuvo una duración limitada y dependió del número de inmunizaciones (TABLA V, Exp.B).

En el caso de los animales desafiados 5 días después de la última inmunización con la línea celular S.180, se determinó un aumento en la protección contra el crecimiento de esta línea tumoral, el cual dependió del número de inmunizaciones. Este aumento sin embargo, alcanzó un porcentaje máximo (40%) únicamente cuando habían transcurrido un periodo de 26 días (cuatro inmunizaciones) (TABLA V, Exp.A); por otra parte en la

protección contra la línea LR.4, la respuesta inmune temprana no parece desempeñar un papel importante en el control de esta línea tumoral.

Por otra parte, cuando el desafío se llevó a cabo 100 días después de la última inmunización, la inmunidad anti-S.180 presentó una disminución evidente en los animales inmunizados cuatro veces, la cual sin embargo no fue equivalente a la disminución observada con la inmunidad anti-LR.4 (TABLA V, Exp.B).

Por lo que se refiere a el desafío a corto plazo con la línea celular EL4.4, el número de inmunizaciones no influyeron en su crecimiento, por lo que no se realizaron los experimentos a largo plazo.

B) ANALISIS DE SUEROS DE ANIMALES INMUNIZADOS CON CELULAS LR.4 TRATADAS CON MIT-C Y SANGRADOS A CORTO Y LARGO PLAZO.

El análisis del suero de grupos ratones inmunizados en paralelo dos o cuatro veces con células LR.4 tratadas con Mit-C y sangrados 5 ó 100 días después de la última inmunización mostró la existencia de reactividad contra las líneas celulares LR.4, EL4.4 y S.180.

Es probable que la reactividad de anticuerpos detectada in vitro, sea en parte responsable de la protección contra el

crecimiento de las células LR.4 y del aumento en la protección de los ratones desafiados con la línea celular S.180 (con ambos tipos celulares, dosis mayores de 1×10^5 células son capaces de crecer en el 100% de ratones C57B1/6J no inmunes).

Debido a las diferencias encontradas en la inmunidad anti-LR.4 y anti-S.180, es probable que la inmunización con células LR.4 tratadas con Mit-C, genere un mecanismo de inmunidad antitumoral en el cual la respuesta inmune temprana sea capaz de controlar eficientemente el crecimiento de las células LR.4, mientras que en el control del crecimiento de la línea S.180 se necesita la activación de otros componentes del sistema inmune, los cuales sin embargo no son capaces de controlar en un 100% el crecimiento de este tumor. Desconocemos por otra parte, si la actividad de anticuerpos anti-LR.4 y anti-S.180, está mediada por anticuerpos de un isotipo distinto, lo cual en parte también podría explicar las diferencias encontradas.

Los resultados encontrados con el aumento en la sobrevivencia contra la células S.180 contrastan con los encontrados con la inmunización activa generada por crecimiento de células LR.4, en donde a pesar de la existencia de reactividad anti-S.180, no se encontró aumento en la sobrevivencia de los animales retados con células de S.180.

Comparativamente, ambos protocolos de inmunización presentaron diferencias en cuanto a la inmunidad generada.

Experimentos llevados a cabo en el laboratorio han mostrado que la protección contra el crecimiento de la línea LR.4 se mantiene más de 100 días después del rechazo, mientras que la respuesta inmune generada por células LR.4 tratadas con Mit-C es de una menor duración. Lo anterior puede explicarse debido a que el tiempo en que la respuesta inmune está en contacto con el antígeno en el crecimiento y rechazo es de al menos 40 días (FIG. 3), mientras que en el caso de las inmunizaciones con células LR.4 tratadas con Mit-C, cuando se utilizaron cuatro inmunizaciones es de aproximadamente 26 días. Además, el número de células tumorales en la fase máxima de crecimiento alcanza valores de hasta 1×10^9 células.

La Mit-C es un agente alquilante el cual tiene la capacidad de unirse al DNA y ocasionar un gran número de rompimientos cromosómicos, lo cual ocasiona la muerte celular. Este mecanismo de acción, tal vez altere, la síntesis de algunas proteínas de la membrana plasmática afectando principalmente aquellas que presentan un recambio acelerado. Si esto sucediera, es probable que la composición proteica de la membrana de células tratadas con Mit-C sea distinta a la de células no tratadas, lo cual explicaría en parte, algunas de las diferencias en la respuesta inmune generada por las células LR.4 tratadas con Mit-C y la generada por crecimiento del tumor.

Finalmente, el agente alquilante Mit-C se ha encontrado que tiene la capacidad de unirse a proteínas. Esta unión tal vez genere epitopes "nuevos", los cuales sean en parte responsables

de las diferencias encontradas.

Por otra parte, analizando la respuesta inmune generada por células LR.4 tratadas con Mit-C, encontramos que la protección contra el crecimiento tumoral comenzó a perderse a los 100 días, a pesar de la presencia de anticuerpos. Haagensen *et al* (93) reportaron una respuesta inmune contra una línea celular de adenocarcinoma denominada AD-755, la cual se mantiene activa aproximadamente 100 días y es mediada por anticuerpos y M ϕ . Se tienen evidencias también de que la inmunización pasiva con células T confiere protección contra el crecimiento tumoral de la línea celular L1210 durante cerca de 90 días (87) y por otra parte, se ha reportado que actividades de anticuerpo contra el hapteno 2-fenil-oxazol (phOx) pueden determinarse en un título considerable un año después de que animales de la cepa BALB/c fueron inmunizados (94).

Los datos anteriores sugieren que la respuesta inmune antitumoral mediada por células es de menor duración que la respuesta de anticuerpos contra el tumor. Varios modelos experimentales han demostrado la participación de anticuerpos y células reactivas, en el control del crecimiento tumoral (90, 95, 96.). En el caso de la respuesta contra la línea LR.4, es probable que también se lleve a cabo la participación de células del sistema inmune y anticuerpos en el control del tumor.

POSIBLES ACTIVIDADES CELULARES INVOLUCRADAS EN EL RECHAZO.

LR.4 es una línea celular deficiente en la expresión de los antígenos clase I del H-2. Es debido a esta falta de expresión, que la línea celular puede escapar a la acción lítica de los Tc. El sistema inmune, sin embargo, presenta otras actividades celulares las cuales podrían ser las responsables del rechazo, tales como la actividad de AN, M ϕ , y "LAK".

La actividad de AN ha sido reportada como una actividad natural contra tumores. Los siguientes puntos sugieren que la actividad de AN no es importante en el rechazo a la línea LR.4:

a) En el rechazo a la línea celular LR.4 primero se observó un crecimiento de las células tumorales, antes de que pudieran ser controladas y posteriormente rechazadas; b) experimentos con células AN obtenidas de CBA/J tratados con poli-I-C, mostraron que la línea LR.4 no es lisada por esta actividad celular, mientras que la línea celular YAC-1 utilizada como control es lisada eficientemente (97) y c) se ha reportado que la proteína citolisina no es capaz de llevar a cabo la lisis de la línea celular L517BY (línea celular de la cual derivó LR.4) (35).

ACTIVIDAD ANTI-LR.4 DE LOS M ϕ .

Estudios llevados a cabo en la fase terminal del rechazo mostraron la presencia de M ϕ , los cuales parecen estar fagocitando restos celulares. En varias ocasiones se ha reportado que los M ϕ presentan una actividad importante en el rechazo a

tumores. Algunas veces esta actividad antitumoral puede ser mediada por anticuerpos específicos contra antígenos tumorales (45-48).

Para determinar la participación de los M ϕ en el rechazo a la línea LR.4, realizamos experimentos de CCDA con M ϕ obtenidos de animales hiperinmunes contra la línea celular LR.4 y antisuero anti-LR.4 (MATERIAL Y METODOS). Este tipo de M ϕ fue escogido debido a que su "activación" ha sido alcanzada mediante una interacción directa con la célula tumoral, por lo que su utilización se acerca más a la actividad presentada *in vivo* durante el rechazo.

Cuando se utilizó una relación M ϕ : línea celular de 10:1, encontramos que a distintas diluciones del antisuero anti-LR.4 se produjo lisis de las células LR.4, la cual siempre fue mayor que la lisis producida cuando se usó suero normal en el ensayo (FIG. 5).

Estos resultados mostraron que los M ϕ de animales hiperinmunes pueden llevar a cabo una actividad anti-LR.4, la cual es mediada por anticuerpos. Cabe destacar que un análisis histológico de los distintos tipos celulares presentes durante el crecimiento y rechazo, mostró que M ϕ fagocitando células tumorales, se encuentran únicamente al final de la fase de rechazo, por lo que es probable que otra actividad celular este también participando en el control y rechazo de la célula tumoral.

OTRAS ACTIVIDADES INVOLUCRADAS EN EL RECHAZO.

Se ha reportado que las células "LAK" presentan una actividad antitumoral la cual no es restringida por H-2 (40). Esta actividad celular podría también ser responsable del control y rechazo de las células LR.4, sin embargo, aun no ha sido determinada.

Finalmente, se han propuesto otros dos mecanismos importantes en el rechazo a tumores:

a) El reconocimiento de una célula tumoral a través de AmH. En este mecanismo sin embargo, el reconocimiento de estos antígenos se lleva a cabo generalmente en el contexto de los antígenos clase I del H-2 (49,50,52). Debido a que la línea celular LR.4 no expresa los antígenos clase I, no se exploró la participación de los AmH en el rechazo.

b) Por otra parte se ha reportado que algunas citocinas como IL-1 (98), IL2 (40), IL-6 (99), INF- α y INF- γ (100) FNT- α (101), FNT- β (101) y FGE₂ (102) presentan actividad antitumoral.

Experimentos preliminares con el líquido de ascitis de animales con tumor mostraron la presencia de una actividad capaz de inhibir la formación de placas líticas ocasionada por el virus de VSV en monocapas de células L (datos no mostrados). Esta actividad inhibitoria podría ser mediada por la presencia de INF- γ .

Si las citocinas desempeñan un papel importante en la respuesta antitumoral, el mecanismo de acción podría estar

conducido por IL-2 e INF- γ , las cuales activarían células T (AN y "LAK") y M ϕ respectivamente. Otras citocinas podrían también ser producidas como consecuencia de la activación celular; lo cual al final nos conduce a la formación de una red de respuesta antitumoral en la que participan citocinas, anticuerpos y células activadas, la cual permite el control y rechazo de la línea tumoral (FIG 6).

ANALISIS DEL ANTIGENO(S) PRESENTE EN CELULAS DEL TIMO.

PATRON DE REACTIVIDAD ANTI-LR.4 EN CELULAS DEL TIMO.

Como el antisuero anti-LR.4 reconoció células del timo de la cepa BALB/cAnN, se exploró la reactividad de este antisuero en células del timo obtenidas de distintas cepas singénicas. Los resultados mostraron que el antisuero anti-LR.4 reconoció las células del timo de todas las cepas probadas con la excepción de las células de la cepa C57B1/6J (TABLA VI). Este resultado demostró que las células LR.4 comparten un antígeno con las células del timo de todas las cepas de ratones estudiadas, con la excepción de C57B1/6J.

PROTECCION ANTI-TUMORAL INDUCIDA POR CELULAS DEL TIMO.

Para comprobar la participación de este antígeno en la respuesta anti-LR.4, se llevó a cabo un protocolo de inmunización semisingénico, inmunizando ratones de la cepa C57B1/6J con

células del timo de la cepa BALB.b. La utilización de este protocolo nos permitió generar anticuerpos contra antígenos presentes en la células del timo, descartando la producción de anticuerpos anti-H-2 (MATERIAL Y METODOS). Los animales hiperinmunes fueron posteriormente desafiados con 5×10^4 células LR.4, EL4.4 ó S.180 y el porcentaje de sobrevida fué registrado.

Los resultados mostraron que mediante este protocolo de inmunización se generó una respuesta inmune protectora contra el crecimiento de las células LR.4 (TABLA VII). En el caso de los animales desafiados con las células S.180 se encontró que la sobrevida aumentó en un del 25%, mientras que en los animales desafiados con las células EL4.4 no se encontró ningún aumento en su sobrevida.

Estos resultados comprobaron la existencia de un antígeno compartido por las células LR.4 y células del timo, el cual desempeña un papel importante en la generación de inmunidad contra el crecimiento de las células LR.4 y probablemente también esté involucrado en la respuesta de rechazo.

El aumento observado en la sobrevida contra la línea celular S.180 no ha podido ser explicado. Sin embargo, a diferencia de la respuesta inmune generada por las células LR.4, la respuesta inmune producida por las células del timo parece ser consecuencia de un mecanismo inespecífico de actividad antitumoral, ya que a pesar de que los animales fueron hiperinmunizados, solo se

alcanzo un 25% de aumento en la protección.

ALGUNAS CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL ANTIGENO(S) RECONOCIDO POR ANTI-TBB.

Con el propósito de caracterizar el determinante antigénico reconocido por el suero de ratones hiperinmunes contra timos de BALB.b (anti-TBB), se trataron con tunicamicina células LR.4 y células del timo de BALB.b (MATERIAL Y METODOS).

Los resultados mostraron que el tratamiento con tunicamicina no inhibió el reconocimiento del antisuero contra ambos tipos celulares, por lo que el determinante antigénico reconocido por el antisuero anti-TBB no está determinado por cadenas glicosídicas y tal vez pudiera tratarse de un antígeno de naturaleza proteica (TABLA VIII). El efecto de la tunicamicina en estos experimentos se demostró por la pérdida de la capacidad de aglutinación ocasionada por la lectina fitohemaglutinina.

ESPECTRO DE REACTIVIDAD DE ANTI-TBB EN LINEAS CELULARES.

Un análisis del antisuero anti-TBB por inmunofluorescencia mostró que éste presenta una mayor especificidad que el antisuero anti-LR.4, ya que únicamente reconoció líneas celulares linfoides y una línea de fibroblastos (TABLA IX).

En este análisis la línea celular EL4.4 no fue reconocida, debido tal vez a que proviene de la cepa C57B1/6J, en la cual no se encontró expresión del antígeno reconocido por anti-TBB en las células del timo. El reconocimiento de esta línea celular por el

antisuero anti-LR.4 fué probablemente debido a las otras especificidades presentes en este antisuero.

REACTIVIDAD DE ANTI-TBB EN CELULAS DEL TIMO.

El espectro de reactividad de anti-TBB con células del timo de distintas cepas de ratones mostró que todas las cepas estudiadas, con la excepción de la cepa de ratones C57B1/6J, expresan un antígeno que es reconocido por este antisuero (TABLA X).

Con estos resultados se determinó que este antígeno es expresado en varias cepas de ratones, las cuales son representantes de distintos troncos genealógicos de las cepas singénicas (ANEXO 2). La cepa singénica C57B1/6J se generó desde el año 1914 y presenta un ancestro distinto a las otras cepas de ratones. Se desconoce si a través de la historia natural de la cepa de ratones C57B1/6J, se perdió la capacidad de expresión de este antígeno.

PATRON DE REACTIVIDAD DE ANTI-TBB EN TEJIDOS LINFOIDES.

Al analizar el patrón de reactividad de anti-TBB contra células de distintos tejidos linfoides de la cepa BALB.b, se observó que este antisuero únicamente reconoció células presentes en timo y ganglios linfáticos, mientras que no reaccionó con células de los otros tejidos linfoides (TABLA XI).

Cabe la posibilidad de que este antígeno presente una menor expresión en células CMN y en las células del bazo, pero debido a

la limitada sensibilidad de la técnica de inmunofluorescencia, ambos tejidos fueron negativos en la expresión.

Estos resultados sugieren que el antígeno reconocido por anti-TBE puede desempeñar un papel importante en la localización de la célula T en los distintos tejidos linfoides. A algunas de las proteínas que presentan una expresión preferencial y que son importantes para la localización de la célula T, se les ha denominado como proteínas "homing" (103,104).

Existen algunas moléculas que por sus modelos de expresión diferencial en cepas singénicas de ratones, podrían corresponder al antígeno compartido por las células LR.4 y células del timo. Estas son : a) la molécula I-E (105); b) el RCT (106); c) algunos antígenos de la región Qa/TL (15); y d) el antígeno Ly 31.1 (107, 108).

Con hibridaciones tipo "Southern" se demostró que la línea celular LR.4 tiene una delección que incluye a los genes I-A α e I-A β , sin embargo, se ha podido determinar si esta alteración se extiende a los genes I-E.

Por otra parte, la línea celular LR.4 ha perdido los genes de la subunidad β de RCT, mientras que los genes de la subunidad ϵ se encontraron en línea germinal, por lo cual los productos de estos genes fueron descartados como candidatos a ser reconocidos por el antisuero. En cuanto a los genes de la subunidad γ del RCT, la línea LR.4 presentó un rearrreglo de los mismos y debido a

que no se conocen los patrones de expresión de estos genes y la existencia de alguna familia de la región variable que presente un modelo de expresión diferencial en cepas de ratones parecido al reportado para la familia V β 8 del RCT (106); cabe la posibilidad de que los productos de estos genes pudieran estar siendo reconocidos por el antisuero anti-TBB.

Con respecto a los antígenos de la región Qa/TL, hasta el momento se sabe muy poco de los patrones de expresión de los mismos en distintas cepas de ratones (12,13). Sin embargo, el hecho de que los productos de los genes Qa/TL requieren para ser expresados la presencia de β -2m y de que la cepa de ratones congénicos BALB.b comparte la misma región del H-2 con la cepa C57B1/6J, en consecuencia los productos de estos genes no pueden ser el antígeno compartido entre las células del timo y la línea celular LR.4.

Finalmente, Tada et al describieron en 1984 la generación de un AcMo el cual reconoce un antígeno en células T denominado Ly-31.1 y que ha sido recientemente identificado como una fosfatasa (107,108). Este antígeno presentó un modelo de expresión en células T de distintas cepas de ratones, parecido al encontrado con el antisuero anti-TBB. Comparando los patrones de expresión observados con anti-TBB y los reportados para Ly.31.1 en células de distintos tejidos linfoides, se encontraron diferencias sustanciales, por lo que puede tratarse de dos antígenos distintos (TABLA XI).

Se han reportado otros modelos experimentales en donde se generan anticuerpos contra células del timo. En un estudio llevado a cabo por Fuji y Milgrom (109) se encontró que células B del bazo de ratones de la cepa DBA/2J pueden producir anticuerpos contra timos autólogos. En un ensayo de formación de placas líticas, estos anticuerpos mostraron que también reconocen timos provenientes de varias cepas de ratones, incluyendo la cepa C57B1/6J, así como también la línea celular L5178Y.

Inmunizando ratones de la cepa BALB.b con células del timo de C57B1/6J se produjo un antisuero el cual no es capaz de discriminar entre las células del timo de distintas cepas de ratones (datos no mostrados). Los resultados con este antisuero son parecidos a los encontrados en el sistema in vitro utilizado por Fuji y Milgrom, sin embargo son distintos a los obtenidos con el antisuero anti-TBB.

El hecho de que se puedan generar antisueros contra timos autólogos sugiere que existen antígenos que se expresan únicamente en células T que residen en timo, los cuales nunca han sido "vistos" por el sistema inmunológico.

En nuestro sistema la cepa de ratones C57B1/6J es capaz de generar una respuesta de anticuerpos contra el antígeno presente en células del timo de la cepa BALB.b, debido a que sus propias células T del timo no expresan este antígeno, eliminando además la posibilidad de una respuesta de tipo autoinmune.

ANALISIS DEL CRECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR S.180.

Debido a que en la literatura no se menciona el tipo celular a que pertenece la línea celular S.180, inicialmente se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico para definir la presencia de distintos marcadores celulares.

Los resultados encontrados mostraron que esta línea celular reaccionó con anticuerpos contra vimentina y keratinas, mientras que no lo hizo con anticuerpos contra mioglobina y α -1-quimiotripsina. Este perfil inmunohistoquímico definió a la línea celular S.180 como un sarcoma.

CRECIMIENTO ALOGENICO DE LA LINEA S.180.

Con la finalidad de determinar la capacidad de crecimiento a través de barreras alogénicas de la línea celular S.180, se transplantaron varias cepas de ratones singénicos por vía i. p. con 1×10^4 células tumorales (MATERIAL Y METODOS). Los resultados encontrados mostraron que esta línea celular tuvo la capacidad de crecer y causar la muerte de todas las cepas de ratones estudiadas (Fig. 7).

El crecimiento de un tumor a través de barreras alogénicas ha sido frecuentemente asociado a alteraciones en las moléculas clase I del H-2. Se ha reportado que la falta de expresión o el enmascaramiento de este tipo de moléculas impide que los Tc puedan reconocer y lisar a la célula tumoral (55).

Sin embargo, no todas las moléculas de clase I parecen tener la misma importancia en el desarrollo del tumor. Así, se ha encontrado que la falta de expresión de la molécula K^b correlaciona con un fenotipo más agresivo y con capacidad metastásica. Contrariamente, las moléculas D^b y D^k no parecen influenciar el desarrollo del tumor, mientras que D^b y K^k solo lo hacen en un grado intermedio (110).

En células tumorales se ha encontrado que defectos en la expresión la molécula β -2m correlaciona con una falta de expresión de las moléculas clase I del H-2 en la membrana plasmática (9,10). Cabe destacar sin embargo, que no todas las moléculas del H-2 parecen ser afectadas ya que recientemente se ha reportado que las moléculas L^d y D^b pueden ser expresadas en ausencia de β -2m (111, 112)

Experimentos de hibridación tipo "Northern" llevados a cabo en el laboratorio mostraron que las células S.180 no expresan mRNA para la molécula β -2m (manuscrito en preparación). Es probable que esta falta de expresión de β -2m convierta a la células S.180 en un fenotipo H-2⁻ y sea esta la razón del crecimiento alogénico observado.

Finalmente, para determinar si el crecimiento alogénico encontrado es un fenómeno que depende de la dosis utilizada, se transplantaron ratones de la cepas BALB/cAnN y C57Bl/6J con dosis de 1×10^3 a 1×10^6 células tumorales. Los resultados mostraron

que aun a dosis bajas (1×10^3 células tumorales), el tumor creció y causó la muerte del 100% de los animales.

PROTECCION INDUCIDA POR INMUNIZACION CON CELULAS S.180 TRATADAS CON MIT-C.

Con la finalidad de generar una respuesta inmune protectora contra el crecimiento de la línea S.180, se inmunizaron tres grupos de 10 ratones de la cepa C57B1/6J con células S.180 tratadas con Mit-C y posteriormente se retaron con una de las siguientes líneas celulares: S.180, LR.4 ó EL4.4 (MATERIAL Y METODOS).

Los resultados demostraron que bajo estas condiciones experimentales se despertó una respuesta inmune específica, ya que los animales desafiados con las célula S.180 permanecieron sin evidencias de crecimiento tumoral por más de 50 días de seguimiento, mientras que en el caso de los grupos de animales desafiados con LR.4 ó EL4.4, se encontraron, en ambos casos crecimiento tumoral.

Estos resultados contrastan con la inmunidad encontrada cuando ratones de la misma cepa se inmunizaron con células LR.4 tratadas con Mit-C, en donde se observó una reactividad cruzada contra las células S.180. En estos experimentos, las células LR.4 parecen compartir un antígeno con S.180, el cual genera una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer tanto las células LR.4, como a las células S.180. Sin embargo, en el caso de la

inmunización con las células S.180 tratadas con Mit-C, se despierta una respuesta inmune específica, probablemente mediada por un antígeno distinto al que es compartido con las células LR.4. Las diferencias en inmunogenicidad de los antígenos son probablemente debidas a la distinta estirpe celular de ambos tumores. Otra posibilidad para explicar las diferencias encontradas, es que las células tumorales sean capaces de dirigir la respuesta antitumoral, mediante la regulación de las células del sistema inmune (Ts o Ta), como ha sido encontrado en el caso del crecimiento de las líneas celulares L5178Y y B16 en ratones de las cepas DBA/2 y C57B1/6J respectivamente (59,60).

REACTIVIDAD DEL ANTISUERO ANTI-S.180.

El análisis mediante un ensayo de inmunofluorescencia de sueros obtenidos de animales inmunizados con células S.180 tratadas con Mit-C, mostró más evidencias de la especificidad de esta respuesta ya que los antisueros solo reconocieron la línea celular S.180 y no reconocieron otras líneas celulares representantes de distintos tipos celulares (TABLA XII). Además el antisuero anti-S.180 fue citotóxico en presencia de complemento contra la línea celular S.180 (FIG. 8).

Estos resultados sugieren que la respuesta inmune protectora anti-S.180 generada por células S.180 tratadas Mit-C puede estar mediada por la generación de anticuerpos específicos contra la línea celular.

Benjamini *et al* (77) y Kawashima *et al* (95) encontraron que una respuesta antitumoral en sistemas alogénicos puede estar mediada por células reactivas y anticuerpos específicos contra el tumor. Es probable que en el caso de la protección anti-S.180, también se generen células reactivas, en las cuales el reconocimiento de los antígenos tumorales no depende de la presencia de H-2; es decir AN, "LAK", M ϕ . Sin embargo, el papel de los anticuerpos en la protección contra el crecimiento de esta línea celular parece ser de mucha importancia, a diferencia del papel que juegan los anticuerpos en la protección contra las células LR.4.

Los resultados de estos experimentos sugieren que cada línea tumoral despierta distintos mecanismos inmunológicos contra el crecimiento de un tumor. La inmunización con células LR.4 despierta una respuesta humoral de anticuerpos contra las líneas celulares LR.4 y S.180, así como también una respuesta celular, la cual parece ser menos específica cuando las células LR.4 son tratadas con Mit-C. Por otra parte, la inmunización con células S.180 tratadas con Mit-C despierta una respuesta inmune específica, en donde únicamente se generan anticuerpos contra las células S.180 y la respuesta celular desempeña un papel menos importante en el control del tumor.

Finalmente, algunos reportes han descrito la presencia de anticuerpos en ratones que han sido transplantados con líneas celulares de carcinoma. Experimentos preliminares con

inmunoprecipitados, mostraron que el antígeno(s) reconocido por el antisuero anti-S.180 reconoce moléculas de alto peso molecular.

En estos dos modelos de estudio, hemos visto que la respuesta antitumoral es muy compleja, y depende del tipo celular. En el caso del rechazo de la línea celular LR.4, se requiere la participación de la respuesta humoral y la respuesta celular, mientras que en el caso de la protección contra el crecimiento de la línea celular S.180, la respuesta inmune humoral parece desempeñar un papel más importante.

CRECIMIENTO ALOGENICO DE LR.4 EN RATONES DE LA CEPA C57BI/6J.

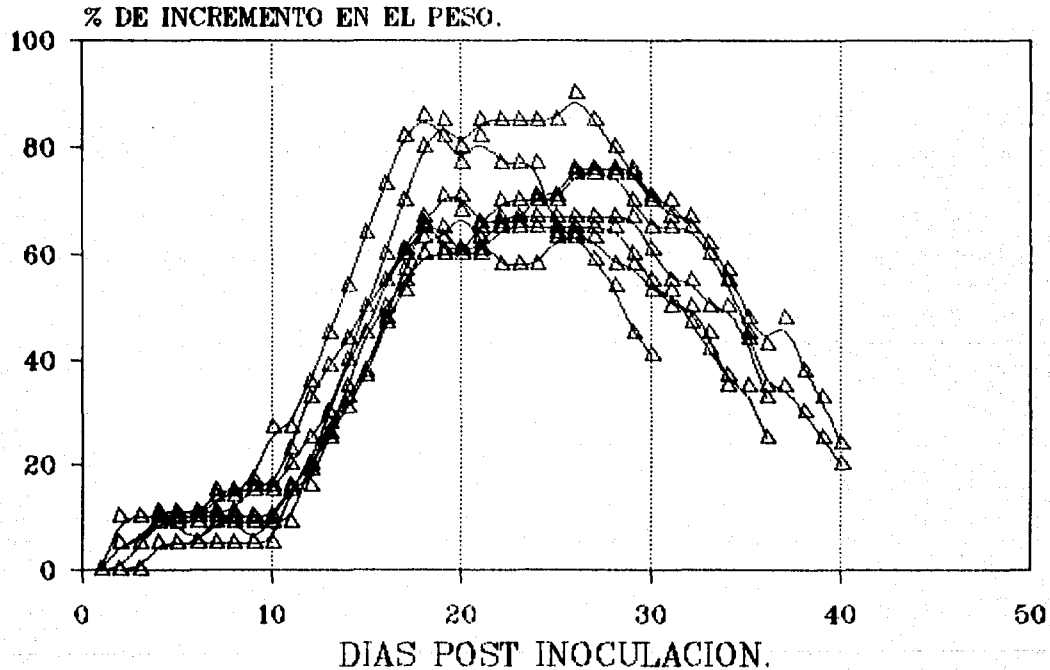


Fig. 3. Incremento corporal (%), de ratones de la cepa C57BI/6J después de ser transplantados con 1×10^6 células LR.4 por vía i.p.

TABLA III.

PATRON DE REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS INDUCIDOS EN RATONES C57B1/6J CON LA LINEA CELULAR LR.4 CONTRA DISTINTAS LINEAS CELULARES.

Linea celular	Origen	Haplotipo	Estirpe	Reactividad
* LR.4	DBA/2	H-2 ^d	T	+
* LW.1	DBA/2	H-2 ^d	T	+
BW5147	AKR/J	H-2 ^k	T	+
YAC-1	A/Sn	H-2 ^a	T	+
EL4.4	C57B1/6J	H-2 ^b	T	+
Timocitos	BALB/cAnN	H-2 ^d	T	+
S.180	Suizos	H-2 ^d	E	+
B82	C3H/HeJ	H-2 ^k	F	+
5ab1	C57B1/6J	H-2 ^b	M	-
F10-2	C57B1/6J	H-2 ^b	M	-

T= Células linfocíticas de estirpe T; E= Epitelial;
F=Fibroblastos; M=Melanoma.

* Clonas derivadas de la linea celular L5178Y.

TABLA IV.

PATRON DE REACTIVIDAD DE ANTI-LR.4 ADSORBIDO CON DOS DISTINTOS TIPOS CELULARES.

ANTISUERO	*LR.4	*LW.1	B82	TIMOS DE BALB/c
No-Ads.	+	+	+	+
Ads. vs B82	+	+	-	+
Ads. vs TBC	+	+	+	-
Ads. vs B82 + TBC	+	+	-	-

B82: Fibroblastos de células L; TBC: Células del timo de la cepa BALB/c; * Clonas celulares derivada de la línea celular L517BY.

Se incubaron 1×10^6 células con 100 μ l de anti-LR.4, durante 1 h/4°C. El suero adsorbido se recuperó por centrifugación y la reactividad contra distintas células se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta (Material y Métodos)

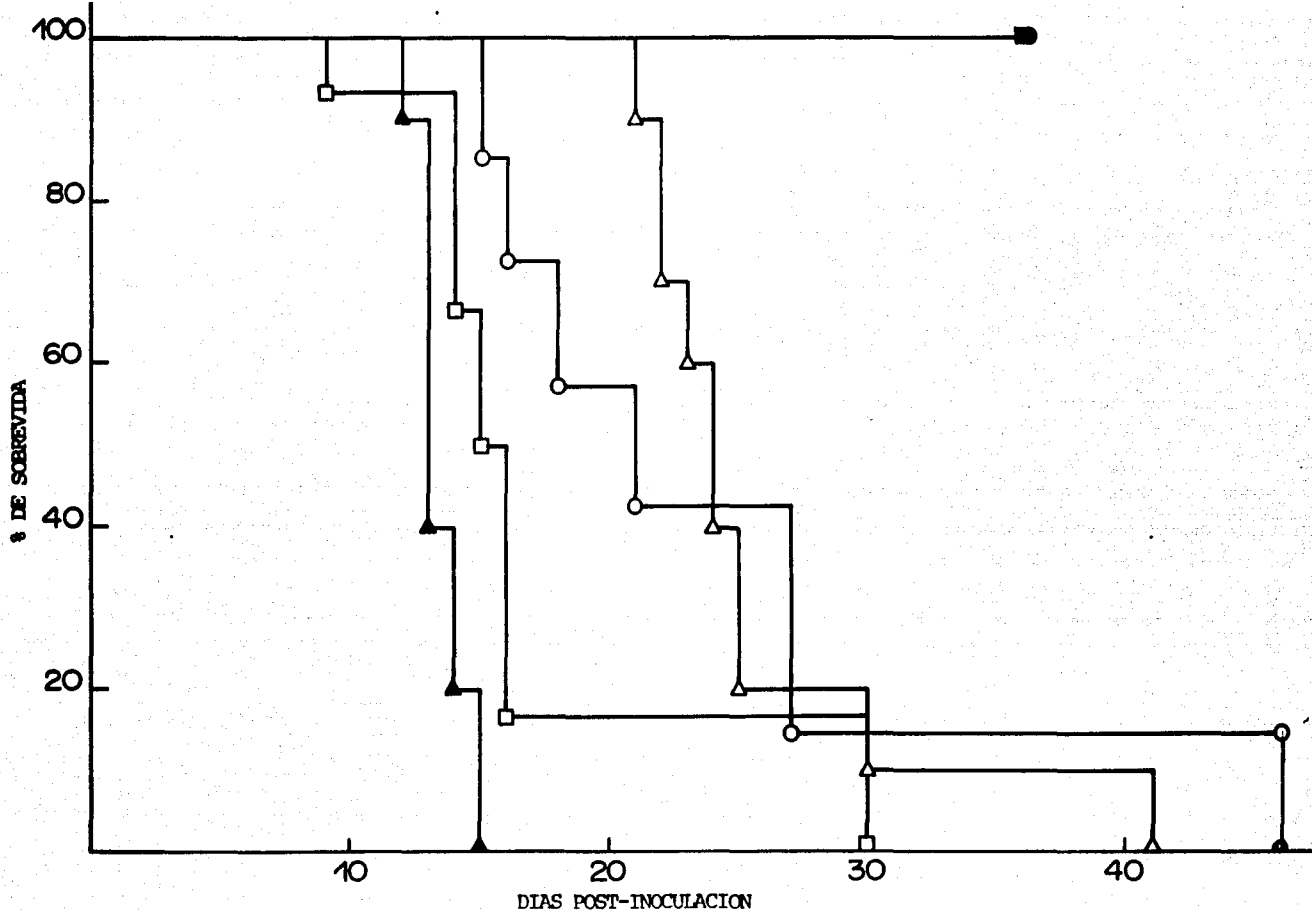


Fig. 4. Porcentaje de sobrevivida de ratones de la cepa C57Bl/6J después de ser transplantados con distintas células tumorales.
 a) Se desafiaron grupos de 10 ratones hiperinmunes contra las células LR.4 con 1×10^6 células LR.4 (●), EL4.4 (□) ó S.180 (○), por via i.p.; b) Se desafiaron grupos de 10 ratones no imunes con 1×10^6 células LR.4 (■), EL4.4 (▲) ó S.180 (△), por via i.p.

TABLA V.

ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA A CORTO Y LARGO PLAZO EN RATONES C57B1/6J INMUNIZADOS CON LR.4 TRATADAS CON MIT-C.

Exp.	No. anim.	No. inmun.	% de animales protegidos contra:		
			LR.4	S.180	EL4.4
A)	10	2X	90	20	0
	10	4X	100	40	0
B)	10	2X	10	20	NH
	10	4X	80	10	NH

A) Los animales fueron desafiados cinco días después de la última inmunización con 5×10^4 células de LR.4, S.180 ó EL4.4.

B) Los animales fueron desafiados cien días después de la última inmunización con 5×10^4 células de LR.4 ó S.180.

NH: No se realizó.

ACTIVIDAD DE CCDA DE MACROFAGOS SOBRE LA CELULAS LR.4.

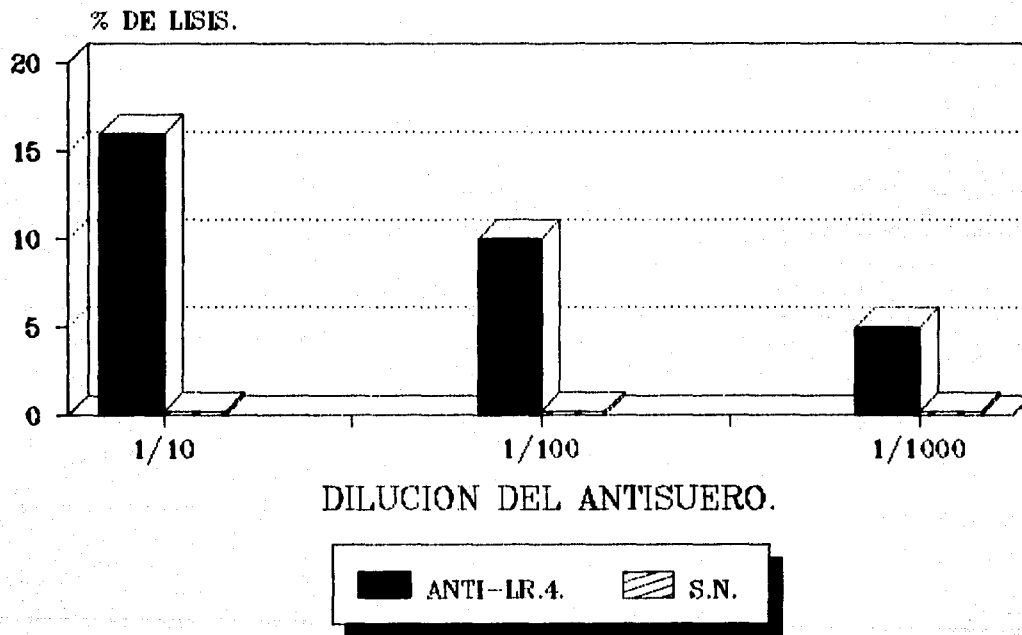


Fig. 5. La actividad de CCDA se determinó cocultivando macrófagos obtenidos de la cepa C57Bl/6J y células LR.4 en una relación 10:1, utilizando diluciones crecientes de suero anti-LR.4

RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.

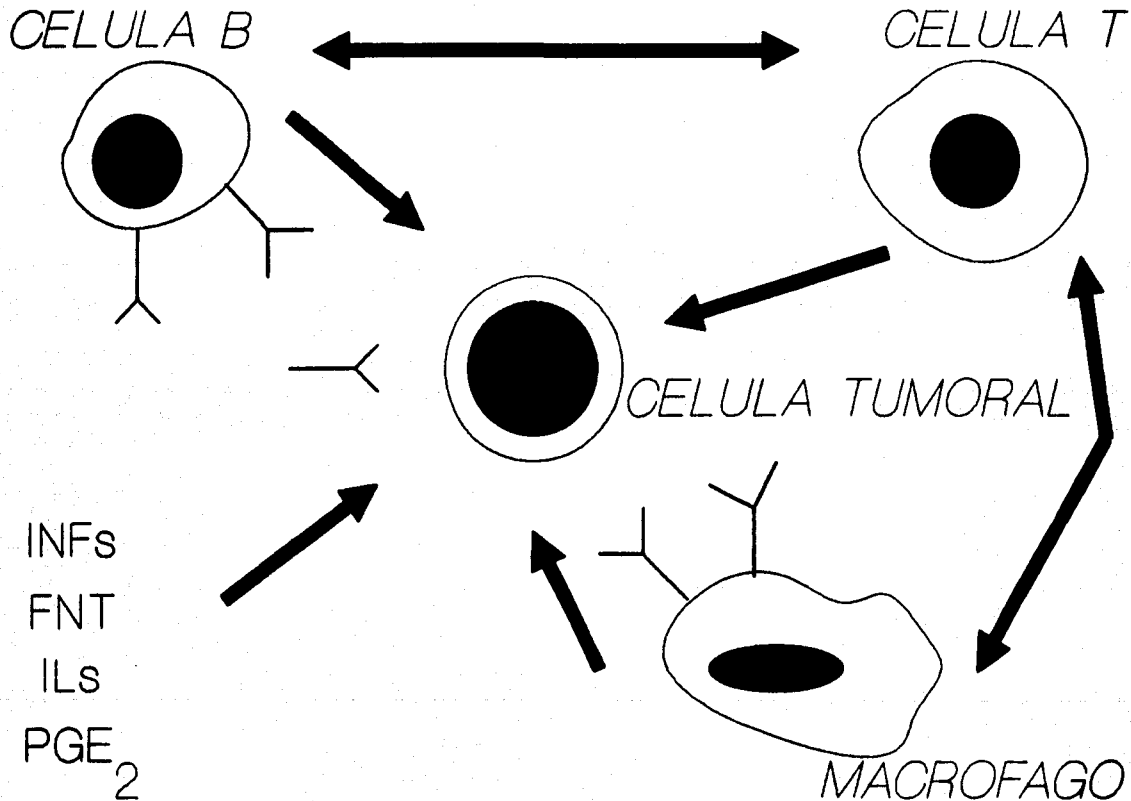


Fig. 6. Respuesta inmune antitumoral. En esta respuesta se crea una red inmunológica en la que intervienen células B (productoras de anticuerpos), células T y macrófagos, así como también distintas citocinas.
ILs: Interleucinas; **INF:** Interferón; **FNT:** Factor de necrosis tumoral; **PGE:** Prostaglandinas.

TABLA VI.

PATRON DE REACTIVIDAD DE ANTISUEROS INDUCIDOS EN RATONES C57B1/6J CON LA LINEA CELULAR LR.4, CONTRA CELULAS DEL TIMO DE DISTINTAS CEPAS DE RATONES.

Origen de Timocitos	Haplotipo	Reactividad.
BALB/cAnN	H-2 ^d	+
BALB.b	H-2 ^b	+
BALB.k	H-2 ^k	+
* DBA/2	H-2 ^d	+
CBA/J	H-2 ^k	+
C3HeB/FeJ	H-2 ^k	+
C3H/HeJ	H-2 ^k	+
A/J	H-2 ^a	+
C57B1/6J	H-2 ^b	-

* Cepa de ratones de la cual se originó la línea celular LR.4.

TABLA VII.

ESPECIFICIDAD EN LA PROTECCION INDUCIDA POR TIMOCITOS DE BALB.B
EN RATONES C57B1/6J.

Línea Celular	% de Sobrevida	N1/No	* Reactividad
LR.4	100	(30/30)	+
S.180	25	(5/20)	-
EL4.4	0	(0/5)	-

N1/No: Número de animales protegidos vs número total de animales utilizados.

* Reactividad: Análisis por inmunofluorescencia de un suero de ratones C57B1/6J hiperinmunes contra timos de BALB.b.

TABLA VIII.

REACTIVIDAD DE ANTI-TBB EN CELULAS TRATADAS CON TUNICAMICINA.

Tipo celular	*Tratamiento con tunicamicina	Reactividad.
LR.4	-	+
LR.4	+	+
Timo	-	+
Timo	+	+

* Se trataron 1×10^6 células con 5 μ g de tunicamicina y se incubaron a 37°C/ 24 hr.

La reactividad del antisuero se determinó por inmunofluorescencia indirecta.

TABLA IX.

PATRON DE REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS INDUCIDOS EN RATONES C57B1/6J POR INMUNIZACION CON TIMOS DE LA CEPA BALB.B CONTRA DISTINTAS LINEAS TUMORALES.

Linea celular	Origen	Haplotipo	Reactividad
LR.4	DBA/2	H-2 ^d	+
LW.1	DBA/2	H-2 ^d	+
L1210	DBA/2	H-2 ^d	+
YAC-1	A/Sn	H-2 ^a	+
B82	C3He/FeJ	H-2 ^k	+
BW5147	AKR/J	H-2 ^k	+
EL4.4	C57B1/6J	H-2 ^b	-
5ab-1	C57B1/6J	H-2 ^b	-
F10-2	C57B1/6J	H-2 ^b	-
S.180	Suizos	H-2 ^b	-

TABLA X.

PATRON DE REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS INDUCIDOS EN RATONES C57B1/6J POR INMUNIZACION CON TIMOS DE LA CEPA BALB.B CONTRA CELULAS DEL TIMO DE DISTINTAS CEPAS DE RATONES.

Origen de Timocitos	Haplotipo	Reactividad
BALB/cAnN	H-2 ^d	+
BALB.b	H-2 ^b	+
BALB.k	H-2 ^k	+
DBA/2	H-2 ^d	+
C3HeB/FeJ	H-2 ^k	+
C3H/HeJ	H-2 ^k	+
CD1	H-2 ^g	+
A/J	H-2 ^a	+
CBA/J	H-2 ^k	+
C57B1/6J	H-2 ^b	-

TABLA XI.

COMPARACION DE LOS PATRONES DE REACTIVIDAD ENCONTRADOS PARA ANTI-TBB Y LOS REPORTADOS PARA Ly 31.1 EN DISTINTOS TEJIDOS LINFOIDES DE LA CEPA BALB.b.

ORGANO LINFOIDE	% DE CELULAS POSITIVAS.	
	* Anti-TBB	** Ly 31.1
TIMO	100	50
G.L.	100	20
BAZO	0	20
M.O.	<10	20
CMN	0	10-15

Ly 31.1 es un anticuerpo monoclonal secretado por la clona N1.10, la cual fué obtenida por fusión de células de bazo de C57B1/6J hiperinmunes contra la línea tumoral RADA-1 y una célula de mieloma (105).

G.L.: Ganglios linfáticos; M.O.: Medula osea; CMN: Células mononucleares de sangre periférica.

*: Porcentajes determinados por inmunofluorescencia indirecta.

** : Porcentajes determinados por citotoxicidad.

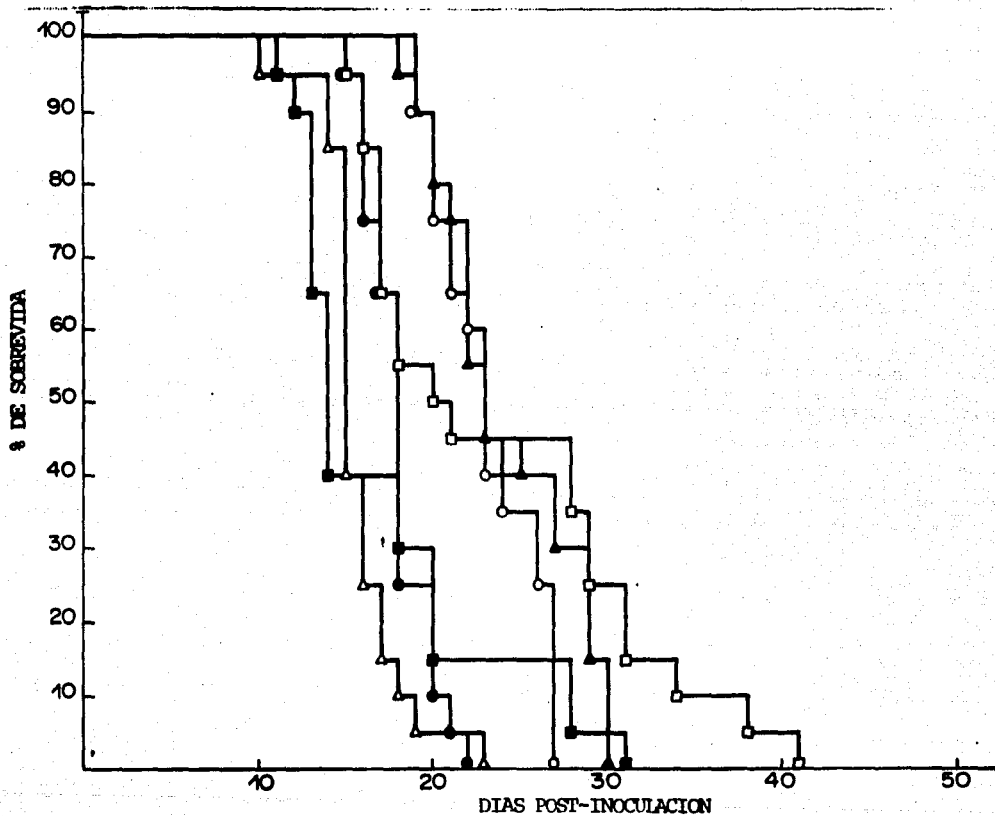


Fig. 7. Sobrevida de distintas cepas de ratones (%), después de ser transplantadas con 1×10^6 células de S.180 por vía i.p.
 C57Bl/6J (□); BALB/cAnN (○); C3HeB/FeJ (△); BALB.b (■); A/J (●); y BALB.k (▲).

TABLA XII.

PATRON DE REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS INDUCIDOS EN RATONES C57B1/6J POR INMUNIZACION CON LAS CELULAS S.180 TRATADAS CON MIT-C, CONTRA DISTINTAS LINEAS TUMORALES.

Linea celular	Origen	Haplotipo	Reactividad
S.180	Suizos	H-2 ^b	+
LR.4	DBA/2	H-2 ^b	-
LW.1	DBA/2	H-2 ^d	-
YAC-1	A/Sn	H-2 ^a	-
BW5147	AKR/J	H-2 ^w	-
Sab-1	C57B1/6J	H-2 ^b	-
EL4.4	C57B1/6J	H-2 ^b	-

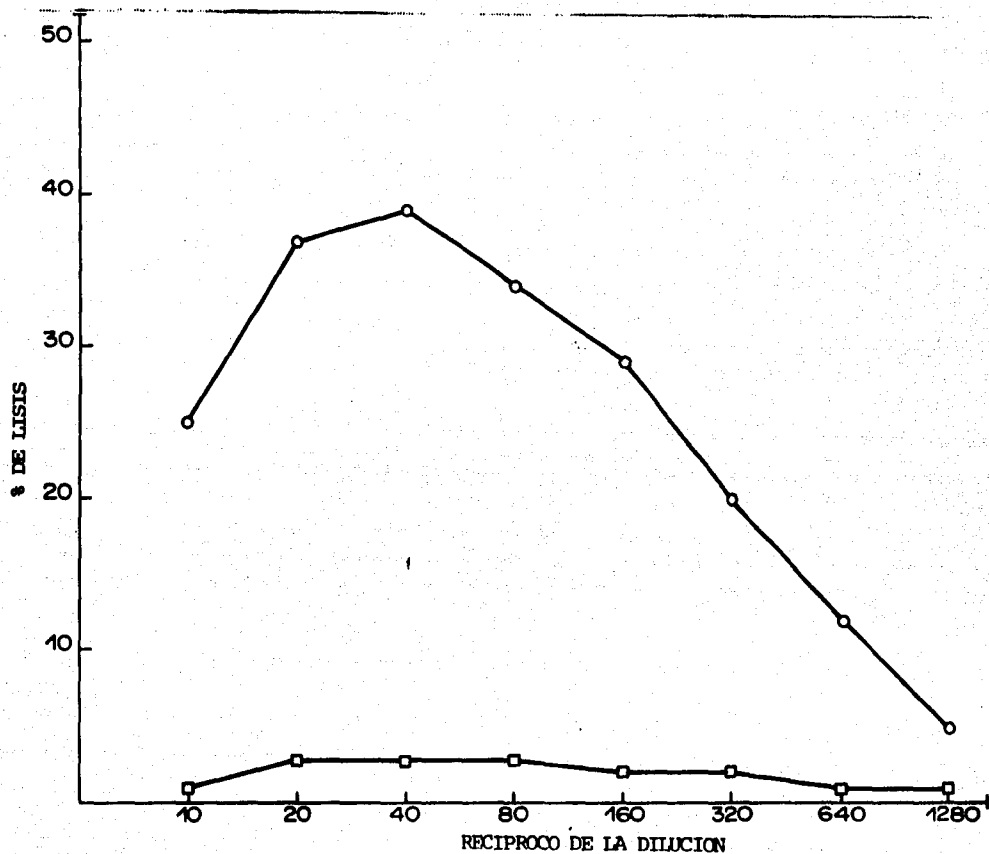


Fig. 8. Citotoxicidad mediada por anticuerpos contra la línea celular S.180 utilizando diluciones crecientes de suero anti-S.180 (○) o suero normal (□).

CONCLUSIONES.

1. La respuesta inmune humoral generada en el control y el rechazo de la línea celular LR.4, es compleja y presenta reactividades hacia epitopes presentes en células tumorales representantes de distintas estirpes celulares y en células T normales.
2. La respuesta inmune anti-LR.4 se genera aproximadamente en 12 días y tiene una duración de más de 100 días.
3. La línea celular LR.4 y células del timo comparten un antígeno, el cual es importante en el control del crecimiento de la línea tumoral.
4. Este antígeno puede desempeñar un papel importante en la localización de la célula T.
5. El crecimiento a través de barreras alógenicas de la línea celular S.180, probablemente se debe a la falta de de antígenos clase I del H-2.
6. La inmunidad anti-S.180 básicamente está mediada por la generación de anticuerpos específicos contra el tumor.
7. La respuesta inmune antitumoral depende del tipo celular involucrado, y en algunos casos requiere de la participación conjunta de citocinas, anticuerpos y células reactivas contra la célula tumoral.

REFERENCIAS

1. De Vita, V.T.Jr., S. Hellman, y S.A. Rosenberg. 1982. Cancer. Principles and practice oncology. Vol. I. J.B. Lippincott. Co. Ed. 986p.
2. Santos, E., y J.R. Villanueva. Cancer. Editado por Frensa Científica. 2ª edición. Barcelona, España. Caps. 1, 14 y 15.
3. Sell. S. Immunology, Immunopathology and immunity. 1987. Elsevier ed. 825p.
4. Grossman, Z., y R.B. Herberman. 1986. 'Immune surveillance' without immunogenicity. Immunology Today. 7:128-131.
5. Klein, J. 1986. Natural history of the major histocompatibility complex. Wiley-interscience publications. 775p.
6. Hames, B.D. y D.M. Glover. 1988. Molecular immunology. IRL Press, ed. England. 248 p.
7. Flavell, R.A., H. Allen, L.C. Burkly, D.H. Sherman, G.L. Waneck, y G. Widera. 1986. Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. Science 233:437-443.
8. Klein J., and F. Figueroa. 1986. The evolution of class I genes. Immunology Today 7: 41-44.
9. Fellous, M., M. Kamoun, J. Wiells, J. Dausset, G. Clements, J. Zeuthen, y G. Klein. 1977. Induction of HLA expression in Daudi cells after cell fusion. Immunogenetics 5: 423.
10. Hyman, R., y V. Sallings. 1977. Analysis of hybrids between a H-2*TL⁻ lymphoma and an H-2*TL⁺ lymphoma and its H-2*TL⁻ variant subline. Immunogenetics 4: 171.
11. Zinkernagel, R.M. y P.C. Doherty. 1975. H-2 Compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocyte choriomeningitis virus. J. Exp. Med. 141: 1427.
12. Fahrner, K., B.L.M. Hogan, y R.A. Flavell. 1987. Transcription of H-2 and Qa-2 genes in embryonic and adult mice. EMBO 6: 1265-1271.
13. Soloski, M.J., M. Dudshoorn-Snoek, G. Einhorn, y F. Demant. 1989. Molecular basis of Qa-11 antigen and paradoxical Qa-gene expression in an H-2 recombinant. J. Immunol. 143: 3074-3080.
14. Obata, Y., Y. Chen, E. Strockert, y L.J. Old. 1985. Structural analysis of TL genes of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5475-5479.

15. Brown, G.D., Y. Choi, G. Egan, y D. Meruelo. 1988. Extension of the H-2 TLP molecular map. Isolation and characterization of T13, T14 and T15 from C57B1/6 mouse. *Immunogenetics* 27: 239-251.
16. Mengle-Glaw, L., y H.O. McDevitt. 1985. Genetics and expression of mouse Ia antigens. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 365-396.
17. Figueroa, F. and J. Klein. 1986. The evolution of MHC class II genes. *Immunology Today* 7: 78-80.
18. Guillet, J., M. Lai, T.J. Briner, S. Buus, A. Sette, H.M. Grey, J.A. Smith, y M.L. Gelfer. Immunological self, nonself discrimination. *Science* 235: 865-870.
19. Morse III, H.C., F-W. Shen, y U. Hammerling. 1987. Genetic nomenclature for loci controlling mouse lymphocyte antigens. *Immunogenetics* 25: 71-78.
20. Holmes, K.L., y H.C. Morse III. 1988. Murine Hematopoietic cell surface antigen expression. *Immunology Today* 9: 344-350.
21. Fan, J., A. Ahmed, y B. Bonavida. 1980. Studies on the induction and expression of T cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 125: 2444-2453.
22. Dialynas, D.P., Z.S. Guan, K.A. Wall, A. Pierres, J. Quint'ans, M.R. Loken, M. Pierres, y F.W. Fich. 1983. Characterization of the murine T cell surface molecule designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK 1.5: similarity of L3T4 to the human Leu 3-/T4 molecule. *J. Immunol.* 131: 2445-2451.
23. Springer, T.A., M.L. Dustin, T.K. Kishimoto, y S.D. Marlin. 1987. The lymphocyte function-association LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 223-252.
24. Ortega.R.G., R.J. Robb, E.M. Shevach, y T.R. Malek. 1984. The murine IL-2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J. Immunol.* 133: 1970-1975.
25. Gunter, K.C., T.R. Malek, y E.M. Shevach. 1984. T cell-activating properties of an anti-Thy-1 monoclonal antibody. Possible analogy to OKT3/Leu4. *J. Exp. Med.* 159: 716-730.
26. Mak. T.W. 1988. The T-cell receptors. Plenum Press, New York. 235p.
27. Bunifacino, J.S., C. Chen, J. Leppincott-Schwartz, J.D. Ashwell, y R.D. Klausner. 1988. Subunit interactions within the T cell antigen receptor: clues from the study of partial complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85: 6929-6933

28. Anderson, P., M-L. Blue, C. O'Brien, y S.F. Schlossman. 1989. Monoclonal antibodies reactive with the T cell receptor γ chain: production and characterization using a new method. *J. Immunol.* 143: 1899-1904.
29. Reinherz, E.L., S. Mauer, K.A. Fitzgerald, R.E. Hussey, H. Levine y S.F. Schlossman. 1992. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of T3 molecular complex. *Cell* 30: 735-743.
30. Harding, C.V., F. Leyva-Cobian, y E.R. Unanue. 1988. Mechanisms of antigen processing. *Immunol. Rev.* 106: 76-92.
31. Veillette, A., M.A. Bookman, E.M. Horak, y J.B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase. *p19^{lck}*. *Cell* 55: 301-308.
32. Henkart, P.A. 1985. Mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 31-58.
33. Young, J.D-E., y Z.A. Cohn. 1987. Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. *Adv. Immunol.* 41: 269-332.
34. Young, J.D-E., y L. C. Lui. 1988. Multiple mechanisms of lymphocyte-mediated killing. *Immunology Today* 9: 140-144.
35. Herberman, R.B., C.W. Reynolds, y J.R. Ortaldo. 1986. Mechanism of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 651-680.
36. Hoskin, D.W., J Stankova, S.K. Anderson, y C. Roder. 1989. A functional and phenotypic comparison of murine natural killer (NK) cells and lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Int. J. Cancer* 43: 940-948.
37. Ljunggren, H.G., y K. Kärre. 1985. Host resistance directed selectively against H-2 deficient lymphoma variants. *J. Exp. Med.* 162: 1745-1759.
38. Storkus, W.J., D.N. Howell, R.D. Salter, R.J. Dawson, y P. Cresswell. 1987. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA expression. *J. Immunol.* 138: 1657-1659.
39. Lobo, F.I., y C.E. Spencer. 1989. Use of anti-HLA antibodies to mask major histocompatibility complex gene products on tumor cells can enhance susceptibility of these cells to lysis by natural killer cells. *J. Clin. Invest.* 83: 278-287.

40. Rosenberg, S.A. y M.T. Lotze. 1986. Cancer immunotherapy using interleukin 2 and interleukin 2-activated lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 681.
41. Alarcon, B., J. De Vries, C. Pettey, A. Boylston, H. Yssel, C. Terhorst, y H. Spits. 1987. The T-cell receptor α chain-CD3 complex: Implication in the cytotoxic activity of CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ human natural killer clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3861-3865.
42. Tsai, L., C. Ohlén, H-G. Ljunggren, K. Kärre, M. Hansson, y R. Kiessling. 1989. Effect of INF- γ treatment and in vivo passage of murine tumor cell lines on their sensitivity to lymphokine-activated killer (LAK) cell lysis in vitro; association with H-2 expression on the target cells. *Int. J. Cancer* 44: 669-674.
43. Blay, J.Y., J. Bertoglio, D. Fradelizi, y S. Chouaib. 1989. Functional interaction of IL2 and TNF in the differentiation of LGL into the LAK effectors. *Int. J. Cancer* 44: 598-604.
44. Rosenberg, S.A., P.J. Spiess, y R. Lafreniere. 1986. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor infiltrating lymphocytes. *Science* 233: 1318-1321.
45. Fidler, I.J., y A.J. Schroit. 1988. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: Discrimination of altered self. *Biochem. Biophys. Acta* 948: 151-173.
46. Leu, R.W., D. Kriet, A. Zhou, M.J. Herriot, J.A. Rummage, y B.J. Shannon. 1989. Reconstitution of murine resident peritoneal macrophages for antibody-dependent cellular cytotoxicity by homologous C1q. *Cellular Immunol.* 122: 48-61.
47. Adams, D.O., T. Hall, Z. Steplewski, y H. Koprowski. 1984. Tumors undergoing rejection induced by monoclonal antibodies of the IgG₁ isotype contain increased numbers of macrophages activated for a distinctive form of antibody-dependent cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3506-3510.
48. Langlois, A.J., T.J. Matthews, K.J. Weinhold, y P. Bolognesi. 1985. Immunologic control of a retrovirus-associated murine adenocarcinoma. VII. Tumor cell destruction by macrophages and IgG2A. *J. Natl. Cancer Inst.* 75: 709-713.
49. Ostrand-Rosenberg, S. y V. Clements. 1987. Resistance to 4Q2AX involves immunity to minor histocompatibility antigens. *Immunogenetics* 26: 1-5.
50. Sponaas, A.M., B. Loveland, y E. Simpson. 1988. MHC-unrestricted T-cell cytotoxicity against tumor cells. *Immunology* 63: 233-239.

51. Loveland, B., y E. Simpson. 1986. The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. *Immunology Today* 7: 223-228.
52. Mosley, R., D. Styre, y J.R. Klein. 1989. Immune recognition by cytotoxic T Lymphocytes of minor histocompatibility antigens expressed on a murine colon carcinoma line. *Cellular Immunol.* 122: 200-207.
53. Colombo, M.F., R. Jaenisch, y F.J. Wettstein. 1987. Endogenous retroviruses lead to the expression of a histocompatibility antigen detectable by skin graft rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 189-193.
54. Hämmerling D.J., D. Klar, W. Pülm, F. Momburg, y G. Moldenhauer. 1987. The influence of mayor histocompatibility complex class I antigens on tumor growth and metastasis. *Bioch. Biophys. Acta* 907: 245-259.
55. Tanaka, K., T. Yoshioka, C. Bieberich, y G. Jay. 1988. Role of the major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. *Ann. Rev. Immunol.* 6: 359-380.
56. Sanchez V.I. 1988. Enmascaramiento de los antígenos de histocompatibilidad H-2 por la glicoproteína gp160 en un mieloma murino. Tesis de maestría en IBB.
57. Thomson D.M.P. 1975. Soluble tumor-specific antigen and its relationship to tumor growth. *Int. J. Cancer* 15: 1016-1024.
58. Hewitt, H.B., E.R. Blake, A.S. Walder. 1976. A critique of the evidence for active host defence against cancer based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origen. *Br. J. Cancer* 33: 241.
59. Ingenito, G.G., y C.E. Calkins. 1981. Evidence for interaction between T cell population of tumor-bearing and normal mice in immune suppression. *J. Immunol.* 127: 1236-1240.
60. Sarzotti, M., S. Baron, y G.R. Klimpel. 1987. EL-4 metastases in spleen and bone marrow suppress the NK activity generated in these organs. *Int. J. Cancer.* 39: 118-125.
61. Roberts, L.K.. 1986. Characterization of a cloned ultraviolet radiation (uv)-induced suppressor T cell line that is capable of inhibiting anti-uv tumor-immune responses. *J. Immunol.* 136: 1908-1916.

62. Natali, F., A. Bigotti, R. Cavaliere, S.K. Liao, M. Taniguchi, y S. Ferrone. 1985. Heterogeneous expression of melanoma-associated antigens and HLA antigens by primary and multiple metastatic lesions removed from patients with melanoma. *Cancer Res.* 45: 2883-2889.

63. Fuji, R. y M. Murakami. 1983. Differential tumor immunogenicity of DBA/2 mouse lymphoma L1210 and its sublines. III. Control of host resistance to drug-resistant L1210 sublines by H-2-linked and non-H-2-linked genes. *J. Natl. Cancer Inst.* 70: 119-124.

64. Yokochi, T., K. Kawashima, I. Nakashima, F. Nagase, K. Isobe, E. Nagura, K. Yamada, T. Miyadai, y Y. Kimura. 1987. Identification and characterization of a unique tumor-associated surface antigen on L1210 leukemia cells recognized by semisynthetic antisera. *Cancer Res.* 47: 1006-1009.

65. Palladino, M.A., Jr., P.K. Srivastava, H.F. Oettgen, y A.B. DeLeo. 1987. Expression of a shared tumor-specific antigen by two chemically induced BALB/c sarcomas. *Cancer Res.* 47: 5074-5079.

66. Noll, G., W. Schmidt, y H. Bauer. 1986. Cytotoxic T cell lysis of H-2-negative murine sarcoma cells. *Eur. J. Immunol.* 16: 531-536.

67. Solter D., y B.B. Knowles. 1978. Monoclonal antibody defining a stage specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5565-5569.

68. Nava, G., E. Escandon, R. Ocadiz, V. Ortega, C. Lomeli, y G. Alfaro. 1990. Damage in $\beta 2m$ genes and DNA methylation of H-2 genes are involved in loss of expression of class I MHC products on the membrane of LR.4, a cell line derivated of T-cell lymphoma L5178Y. *J. Immunol.* (articulo en revisión)

69. Haagensen, D.E. Jr., G. Roloson, J.J. Collins, S.A. Wells, Jr., D.F. Bolognesi, y H.J. Hansen. 1978. Immunologic control of the ascitis from of murine adenocarcinoma 755. I. Protection with syngeneic immune serum or lymphoid cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 131-140.

70. Gorer, P.A. 1950. Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Brit. J. Cancer* 4:372.

71. Cikes, M., S. Firber, Jr., y G. Klein. 1973. Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell-surface antigen(s) determined by Moloney Leukemia virus in cultured murine lymphomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 50: 347.

72. Witte, J., K.M. Haskins, P. Marrack, y J.W. Kappler. 1983. Use of I region restricted antigen specific T cell hybridomas to produce idiotypically specific anti-receptor antibodies. *J. Immunol.* 130: 1033-1037.
73. Gooding, L.R.. 1982. Characterization of a progressive tumor from C3H fibroblasts transformed in vitro with SV40 virus. Immunoresistance in vivo correlates with phenotypic loss of H-2K^b. *J. Immunol.* 129: 1306-1312
74. Freund, J.G., A. Ahmed, R.E. Budd, M.E. Dorf, K.W. Sell, W.E. Vannier, y R.E. Humphreys. 1976. The L1210 leukemia cell bears a B lymphocyte specific, non-H-2 linked alloantigen. *J. Immunol.* 117: 1903-1905.
75. Hart, I.R. 1979. Selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *Am. J. Pathol.* 97: 587-600.
76. Fidler, I.J.. 1973. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature* 242: 148-149.
77. Benjamini, E., S. Fong, C. Erickson, C.Y. Leing, D. Rennick, y R.J. Scibienski. 1977. Immunity to lymphoid tumor induced in syngeneic mice by immunization with mitomycin C-treated cells. *J. Immunol.* 118: 685-693.
78. Brown, W.J., E. Constantinescu y M.G. Farquhar. Redistribution of a mannose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine. *J. Cell Biology* 99: 320-326.
79. Johnstone, A., y F. Thorpe. 1982. *Immunocytochemistry in practice.* Blackwell, Sci. Publ. Oxford. 298pp.
80. Simpson, E., R. Gordon, M. Taylor, J. Martin, y P. Chandler. 1975. Micromethods for induction and assay of mouse mixed lymphocyte reactions and cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 5: 451.
81. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, G.J. Seidman, J.A. Smith, y K. Struhl. 1987. *Currents protocols in molecular biology.* Wiley. Ed.
82. Bray, K.R., M.E. Gershwin, T. Chused, y A. Ahmend. 1984. Characteristics of a spontaneous monoclonal thymocytotoxic antibody from New Zeland Black mice: Recognition of specific NTA determinat. *J. Immunol.* 133: 1318-1324.
83. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, y R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-267.

84. Johnson W.J., y Adams D.O. 1986. Assays detecting the antibody-dependent and independent binding and cytolysis of tumor cells by murine macrophages. *Methods in Enzimology* 132: 555-568.
85. Flaherty, L., M. Karl, y C.L. Reinisch. 1982. Syngeneic tumor immunizations produce Qa antibodies. Discovery of a new Qa antigen, Qa-6. *Immunogenetics* 16: 329-337
86. Isobe, K., Y. Hasegawa, T. Iwamoto, T. Hasegawa, K. Kawashima, L-N. Ding, y I. Nakashima. 1989. Induction of antitumor immunity in mice by allo-major histocompatibility complex class I gene transfectant with strong antigen expression. *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 1823-1828.
87. Nagase, F., K. Ueda, K. Kawashima, S.M.J. Rahman, K. Isobe, T. Yoshida, Y. Hasegawa, K. Ando, T. Iwamoto, E. Nagura, K. Yamada, T. Yokochi, y I. Nakashima 1987. Development of host-dependent high-grade tumor-specific immunity through a novel mechanism triggered by the LYT-2⁺ tumor-specific T cell clone (K7L) that induces temporal growth of L1210 leukemia-K7L-variant. *J. Immunol.* 138: 2359-2365.
88. Chen, P.L., D.J. Hutchinson, y N.H. Sarkar. 1985. Identification of the virions in the in vitro (v) leukemia cell line by morphologically, virological, and immunological techniques. *Cancer Res.* 35: 718-728.
89. Zalman, M., y D. Meruelo. 1986. Analysis of H-2 -linked immune responses involved in resistance to AKR tumor growth. *Immunogenetics* 24: 51-62.
90. Collins, J.J., G. Roloson, D.E. Haagensen, Jr, P.J. Fischinger, S.A. Wells, Jr, W. Holder, y D.P. Bolognesi. 1978. Immunologic control of the ascites from of murine adenocarcinoma 755. 11. Tumor immunity associated with a Friend-moloney-Rauscher-type virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 141-152.
91. Wejman, J.C., A.T. Benjamin, N.A. Jenkins, y N.G. Copeland. 1984. Endogenous xenotropic murine leukemia virus-related sequences map to chromosomal regions encoding mouse lymphocyte antigens. *J. Virol.* 50: 237-247.
92. Meruello, D., A. Rossonando, M. Offer, J. Buxbaum, y A. Fellicer. 1983. Association of endogenous viral loci with genes encoding murine histocompatibility and lymphocyte differentiation antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5032-5036.

93. Haagensen, D.E., Jr., G. Roloson, J.J. Collins, S.A. Wells, Jr., D.P. Bolognesi, y H.J. Hansen. 1978. Immunologic control of the ascites from murine adenocarcinoma 755. I. Protection with syngeneic immune serum or lymphoid cell. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 131-140
94. Berek, C., J.M. Jarvis, C. Milstein. 1987. Activation of memory and virgin B cell clones in hyperimmune animales. *Eur. J. Immunol.* 17: 1121-1129.
95. Kawashima, K., K. Isobe, F. Nagase, T. Yokochi, E. Nagura, Y. Hasegawa, H. Morishita, K. Yamada, y I. Nakashima. 1985. Simultaneous development of humoral and cellular tumor-specific immunity against L1210 mouse leukemia. *Leuk. Res.* 7: 935-939.
96. Liu, Ch., Y. Suzuki, L. Chen, T. Okayasu, C.E. Calkins, y E.F. Wheelock. 1990. Maintenance and cure of the L5178Y murine tumor-dormant state by interleukin 2: in vivo and in vitro effects. *Cancer Res.* 50: 1361-1367.
97. Escandon E. 1986. Tesis de Maestria en IBB.
98. Lovette, D., B. Kozan, M. Hadman, K. Resch, y D. Gensa. 1986. Macrophage cytotoxicity: interleukin 1 is a mediator of tumor cytotoxicity. *J. Immunol.* 136: 340-347.
99. Morinaga, Y., H. Suzuki, F. Takatsuki, Y. Akiyama, T. Taniyama, K. Matsushima, y K. Onozaki. Contribution of IL-6 to the antiproliferative effect of IL-1 and tumor necrosis factor on tumor cell lines. *J. Immunol.* 143: 3538-3542.
100. Weeb, D.A., y T.L. Gerrard. 1990. IFN- α and INF- β affect both monocytes and tumor cells to modulate monocyte-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 144: 3642-3648.
101. Browning, J., y A. Ribolini. 1989. Studies on the differing effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on the growth of several human tumor lines. *J. Immunol.* 143: 1859-1867.
102. Garaci, E., R. Poalettii, y M.G. Santoro. 1987. Prostaglandins in cancer research. Springer Heidelberg.
103. Berg, E.L., L.A. Golstein, M.A. Jutila, M. Nakache, L.J. Picker, P.R. Streeter, N.W. Wu, D. Zhou, y E.C. Butcher. 1989. Homing receptors and vascular addressins: Cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol. Rev.* 108: 5-44.
104. Stoolman, L.M. 1989. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 56: 907-910.

105. Mathis, D.J., C. Bevoist, V.E. Williams II, M. Kanter, y H.O. McDevitt. 1983. Several mechanisms can account for defective Ex gene expression in different mouse haplotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 273-277.

106. Keppler, J.W., E. Kushnir, y P. Marrack. 1989. Analysis of V β ^a expression in new mouse strains bearing the V β ^a haplotype. J. Exp. Med. 169: 1533-1541.

107. Tada, N., S. Kimura, Y. Lui-Lam, y U. Hammerling. 1984. A new lymphocyte surface antigen (Ly-m31) controlled a gene closely linked to the Akp-2 locus on mouse chromosome 4. Immunogenetics 20: 589-592.

108. Dairiki, K., S. Nakamura, S. Ikegami, M. Naakamura, T. Fujimori, N. Tamaoki, y N. Tada. 1989. Mouse Ly-31.1 is a alloantigen determinant of alkaline phosphatase predominantly expressed in the kidney and bone. Immunogenetics 29: 235-240.

109. Fuji, H., y F. Milgrom. 1973. In vitro studies on strain-dependent production of thymus-specific autoantibodies. J. Exp. Med. 138: 16-32.

110. Hämmerling G.J., D. Klar, W. Fülm, F. Momburg, G. Moldenhauer. 1987. The influence of major histocompatibility complex class I antigens on tumor growth and metastasis. Biochem. Biophys. Acta 907: 245-259.

111. Potter, T.A., C. Boyer, A.-M. Schmitt-Verhulst, P. Golstein, y T.V. Rajan. 1984. Expression of H-2D^b on the cell surface in the absence of detectable β_2 -microglobulin. J. Exp. Med. 160: 317-322.

112. Hansen, T.H., N.B. Myers, y D.R. Lee. 1988. Studies of two antigenic forms of L^d with disparate β_2 -microglobulin (β_{2m}) associations suggest that β_{2m} facilitates the folding of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains during de novo synthesis. J. Immunol. 140: 3522-3527.

ANEXO 1.

BREVE RESEÑA HISTORICA DEL CANCER Y LA INMUNOLOGIA: (2).

- Halsted en 1898 Reportó la presencia de linfocitos infiltrados en procesos tumorales. La presencia de linfocitos en la zona del tumor fué correlacionada con un mejor pronóstico de los pacientes.
- Ehrlich en 1900 Propuso que los tumores presentan inmunogenicidad y sentó las bases de la teoría inmunológica.
- Shone en 1906 Mostró que se puede generar inmunidad hacia tumores con tejido fetal en ratones exogámicos.
- Gross en 1941 Mostró el primer rechazo de tumores en ratones parcialmente endogámicos.
- Foley en 1953 Mostró evidencias de rechazo en ratones endogámicos.
- Prehn en 1957 Mostró que ratones endogámicos a los cuales les fué extirpado el tumor primario, se vuelven inmunes a un segundo desafío con el mismo tumor
- Thomas y Burnet en 1957 Propusieron independientemente lo que más adelante junto con la ideas de Ehrlich se conociera como la teoría de la Sobrevivencia Inmunológica.

ANEXO No. 2

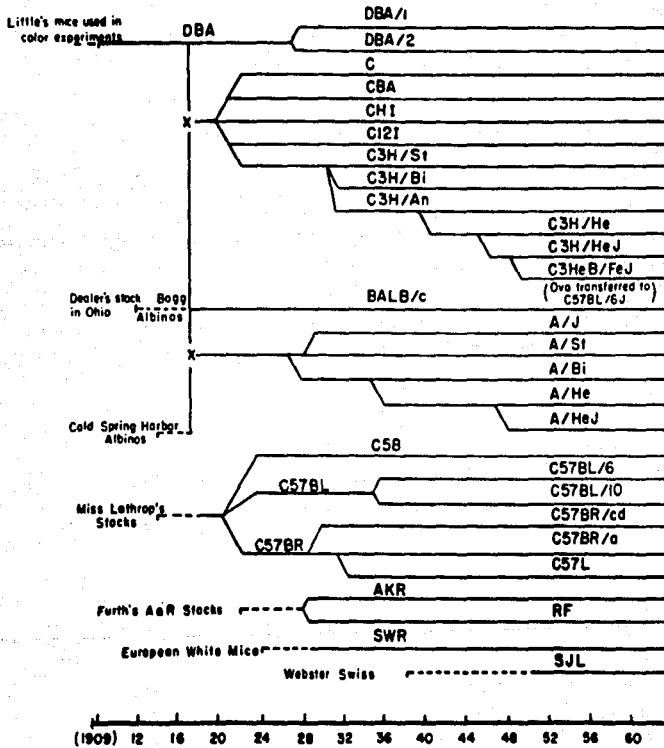


Diagrama filogenético de las distintas cepas de ratones singénicos.