

2 ej
6

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS

Y UN MIELOMA MURINO RESISTENTE A LA DESTRUCCIÓN

INMUNE

Tesis para obtener el grado de
Licenciatura en Investigación Biomédica Básica

P r e s e n t a

Enrique Escandón Martínez

México, D. F.

1983.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la asesoría del Dr. Esteban-Celis Flam.

I N D I C E .

LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUCCION

- Prólogo
- Características de una célula tumoral
- Antigenicidad de tumores
- Respuesta inmune antitumoral
 - + Vigilancia inmunológica
- Linfocitos T citotóxicos
 - + Características generales de la lisis mediada por los LTCs
 - + Fases del ciclo lítico de los LTCs
 - a) Interacción celular
 - b) Programación para la lisis y/o ataque letal
 - c) Destrucción de la célula blanco
- Relación del CMH con el mecanismo de reconocimiento de los LTCs (Fenómeno de restricción por H-2)
- Linfocitos T citotóxicos inducidos por lectinas
 - + Efecto de lectinas en la lisis mediada por LTCs específicos
- Evasión tumoral de la respuesta inmune

ANTECEDENTES

OBJETIVO

MATERIAL Y METODOS

- Animales
- Tumores
- Medios de cultivo
- Generación de LTCs
 - + In vivo
 - + In vitro
 - 1) Inespecíficos estimulados por Con.A
 - 2) Específicos en un CML

- + Obtención y preparación de células esplénicas
- LTCs de larga duración
 - + Selección del suero fetal idóneo para estos cultivos
 - + Producción de factor de crecimiento de células T (Interleukina 2)
- Tratamiento de células de bazo con Mitomicina C
- Inducción de ANs in vivo
- Preparación de células blanco para el ensayo de citotoxicidad
- Tratamiento de células con tripsina
- Marcaje celular con ^{51}Cr para el ensayo de citotoxicidad
- Ensayo de citotoxicidad
- Ensayo de aglutinación de células tumorales por lectina
- Conjugación de Con.A con isotiocianato de fluoresceína

RESULTADOS

- Parte I. Estudio de las interacciones entre el mieloma murino LPC-1, resistente a la destrucción inmune y LTCs utilizando diversas lectinas
- Parte II. Estudio de las interacciones entre el tumor LPC-1 y LTCs - provenientes de ratones DBA/2 que han rechazado el tumor

DISCUSION GLOBAL Y COMENTARIOS

EPILOGO

BIBLIOGRAFIA

LISTA DE ABREVIATURAS .-

- Linfocitos T citotóxicos (LTCs)
- Células Asesinas Naturales (ANs)
- Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)
- Concanavalina A (Con.A)
- Fitohemaglutinina (FHA)
- Aglutinina de Germen de Trigo (AGT)
- Solución Salina Balanceada de Hank (SSB)
- Cultivo Mixto de Linfocitos (CML)
- Suero Fetal Bovino (SFB)
- Solución Amortiguadora de Fosfatos (SAF)
- Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
- Acido poliinosínico: policistidílico (Poli I:C)

INTRODUCCION.-

Prólogo.

En esta sección se describen las relaciones funcionales existentes entre células neoplásicas y el sistema inmune del huésped portador. Se fundamenta la importancia que una respuesta inmune adecuada tiene en controlar y detener el crecimiento de células tumorales, con énfasis en la reacción inmune mediada por células, particularmente los denominados linfocitos T citotóxicos (LTCs) . Puesto que estos linfocitos efectores constituyen el modelo experimental utilizado a lo largo de este trabajo, se analizan más detalladamente las características de estas células, sus mecanismos de reconocimiento y acción citotóxica, y el papel que ciertas lectinas tienen en modificar estos procesos.

Finalmente se mencionan los mecanismos más importantes desarrollados por las células tumorales para escapar a la respuesta inmune establecida en su contra, para posteriormente, en la siguiente sección (Antecedentes), describir dentro de este contexto, el modelo experimental de evasión inmune antitumoral estudiado en nuestro laboratorio.

Características de una célula tumoral

Una célula tumoral es una célula normal modificada que puede manifestar cambios estructurales en forma, tamaño y arreglo cromosomal. Sus peculiaridades funcionales fundamentales se refieren a: a) disminución y/o pérdida de funciones especializadas, b) acentuación de funciones vegetativas como la actividad proliferativa, c) en algunos casos adquisición de funciones nuevas como la capacidad de crecer en sitios distintos al tumor original (metástasis) y la de destruir los tejidos que la rodean.

El cambio operado en la transformación de una célula normal es irreversible y la evolución de un tumor representa el desarrollo de una colonia de células permanentemente alteradas. Quizás la característica más general y dramática de una célula neoplásica es su capacidad de crecer indefinidamente, en forma rápida o lenta, de manera progresiva y sin responder a los mecanismos normales de control y homeostasis del huésped.

Finalmente una célula tumoral difiere normalmente de su contraparte normal, en que sufre, entre otras, alteraciones en la estructura y función de ciertos componentes de su membrana citoplasmática (Pollack, 1974; Nicolson, 1976).

Antigenicidad de tumores

Esta última característica de las células neoplásicas ha atraído el interés de muchos inmunólogos en la búsqueda de moléculas alteradas e inclusive la aparición de nuevos componentes que no se expresen en la célula normal y que, por lo tanto, pueden ser reconocidos como extraños por el huésped y producir una respuesta de rechazo. Ya en 1943 Gross demostró la existencia de antígenos relacionados con células malignas. Desde entonces la superficie membranal de las células cancerosas ha sido examinada por métodos bioquímicos e inmunológicos para identificar constituyentes asociados y característicos del estado tumoral, y varias categorías de antígenos han sido reconocidas:

a) En la superficie de células tumorales inducidas por virus se han detectado glicoproteínas y polipéptidos del virión (Kennel, 1976; Okasaki, 1976; Kurth, 1975; Obata, 1981). Estos antígenos dependen únicamente del virus on-

cogénico, siendo los mismos, aunque los tipos de tumores que los expresen sean radicalmente distintos. (Lloyd, 1977).

b) En tumores inducidos por agentes químicos se han detectado antígenos denominados tumor-específicos, que constituyen una categoría distinta y separable de los antígenos virales (Natori, 1977; 1978; Baldwin, 1973). Se ha establecido que estos antígenos son productos característicos de cada tumor individual, siendo inclusive diferentes en dos tumores derivados del mismo tipo histológico y producidos por el mismo agente químico (Moore, 1978; Lloyd, 1977). Es importante mencionar que no obstante estos antígenos fueron originalmente encontrados en esta clase de tumores, también se han detectado en tumores inducidos por virus y en neoplasias de origen espontáneo (Baldwin, 1969; Okasaki, 1976), lo cual habla de la generalidad de este fenómeno.

c) Por otra parte, también antígenos fetales o embrionarios se han detectado en neoplasias inducidas por virus y por agentes químicos (Ting, 1972; Coggin, 1974; Rees, 1979).

Respuesta Inmune antitumoral

La resistencia por parte del huésped al crecimiento de células cancerosas ha sido tema de intenso interés y trabajo por años. La demostración de que muchos tumores en animales experimentales y también en pacientes humanos presentan este tipo de antígenos asociados al estado tumoral que desarrollan una respuesta inmune en el huésped, ha provisto de una fuerte base experimental para su estudio. Por estudios de rechazo en huéspedes singénicos se han obtenido evidencias decisivas de inmunidad específica en contra de células tumorales (Baldwin, 1976). En el caso de neoplasias humanas, las principales evidencias de que estas células presentan neoantígenos similares a aquellos detectados en tumores animales experimentales se derivan de ensayos in vitro de la respuesta inmune humoral y celular en contra del tumor, y de estudios de hipersensibilidad tardía a extractos tumorales (Herberman, 1974; Hellstron, 1974).

Vigilancia inmunológica .- El papel del sistema inmune en prevenir y limitar el crecimiento de neoplasias ha sido enfatizado por muchos investigadores, quizás empezando por Erlich en 1909, cuando postuló que el organismo posee mecanismos positivos de control que mantienen en estado latente el desarrollo de células y tejidos aberrantes, prefigurando de esta manera lo que sería desarrollado después como la teoría de la Vigi-

lancia Inmunológica, concepto retomado por Thomas en 1959 y finalmente elaborado por Burnet (1970) en la forma de teoría. La parte central de ésta consiste en afirmar que el sistema inmune del huésped destruye normalmente las células aberrantes o cancerosas que aparecen en forma espontánea en el organismo cuando el tumor se encuentra todavía en estado incipiente de formación. Para esto, las células malignas deben diferir antigénicamente de las normales y provocar en el huésped una respuesta inmune de rechazo. El curso normal de estos eventos sería la eliminación de estas células alteradas por un mecanismo similar al rechazo de trasplantes alogénicos mediado por los LTCs. Este concepto de la vigilancia inmunológica ha generado desde entonces muchos estudios experimentales, discusión y controversia hasta la fecha (Schwartz, 1975; Frehn, 1974; Reith, 1978; Mitchison et al, 1980; Moller et al, 1979; Smith et al, 1970).

Hoy en día se proponen además de los linfocitos T, otras poblaciones efectoras capaces de destruir células neoplásicas incipientes: los macrófagos activados (Alexander, 1976; Hibbs et al, 1978; Weinberg et al, 1978), y las células denominadas asesinas naturales (ANs). Estas últimas constituyen una subpoblación de las células linfoides, con actividad citotóxica antitumoral y presentes en altos niveles en organismos normales (Herberman et al, 1975a; 1981; Roder et al, 1979). Puesto que su actividad es independiente de estimulación previa (Herberman, 1975b) y se ha demostrado que inhiben metástasis y crecimiento tumoral in vivo (Hanna et al, 1981; Warner, 1982) es de esperarse que constituya una primera línea de defensa en contra de neoplasias de origen reciente.

Dado el gran debate que existe sobre la efectividad de estos mecanismos de vigilancia inmunológica es importante distinguir entre éstos y una respuesta inmune de rechazo en contra de un tumor ya establecido, ésta última extensamente fundamentada en la literatura (Cerottini et al, 1974a; Baldwin et al, 1976; 1973; Levy, 1974).

Basados en estudios de transferencia pasiva de inmunidad se ha demostrado que la inmunidad mediada por células es la esencialmente involucrada en el proceso de rechazo de tumores (Herberman, 1974).

Linfocitos T citotóxicos (LTCs)

Dentro de las reacciones mediadas por células con actividad antitumoral, la más importante es la producida por los LTCs (Palladino et al 1982; Greenberg et al, 1981; Cerottini, 1974a). Estos linfocitos son cé

Goldstein et al, 1977;Martz,1977; Rysler et al,1982). Aunque la presencia de calcio no es requerida para que se forme el complejo celular, es necesaria para que el evento lítico tenga lugar (Plaut et al, 1976).

b) Programación para la lisis y/o ataque letal.-

El estado denominado Programación para la lisis se definió en base a resultados experimentales que mostraron que cuando se permitía interaccionar a las células efectoras con las células blanco por tan sólo 10 minutos, la inmediata remoción de las primeras ya no prevenía la lisis ulterior de las células blanco. Es decir, éstas habían quedado programadas para una lisis subsecuente, proceso que toma varias horas y no requiere más la presencia de los LTCs (Martz,1975;1977). Esta etapa fue originalmente denominada así puesto que no era claro si la acción de los linfocitos T en estos primeros minutos posteriores al fenómeno de adhesión representaban ya un daño real a la célula blanco, o más bien alguna otra alteración que no fuera inicialmente lítica. Sin embargo, estudios posteriores demostraron en esta fase, la existencia de lesiones funcionales en la membrana de la célula blanco (Martz,1976). Después de la adhesión específica entre célula citotóxica y célula blanco y concomitante a los eventos post-acoplamiento de Programación para la lisis, la célula efectora ejerce un efecto tóxico para la célula blanco, fenómeno conocido como el del Ataque Letal. Con la excepción de que es unidireccional (Kupper et al, 1977) y localizado (Weizen et al,1981), el mecanismo de acción lítica es prácticamente desconocido. Se han manejado tres teorías para intentar explicarlo:

1).- Mediante la secreción de factores solubles tipo linfotóxica (Granger et al,1968), que en su forma más elaborada supondría la liberación de ciertos compuestos en forma inactiva por el linfocito T al momento de interaccionar con la célula blanco. Posteriormente estas moléculas pro-citotóxicas adquirirían su conformación activa al interaccionar con el complejo receptor-antígeno formado, destruyendo a la célula blanco en una forma polarizada. Esto aparentemente no es el caso, pues se ha demostrado que se puede abatir la actividad lítica de la célula efectora sin alterar su capacidad de secretar mediadores solubles del tipo mencionado (Henney,1974a).

2).- Se ha postulado que a través de conexiones intercitoplasmáticas entre la célula efectora y la célula blanco se establecerían canales de comunicación entre ambas sin contacto con el medio externo, por los cuales pasarían los componentes líticos (Sura et al, 1967; Selin et al, 1971) . Sin embargo este tipo de interconexiones no han podido ser identificadas (Biberfeld et al, 1975). Por otra parte, el tiempo requerido para que se formen uniones intercitoplasmáticas con estas características es mucho mayor que el necesario para que suceda el evento citotóxico (Mac Donald 1975).

3).- Finalmente, a través de mecanismos que involucran moléculas citotóxicas enlazadas a membrana. Estas moléculas adquirirían su posición activa y orientada en la superficie de la membrana efectora, justo en la zona de contacto específico con la célula blanco. Se ha postulado fosfolipasas (Frye et al, 1975), metil-transferasas y proteasas tipo tripsina. La evidencia más sugestiva e inesperada que apoya este modelo es la demostración de actividad citotóxica mediada por membranas plasmáticas purificadas de linfocitos T citotóxicos (Ferluga et al, 1975).

c) Destrucción de la célula blanco.-

Como consecuencia de la lesión irreversible inflingida por la célula efectora durante la fase del Ataque Letal, la célula blanco sufre un proceso de desintegración. La membrana muestra cambios progresivos en su permeabilidad. Inicialmente la lesión solo permite un rápido intercambio de iones inorgánicos y pequeñas moléculas. La salida de macromoléculas tiene lugar después como consecuencia de una regulación osmótica alterada (Martz et al, 1974).

La destrucción final de la célula aparentemente será ocasionada por las fuerzas osmóticas coloidales resultantes de la entrada de agua a ésta (Henney et al, 1974b).

Relación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) con el mecanismo de reconocimiento de los LTCs (Fenómeno de restricción por H-2.)

El CMH llamado H-2 en el ratón y HL-A en el humano, se encuentra ligado íntimamente con diversos fenómenos inmunes. Entre ellos, el rechazo de trasplantes alogénicos (Shrefflery David, 1975) y la regulación de respuesta de anticuerpos a ciertos antígenos, determinada por la expresión de genes inmunoreguladores (Katz et al, 1974; Klein, 1975). Comprendidas dentro de las moléculas de superficie celular codificadas por el Complejo H-2 se encuentran los antígenos mayores de histocompatibilidad denominados H-2K y H-2D, presentes en la mayoría de las células de ratón (Katz et al, 1974). Estos aloantígenos son glicoproteínas integrales de membrana de 45 000 daltones que por lo general se encuentran asociados a una proteína más pequeña denominada B-2 Microglobulina (Nathenson et al, 1974; Silver et al, 1974). Son precisamente estas glicoproteínas las reconocidas por los LTCs en una reacción de rechazo de trasplantes alogénicos. Por otra parte los LTCs solo podrán reconocer antígenos alterados o extraños expresados por células singénicas, únicamente si éstos son expuestos en presencia de los aloantígenos H-2K y H-2D homólogos. De esta manera tanto la expresión del antígeno alterado o extraño, como la del propio H-2, son indispensables para que un LTC pueda interaccionar y destruir a las células blanco (Berke et al, 1981).

Este fenómeno conocido como restricción por H-2 es bastante general y ha sido descrito en sistemas donde los LTCs se encuentran dirigidos en contra de antígenos virales (Zinkernagel, 1975, 1976; Koszinowski et al, 1975), antígenos menores de histocompatibilidad (Bevan, 1975a), antígenos inducidos por agentes químicos (Forman, 1975) y en contra de antígenos tumorales que es el caso que nos interesa (Schroder et al, 1975, 1976; Germain et al, 1975).

Linfocitos T Citotóxicos inducidos por lectinas

Las lectinas son proteínas de plantas que tienen la capacidad de interaccionar específicamente con ciertos residuos de carbohidratos (Nicolson, 1974). Por ser moléculas polivalentes pueden aglutinar células y producir diversas alteraciones en su superficie (Noonan et al, 1973; Forman et al, 1973; Rapin et al, 1974). Lectinas tales como la Concanavalina-A - (Con.A) y la Fitohemaglutinina (FHA) tienen efecto mitogénico en linfocitos T de ratón (Toyashima et al, 1976; Palacios, 1982). Si linfocitos T - no inmunes son colocados en presencia de estas lectinas sufren una transformación blastoide policlonal y adquieren la capacidad de ser citotóxicos si el ensayo de lisis se desarrolla en presencia de estas mismas proteínas. Sin embargo, tal actividad lítica es altamente inespecífica y una gran variedad de células pueden ser lisadas, inclusive células singénicas. De esta forma la actividad de este tipo de linfocitos es inespecífica e - inducida y revelada por lectinas (Bevan et al, 1975b; Asherson et al, - 1973). Se ha postulado que células con estas características son precursoras de los LTCs maduros que habiendo desarrollado su potencial lítico todavía no tienen suficiente cantidad de receptores específicos en su superficie, o son de baja afinidad (Rubens et al, 1977).

Efecto de lectinas en la lisis mediada por LTCs específicos.- De manera - similar si LTCs producidos específicamente son colocados en presencia de estas proteínas aglutinantes en un ensayo de citotoxicidad, su actividad - lítica tendrá lugar en ausencia de reconocimiento antigénico, perdiendo a sí su especificidad original y superando el fenómeno de restricción por - H-2 (Forman et al, 1973; Bevan et al, 1975b; Moller, 1964; Bonavida et al, 1976). Trabajos más recientes han demostrado que el papel de las lecti - nas en mediar este tipo de lisis inespecífica no se restringe a la forma - ción del complejo celular efectora-blanco, sino también a la activación - del mecanismo lítico en el linfocito (Green et al, 1978; Parker et al, - 1980). Se han reportado lectinas que preferencialmente inducen adhesión - celular como la Aglutinina de Germen de Trigo (AGT), y lectinas como la - Con.A y la FHA caracterizadas como potentes activadoras del mecanismo lí - tico.

Evasión tumoral de la respuesta inmune

Si una célula neoplásica induce en el huésped una respuesta inmune de rechazo en su contra, surge entonces la pregunta de cómo puede crecer y desarrollarse en este medio ambiente potencialmente hostil. En la literatura se han reportado diferentes mecanismos utilizados por la célula cancerosa para evadir o escapar a la reacción inmune en su contra y sobrevivir dentro de un sistema que de otra forma le sería letal.

Los más importantes son :

a) Modulación antigénica.-

Algunas células tumorales tienen la capacidad de modular la expresión de sus antígenos de superficie al momento de entrar en contacto con sus anticuerpos específicos (Klein, 1973), ya sea desprendiéndolos en forma de complejos inmunes o internalizándolos (Esmon et al, 1976). De esta manera, al disminuir o desaparecer los antígenos tumorales de su superficie, las células neoplásicas pueden evadir la respuesta inmune del huésped (Van Blitterswijk et al, 1975; Hilgers et al, 1980).

b) Desprendimiento antigénico.-

Ciertas neoplasias pueden desprender espontáneamente y en cantidades considerables antígenos tumorales de superficie al medio sin requerir de interaccionar con anticuerpos (Doljanski et al, 1976). Estos antígenos desprendidos tienen la capacidad de reaccionar con los LTCs y anticuerpos dirigidos en contra del tumor e inhibir su actividad lítica (Currie, 1973; Alexander, 1974).

c) Otros factores séricos solubles.-

A partir de los primeros reportes indicativos de que el suero de huéspedes portadores de tumores bloqueaban la actividad de linfocitos T y anticuerpos in vitro en contra del mismo tumor (Hellstrom et al, 1970; Hellstrom et al, 1969), muchos trabajos se abocaron a determinar la naturaleza de estos factores. Las primeras evidencias indicaron que posiblemente se trataba de cierto tipo de anticuerpos no citotóxicos denominados "bloqueadores o facilitadores", que competían por los mismos sitios antigénicos reconocidos por los LTCs (Todd et al, 1973). Estudios posteriores han dado mayor énfasis al papel de los complejos inmunes antígeno-anticuerpo en mediar este tipo de actividad bloqueadora (Baldwin et al, 1975).

d) Escasa antigenicidad.-

Cuando un tumor se encuentra en sus primeras etapas de desarrollo puede expresar cantidades muy pequeñas de antígenos tumorales para que el sistema inmune sea capaz de reconocerlos. Para el tiempo en que estos antígenos son finalmente detectados, el tumor ha crecido en tal magnitud que aún la mejor respuesta inmunológica de rechazo es insuficiente para controlarlo (Old et al, 1965; Klein, 1973).

e) Estados de inmunosupresión inducidos en el huésped por el tumor.-

Ciertos tumores son capaces de producir estados de inmunosupresión en sus huéspedes (Adler et al, 1971; Guillete et al, 1973; Golub et al, 1974) , mediante la secreción de moléculas farmacológicamente activas (Prescia et al, 1975) o a través de la estimulación de células T supresoras que abaten la respuesta inmune en su contra (Kirkwood et al, 1974).

ANTECEDENTES .-

Un tipo distinto de evasión inmune es el estudiado en nuestro laboratorio. El modelo experimental lo constituye un tumor de mieloma murino denominado LPC-1, inducido en ratones de la cepa BALB/c por aceite mineral. Las células que se obtienen del tumor LPC-1 de 2 a 4 días después de ser transplantadas en la cavidad peritoneal del ratón huésped (células LPC-1 tempranas), son susceptibles a la lisis por LITs y anticuerpos; sin embargo, si las células tumorales crecen por un período más largo y se recolectan de 12 a 14 días después de ser transplantadas (células LPC-1 tardías)- éstas son resistentes (Celis et al, 1979a). Se encontró que esta resistencia de las células LPC-1 tardías correlaciona con una disminución de 6 a 10 veces en la capacidad de estas células de reaccionar con anticuerpos anti-H-2, en comparación con las células tempranas (Hale et al, 1979).

Esto planteaba dos alternativas principales: que las células tardías dejan expresar sus antígenos de histocompatibilidad, o que éstos se encuentran inaccesibles de interaccionar con los anticuerpos y por lo tanto, con los LITs debido al fenómeno de restricción por H-2. Posteriormente se demostró que la aparición del fenotipo resistente, correlacionaba estrechamente con la expresión de una glicoproteína de aproximadamente 160 000 daltones (gp-160) que se acumula en la superficie de las células tumorales (Celis et al, 1979 b).

gp-160 es una glicoproteína formada por una sola cadena polipeptídica rica en ácido siálico, es sintetizada por las células tumorales y no simplemente adsorbida a su superficie del suero o líquido ascítico del huésped. Es altamente susceptible a tripsina y reacciona con algunas lectinas como la Con.A y la AGT (Celis et al, 1979 b). Además se observó que las células LPC-1 tardías y resistentes pueden revertir a tempranas y susceptibles y nuevamente capaces de reaccionar con anticuerpos anti-H-2, si: a) Se transfieren a un nuevo huésped y se recolectan después de 2 a 4 días de crecimiento (Celis et al, 1979a). b) Si se colocan en cultivo de tejidos por más de 4 días (Hale et al, 1979). c) O se tratan con algunas proteasas tales como la tripsina, quimiotripsina y subtilisina (Celis et al, 1979b). Todos estos tratamientos tienen en común que afectan la presencia de gp-160 en la superficie de las células tardías, haciendo desaparecerla prácticamente de su superficie.

En conjunto, estas observaciones sugieren que los antígenos H-2 realmente no disminuyen en las células tardías, sino que son bloqueados por

gp-160. También se ha observado que ambas células tumorales, tempranas y tardías, reaccionan por igual con anticuerpos dirigidos en contra de antígenos de superficie no relacionados con el Complejo H-2, y se demostró que la aparente interacción entre gp-160 y los antígenos H-2K y H-2D se mantiene en fragmentos de membranas celulares (Celis et al., 1980).

Estos resultados parecen indicar que gp-160 bloquea preferencialmente a estos aloantígenos interfiriendo en su reacción con los LITs y anticuerpos anti-H-2, evadiendo de esta manera su mecanismo lítico.

OBJETIVO .-

Siendo los LTCs la población efectora del sistema inmune principal - mente involucrada en el rechazo y destrucción de células neoplásicas, está bamos interesados en estudiar más detalladamente las interacciones entre - estos linfocitos y el mieloma murino LPC-1 y caracterizar con mayor deteni miento el papel que tiene gp-160 en cuanto a su capacidad de conferirles - resistencia inmune a estas células tumorales.

Este objetivo fundamental es abordado a través de dos acercamientos- experimentales diferentes:

Por una parte se estudia la posibilidad de que esta glicoproteína no solo funcione bloqueando los antígenos H-2, sino también interfiriendo con el - mecanismo lítico de los LTCs. Para responder a ello se analiza el papel de ciertas lectinas en alterar el fenotipo resistente del tumor frente a es - tas células efectoras y se discuten los posibles mecanismos de acción.

Por otro lado, se valora la pertinencia de los LTCs en el fenómeno de re - chazo de LPC-1 en ratones DBA/2 y se investiga la importancia que pueden - tener diferencias en antígenos menores de histocompatibilidad en este pro - ceso. En esta segunda parte el enfoque está dirigido a tener una visión - más completa de la dinámica de la reacción de rechazo inmune establecido - por los ratones DBA/2 en contra del tumor LPC-1 y cuál es su relación con - la presencia de gp-160 en estas células neoplásicas.

MATERIAL Y METODOS .-

Animales

Ratones congénitos de las siguientes cepas fueron utilizados: BALB/c (H-2^d), obtenidos a través del Instituto Mexicano del Seguro Social. DBA/2- (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b) y CBA/n (H-2^k) fueron originalmente obtenidos de los laboratorios Jackson, Bar Harbor Maine. Los ratones BALB/b (H-2^b) fueron donados por el Instituto Tecnológico de Massachussetts. Todas las cepas fueron reproducidas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Animales del mismo sexo y edad (6-10 semanas) fueron utilizados en cada experimento.

Tumores

Los tumores murinos de células plasmáticas (mielomas) LPC-1 (H-2^d) y X63 (H-2^d), los linfomas de células T EL-4 (H-2^b) y YAC-1 (H-2^k) y el mastocitoma P815 (H-2^d) fueron obtenidos del laboratorio del Dr. H. Eisen (Instituto Tecnológico de Massachussetts). LPK-1 es una sublínea del tumor LPC-1 adaptada a crecer en cultivo.

Los tumores fueron crecidos en forma de ascitis, transfiriendo 1×10^7 células intraperitonealmente a cada ratón a intervalos de 7 días. X63 y YAC-1 fueron mantenidas en cultivo a lo largo de todo el estudio. Células LPC-1 definidas como tempranas y tardías fueron tomadas 4 y 12 a 14 días respectivamente después de ser transplantadas en ratones BALB/c.

Medios de cultivo

Preparación de medio de cultivo para células tumorales . (Medio C) .- Todas las células crecidas in vitro se cultivaron en medio RPMI-1640 (GIBCO, # de Cat. 430-1800) adicionado con 2.0 gr. de Bicarbonato de Sodio (GIBCO, # de Cat. 895-1810). 100 ml. del Medio C completo se prepara con:

- 1) 1 ml de solución de antibióticos penicilina y estreptomina 100 x (GIBCO, # de Cat. 600-5145).
- 2) 1 ml de solución antimicótica (fungizone) 100x (GIBCO, # de Cat. 600 - 5295).
- 3) 1 ml de solución de L-Glutamina 200 mM 100x (GIBCO, # de Cat. 320-5030)
- 4) 10 ml de Suero Fetal Bovino (SFB) .
- 5) Se afora a 100 ml con RPMI-1640 adicionado con bicarbonato.

Preparación de medio de cultivo para LTCs . (Medio K) .

Cada 100 ml del Medio K completo se prepara con:

- 1) 1 ml de solución de antibióticos penicilina y estreptomina 100x.
- 2) 1 ml de solución antimicótica (fungizone) 100x.
- 3) 1 ml de solución de L-Glutamina 200 mM 100x.
- 4) 6 ml de SFB.
- 5) 1 ml de solución de aminoácidos no esenciales 10 mM 100x (GIBCO, 320-1140)
- 6) 2-Mercapto etanol a una concentración final de 50 μ M.
- 7) Se afora a 100 ml con RPMI-1640 adicionado con Bicarbonato.

GENERACION DE LTCs

A) In vivo .- Se produjeron LTCs específicos en contra de diferentes haplotipos. Para obtener LTCs anti-H-2^d, se inyectan intraperitonealmente 5×10^6 células LPC-1 viables por animal, en ratones BALB/b y C57BL/6. A los 15 y 30 días se inyectan nuevamente con 1×10^7 células tumorales. 4 días después de la tercera inmunización las células efectoras se obtienen por medio de lavados de la cavidad peritoneal con 5-10 ml de Solución Salina Balanceada de Hanks (SSB) (GIBCO, # de Cat. 310-4060).

Para obtener LTCs anti-H-2^b se utilizan ratones BALB/c y células tumorales EL-4 siguiéndose el mismo esquema anterior.

Para generar LTCs singénicos anti-LPC-1, 1×10^7 células LPC-1 son inyectadas intraperitonealmente en ratones DBA/2. El tumor es rechazado alrededor del día 12, tiempo en el cual se recogen las células efectoras por el método ya descrito.

B) In vitro .- En cultivo se produjeron LTCs de diferentes características: 1) Inespecíficos estimulados por Con.A, y 2) Específicos por medio de una reacción alogénica denominada Cultivo Mixto de Linfocitos (CML).

Obtención y preparación de células esplénicas para estos cultivos .- Con técnica estéril los bazo se remueven y se colocan en cajas de petri de plástico de 60 x 15 mm (Costar, # de Cat. 3060) conteniendo SSB. Se obtiene una suspensión celular disgregando el bazo en una malla metálica. Posteriormente las células se transfieren a tubos de plástico cónicos de 50 ml (Falcon Plastics, # de Cat. 2070) y se dejan 5 minutos en frío para que las partículas más gruesas sedimenten, transfiriendo el sobrenadante con una pipeta Pasteur a tubos nuevos. Las células se lavan una vez más con SSB, recuperándolas por centrifu

gación a 100 x g por 5 minutos. Finalmente se resuspende el botón celular en Medio K y se cuenta el número de células viables por medio del método del azul de tripano, ajustando las células a la concentración deseada.

1) Estimulación de células esplénicas in vitro por Con.A (LTCs inespecíficos)..- Se siguió el protocolo descrito por Bevan (1975b). Brevemente : - 5×10^7 células de bazo previamente preparadas por el procedimiento anterior, se resuspenden en 25 ml de Medio K que contiene 2 ug/ml de Con.A. Se colocan 25 a 30 ml de esta suspensión en cajas de petri de plástico de 100 x 20 mm - Costar, # de Cat. 3100). Los cultivos se mantienen a 37°C en una atmósfera húmedificada de 7% CO₂ y 93% aire (Todas las incubaciones a 37°C se mantienen en estas mismas condiciones). Las células se cosechan 3 días después para ser utilizadas en el ensayo de citotoxicidad.

2) Producción de LTCs específicos anti-H-2^d in vitro (CML)..-

a) Estimulación Primaria .- 7×10^6 células efectoras viables de bazo se cultivan junto con 3×10^6 células estimuladoras de un haplotipo de histocompatibilidad diferente, pretratadas con Mitomicina C, en 1 ml de Medio K. Se coloca 1 ml de esta suspensión por pozo en placas de cultivo de tejidos (Costar, # de Cat. 3524). Las células se alimentan el día 3 o 4 con 1 ml adicional de Medio K fresco por pozo y se cosechan el día 5 para el ensayo de citotoxicidad.

b) Estimulación Secundaria .- Para una estimulación secundaria, el CML original se mantiene en cultivo durante 14 días. En este día se adicionan nuevamente 3×10^6 células estimuladoras por pozo. Las células son cosechadas 3 días después para el ensayo de citotoxicidad.

GENERACION DE LTCs DE LARGA DURACION

Está ampliamente reportado en la literatura que sobrenadantes de células de bazo estimuladas in vitro por ciertos mitógenos como la Con.A y la FHA permiten mantener cultivos de LTCs específicos indefinidamente (Gillis et al 1977, 1987a; Rosenberg et al, 1978 ; Ruscetti et al, 1977), e inclusive establecer líneas clonadas y monoclonadas de estas células (Lutz et al, 1981; Engers et al, 1980; Baker et al, 1979; Glasebrook et al, 1980). Para obtener poblaciones de linfocitos con estas características, células provenientes de una estimulación secundaria son alimentadas con una mezcla de Medio K 50% y

50% sobrenadantes de células esplénicas estimuladas por Con.A, rico en factores de crecimiento de células T, ahora definido como Interleukina 2. Estos ITCs son estimulados cada 15 días con 1×10^6 células por ml tratadas con Mitomicina C. Se les cambia el medio y se diluyen cada 7 días aproximadamente.

Selección del SFB idóneo para estos cultivos de larga duración .- Se seleccionó qué marca y lote de SFB es el que permite la producción de los ITCs más activos. Esto es importante puesto que el SFB es un componente imprescindible - en cualquier medio de cultivo tradicional para células de mamífero, y no sólo el cambiar de marca, sino inclusive de lote puede alterar gravemente la viabilidad y el crecimiento de las células, por lo cual es necesario dado los períodos prolongados de cultivo de estas células, seleccionar un SFB que permita altos valores de lisis y del que se disponga en cantidades suficientes. Las figuras 1A, 1B y 1C muestran los resultados de este experimento, escogiéndose el utilizado en la figura 1C (Micro-lab producido en México).

Producción de Factor de crecimiento de células T (Interleukina 2) .- Se siguió la técnica descrita por Gillis (1978b) con algunas modificaciones. Breve mente: 1×10^6 células esplénicas viables de ratones BALB/c o DBA/2 en un ml de Medio K son cultivadas en presencia de Con.A a 2 ug/ml en cajas de petri de plástico a 37°C. A las 48 hrs. las células se centrifugan 500 x g por 10 minutos y se colecta el sobrenadante. La Con.A se absorbe utilizando G-50 en lote. El sobrenadante obtenido se guarda a -20°C hasta ser utilizado.

Tratamiento de células de bazo con Mitomicina C .- Con algunas modificaciones se siguió la técnica descrita por T. Meo (1979). Brevemente: Una cantidad de células esplénicas correspondientes a tres veces el número total de estimuladoras requeridas para el experimento, son transferidas a un tubo de 50 ml a una concentración de 1×10^7 células por ml en Medio K. La Mitomicina C se añade de una solución concentrada (500 ug/ml en RPMI-1640) a razón de 50 ul de ésta por cada ml de la suspensión celular. El tubo es incubado a 37°C por 30 minutos agitándolo ocasionalmente. Las células se lavan 4 veces en SSB fría y se resuspenden en Medio K. Finalmente se cuenta su viabilidad y se ajustan a la concentración deseada.

Inducción de ANs in vivo .- Ratones CBA/n son inyectados intraperitonealmente

con 100 mg de ácido poliinosínico: policistidílico (Poli I:C) en .2 ml de SAF, 24 horas después se extraen los bazo y las células de la cavidad peritoneal para probarse en el ensayo de citotoxicidad.

PREPARACION DE CELULAS BLANCO PARA EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Las células crecidas in vivo se obtienen por medio de lavados de la cavidad peritoneal con una solución salina amortiguadora de fosfatos (SAF). La mayoría de los eritrocitos contaminantes se eliminan con varios ciclos de centrifugación (40 x g por 10 minutos). Las células tumorales crecidas in vitro se centrifugan 1 vez en SSB. Blastos de Con.A son preparados incubando 5×10^7 células de bazo con 10 ug de Con.A en 5 ml de Medio K 2 a 3 días.

TRATAMIENTO DE LAS CELULAS CON TRIPSINA

1×10^7 células tumorales son lavadas 3 veces con SAF (100 x g por 5 minutos). Se resuspenden en 10 ml de SAF conteniendo 0.25 mg/ml de tripsina. Las células son incubadas 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente son lavadas 5 veces con SAF frío y se ajustan a la concentración deseada en Medio C. Para ensayos de citotoxicidad la viabilidad en todos los casos deberá ser igual o mayor al 90%.

MARCAJE CELULAR CON 51 CROMO PARA EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Las células blanco son marcadas incubando 5×10^6 células con 250 uCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, Mass. , 1 mCi/ml) en 0.5 ml de Medio C durante 1.5 horas a 37°C. Se centrifugan 4 veces en SSB fría y se ajustan a la concentración deseada en Medio C.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

2×10^4 células blanco previamente marcadas con ^{51}Cr . son colocadas en tubos de plástico con diferente número de células efectoras en un volumen final de 100 ul. Se añaden 50 ul de Medio C con o sin lectinas a las diferentes concentraciones utilizadas. Después de 4 horas de incubación a 37°C se agitan suavemente los tubos y se añaden 0.85 ml de SAF frío por tubo. Después de centrifugar las células (100 x g por 5 minutos) y tomar 0.5 ml del sobrenadante de cada tubo, se cuentan éste y el sobrenadante remanente con el paque-

te celular en un contador gamma (ABBOTT Autologic gamma counter). El porcentaje de lisis es calculado como porcentaje específico de liberación de ^{51}Cr , - el cual es igual a $(\text{LEX} - \text{LES}/1 - \text{LES}) \cdot 100$, donde LEX y LES corresponden a - la liberación del radioisótopo en presencia de LTCs (liberación experimental) y en ausencia de LTCs (liberación espontánea) respectivamente.

ENSAYO DE AGLUTINACION DE CELULAS TUMORALES POR LECTINAS

2×10^5 células tumorales en 50 ul de RPMI-1640 adicionado con Albúmina Sérica Bovina al 0.1%, son colocadas en placas de cultivo de tejidos con pozos de fondo plano (Falcon, # de Cat. 3040). Se añaden 50 ul del mismo medio con las diferentes concentraciones de lectinas a probar. Después de incubar las células por 1 hora a temperatura ambiente, se observa en el microscopio invertido el grado de aglutinación.

CONJUGACION DE Con.A CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEINA

Para acoplar las moléculas de Con.A con el isotiocianato de fluoresceína (FITC) se siguió el método descrito por Cebra y Goldstein (1965) para marcar anticuerpos, con algunas modificaciones. Brevemente: 5 mg de proteína se mezclaron con 12.5 ug de FITC por ml en una solución de 0.1 M de Na_2CO_3 . Ph 9 a 4°C durante 18 horas con agitación lenta. Posteriormente esta solución se centrifuga para eliminar los precipitados formados. La separación del conjugado de la FITC libre se lleva a cabo mediante una cromatografía en una columna de Sefadex G-25 equilibrado con SAF.

RESULTADOS.-

Parte I. Estudio de las interacciones entre LPC-1 y los LTCs utilizando diversas lectinas.

Como ya fué descrito en la introducción, para que un LTCs específico pueda reconocer a su célula blanco y destruirla, es necesario que ésta exprese en su superficie celular los antígenos del CMH. Si estos aloantígenos no están presentes, son distintos a los que indujeron al LTCs a diferenciarse, o se encuentran inaccesibles a los receptores de las células efectoras, éstas son incapaces de ejercer su actividad citotóxica. Sin embargo, la adición de ciertas lectinas en el ensayo de lisis es capaz de superar este requisito de la expresión del H-2, y una gran variedad de células blanco pueden ser destruidas inespecíficamente por los LTCs.

Este efecto de las lectinas en mediar lisis inespecíficamente nos es de gran utilidad para estudiar con más detalle el papel de gp-160 en la resistencia a los LTCs mostrada por el tumor LPC-1. Particularmente para estudiar la posibilidad de que gp-160 no solo tuviera la función de bloquear el proceso de reconocimiento linfocito-tumor al enmascarar el H-2, sino también la de interferir directamente con el mecanismo de lisis de los LTCs. En el caso de la lisis del tumor LPC-1 mediada por anticuerpos más completamente, se ha descrito un fenómeno de este tipo en el cual gp-160 aparte de bloquear el acceso de los anticuerpos anti-H-2, ha mostrado también actividad anticomplementaria (Celis B. et al, 1983). Basados en esto, era interesante demostrar si la presencia de esta glicoproteína en la superficie de las células tumorales les permitía ser resistentes a la actividad lítica ulterior al fenómeno de reconocimiento de los LTCs.

El diseño experimental es relativamente simple: Consistiría en colocar células LPC-1 en presencia de diferentes tipos de LTCs y añadir en el ensayo de citotoxicidad las distintas lectinas a probar, tratando de forzar interacciones inespecíficas entre linfocitos y estas células tumorales, superando de esta manera el fenómeno de restricción por H-2.

En estas condiciones experimentales si se encontraba efecto positivo mediado por alguna lectina y si éste era o no modificado por la presencia de gp-

160, nos daría información valiosa para un entendimiento más completo de las funciones de esta macromolécula en relación a la resistencia inmune de las células tumorales que las portan.

Efecto de la AGT y la FHA en la lisis de LPC-1 tardío por LTCs. Ensayo preliminar.

Se produjeron LTCs in vivo específicos anti-H-2^b e inespecíficos inducidos por Con.A. Para este ensayo de citotoxicidad se utilizaron como células blanco, aparte de LPC-1, P815 y EL-4 como controles. En la figura 2A utilizando los LTCs anti-H-2^b se puede observar lo siguiente: a) LPC-1 permanece resistente tanto en presencia de la AGT como de la FHA. b) P815 se torna susceptible en presencia de la FHA pero la AGT no muestra efecto alguno. Estos linfocitos específicos en ausencia de lectinas son incapaces de interactuar con estos tumores pues están dirigidos en contra de otros antígenos de histocompatibilidad, el hecho de que en presencia de la FHA sean capaces de destruir a P815, es un control positivo de lisis inespecífica - propiciada por la lectina. c) El tumor EL-4 es ampliamente lisado en ausencia de lectinas. Esto era lo esperado pues EL-4 es la célula blanco en contra de la cual están dirigidos los LTCs utilizados, sin embargo, la adición de FHA incrementa ligeramente su lisis. La AGT en este caso tampoco muestra efecto alguno.

Utilizando los LTCs inespecíficos inducidos por la Con.A, se observan en la figura 2A los siguientes resultados: a) La presencia de la AGT y la FHA no alteran el fenotipo resistente de LPC-1 tardío. b) Tanto EL-4 - como P815 son ampliamente destruidos por estos linfocitos inespecíficos si la FHA está presente en el ensayo. La AGT no tiene efecto.

Por qué LPC-1 permanece resistente a la lisis mediada por estos LTCs en presencia de las lectinas probadas, siendo que la FHA es capaz de mediar lisis inespecífica de P815 y EL-4 . Estas diferencias en la susceptibilidad de estos tumores pueden deberse a tres causas principales: a) Que la FHA no sea capaz de formar uniones inespecíficas entre LPC-1 y las células efectoras - probadas; b) Que a pesar de aglutinar a LPC-1 (rico en gp-160), el tumor - sea resistente en estas condiciones al mecanismo lítico de los LTCs; c) -

Que no se esté utilizando la dosis adecuada de lectinas para ver un efecto positivo.

Todas estas posibilidades serán evaluadas a lo largo del trabajo.

Efecto de diferentes concentraciones de AGT de 2 distintas fuentes en la lisis del tumor P815 por LTCs inespecíficos.

Basados en los resultados negativos de la AGT para mediar lisis inespecífica, era posible que no se estuviera empleando a la concentración óptima para observar algún efecto. Para verificarlo se probaron muestras de AGT de Sigma y Pharmacia a diferentes concentraciones en un ensayo de citotoxicidad. Puesto que existen reportes en la literatura de que la AGT a ciertas concentraciones sólo produce aglutinación entre LTCs y células tumorales - sin destruirlas (Wei-Zen et al, 1981; Parker et al, 1980), y sólo añadiendo otras lectinas activadoras del mecanismo lítico (Con.A y FHA) se consigue su lisis; se probó también este posible efecto sinérgico en nuestro sistema combinando AGT con FHA. En la tabla I se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar que: a) La AGT de Sigma no mostró tener efecto a ninguna de las concentraciones probadas. b) La AGT de Pharmacia manifiesta grados variables en su capacidad de mediar actividad citotóxica dependiendo de la concentración utilizada, alcanzando un óptimo a 10 ug/ml. Estos resultados se repitieron probando dos lotes diferentes de cada fuente. c) Para el caso de las mezclas de AGT y FHA, no se encontró un efecto aditivo o de potenciación claro.

Estos resultados demuestran que la AGT por si sola es capaz de unir a los LTCs inespecíficos con las células tumorales P815 y además activar el mecanismo lítico de estos linfocitos, condiciones necesarias para que la lisis tenga lugar.

Efecto de la AGT de Pharmacia en la destrucción de LPC-1 por LTCs inespecíficos.

Una vez establecido que la AGT de Pharmacia (de aquí en adelante la única utilizada) era capaz de mediar lisis de P815, en presencia de LTCs in-

específicos, y determinada la dosis óptima, se probó su efecto con el tumor resistente LPC-1. En la figura 3A se puede observar que: a) LPC-1 permanece resistente en presencia de la FHA y la Con.A. b) Sin embargo, tanto en presencia de la AGT sola, como las combinaciones AGT-Con.A y AGT-FHA, este tumor se torna susceptible. c) Las mezclas de lectinas mencionadas no potencian su capacidad de mediar lisis de LPC-1 por estos linfocitos. En la figura 3B se puede observar cómo el tumor P815 utilizado como control positivo es altamente destruido por las tres lectinas probadas.

El hecho de que la AGT sea capaz de volver susceptible a LPC-1 tardío a ser destruido por estos LTCs, es un resultado que es importante enfatizar, pues nos provee de una herramienta experimental valiosa que nos permite estudiar con mayor detenimiento el fenotipo resistente de LPC-1 y su relación con la presencia de gp-160.

Efecto de lectinas en la lisis de LPC-1 utilizando LTCs específicos anti-H-2^d.

Una vez demostrado que LPC-1 se volvía susceptible a ser destruido por LTCs inespecíficos si en el ensayo de citotoxicidad se añadía AGT; el siguiente paso fue estudiar el efecto de esta lectina en un sistema mejor definido utilizando LTCs anti-H-2^d. Por otra parte las características de esta clase de linfocitos son más semejantes al tipo de células efectoras que el tumor enfrentaría in vivo. En la figura 4, donde se muestran estos resultados se puede apreciar que: a) LPC-1 sin lectinas o en presencia de Con.A permanece resistente. b) La presencia de la AGT es capaz de revertir el fenotipo resistente de LPC-1, como si hubiese sido pretratado con tripsina (el tratamiento de LPC-1 con esta enzima, remueve la glicoproteína de la superficie). Esto significa que esta lectina está siendo capaz de nulificar el efecto de enmascaramiento producido por gp-160, y que LPC-1 tardío no es resistente al mecanismo lítico de los LTCs, sugiriendo además que la expresión de esta glicoproteína no le confiere a la célula tumoral un efecto protector adicional que interfiera directamente con la actividad lítica de los LTCs.

Efecto de diferentes concentraciones de AGT, Con.A y su combinación en la lisis de LPC-1 tardío por LTCs específicos anti-H-2^d.

Una vez demostrado que la AGT a diferencia de la Con.A, era capaz de mediar la destrucción de LPC-1 tardío por linfocitos anti-H-2^d, faltaba por definir su rango óptimo de concentración para estos linfocitos, pues la concentración ideal determinada anteriormente fué evaluada utilizando linfocitos inespecíficos y podría variar en ambos sistemas. Con respecto a la Con.A, cabía también la posibilidad de no estar ensayándola en la dosis correcta para observar efecto. En este experimento se analizó también el efecto de utilizar la combinación AGT-Con.A. Las figuras 5A, 5B y 5C muestran respectivamente estos resultados en donde se observa que: a) La lisis de LPC-1 en presencia de diferentes concentraciones de AGT (10, 20 y 30 ug/ml- aumenta de manera similar). b) Por su parte, ninguna de las concentraciones probadas de Con.A fueron capaces de aumentar la escasa lisis de LPC-1 en ausencia de lectinas. c) Finalmente, la curva de lisis de LPC-1 ante las mezclas de AGT-Con.A a las distintas dosis probadas, es igual a la provocada por la AGT sola. Es decir, no hay fenómeno sinérgico o de potenciación detectable.

Efecto de la AGT a diferentes concentraciones en la lisis de LPC-1 tardío tratado y no tratado con tripsina por LMCs específicos anti-H-2^d.

Se estudió la capacidad de la AGT en alterar la lisis de LPC-1 previamente tratado con tripsina. El objetivo de ésto era determinar si los dos tratamientos podrían actuar en forma aditiva. Esto permitiría evaluar con más detalle el papel de gp-160 en el comportamiento resistente de LPC-1 frente a los LMCs. En la figura 6A se observa, como ya había sido anteriormente mostrado, que la AGT, a las tres concentraciones probadas, aumenta en una manera importante y similar la lisis de LPC-1 tardío. Por su parte la amplia lisis de LPC-1 pretratado con tripsina en la figura 6B, sólo muestra un ligero incremento cuando se añade AGT a 10 y 20 ug/ml respectivamente. A 30 ug/ml de esta lectina, prácticamente no hay cambio en el patrón de muerte celular con respecto al control (LPC-1 tardío tratado con tripsina). Finalmente en la figura 6C se observa que la lisis de P815 es alta en ausencia de lectinas, aumentando ligeramente cuando se añade la AGT a 10 ug/ml. Sin embargo, concentraciones mayores de la AGT inhiben fuertemente la actividad citotóxica de estos linfocitos. Este fenómeno puede deberse a que a altas -

concentraciones de la lectina se forcen interacciones entre dos o más células efectoras destruyéndose entre si y disminuyendo el número de linfocitos viables capaces de atacar a las células tumorales.

El hecho de que no se manifiesten diferencias importantes en las curvas de lisis entre LPC-1 tardío + AGT y LPC-1 tardío tratado con tripsina con o sin esta lectina, sugiere que el papel de gp-160 se restringe únicamente a una función de enmascaramiento, de forma que si el linfocito anti-H-2^d es obligado a interactuar con estas células tumorales por medio de la AGT, superando así los requerimientos de especificidad y de reconocimiento antigénico, las células LPC-1 ricas o carentes de esta glicoproteína son igualmente destruidas.

Ensayo de Aglutinación de células tumorales.

Con la finalidad de determinar a qué se debían las diferencias observadas entre las lectinas AGT, Con.A y FHA en cuanto a mediar lisis de LPC-1 se realizó un ensayo cualitativo de aglutinación de los tumores LPC-1, P815 y 315-OPEC, que es otro mieloma resistente gp-160 positivo. Estos resultados se encuentran expresados en la tabla II. Se encontró que correlacionaba positivamente la capacidad de las lectinas para aglutinar el tumor con su capacidad para mediar lisis celular por los LTCs. P815 es ampliamente aglutinado por las tres lectinas y como se ha mostrado en los ensayos anteriores de citotoxicidad, todas estas lectinas produjeron lisis inespecífica de éste. En cambio, las células LPC-1 y 315-OPEC, sólo son considerablemente aglutinadas por la AGT, única lectina capaz de mediar la lisis de LPC-1 por LTCs inespecíficos y anti-H-2^d. Estos resultados apoyan la idea de que el papel de esta lectina, al revertir el fenotipo resistente de LPC-1 tardío a ser lisado por los LTCs, consiste básicamente en forzar las interacciones entre los linfocitos efectores y las células tumorales. Puesto que la Con.A y la FHA son incapaces de aglutinar el tumor, posiblemente tampoco sean capaces de unir linfocitos y células tumorales, lo cual es un requisito indispensable para que ocurra la lisis.

Marcando la Con.A con isotiocianato de fluoresceína e incubando células LPC-1 y P815 con este complejo para ser observadas en el microscopio de epifluorescencia, (figuras 7A y 7B respectivamente), se puede apreciar que ambos tipos de tumores fijan ampliamente la Con.A marcada en su superficie. Sin embargo, sólo P815 es fuertemente aglutinado. Las diferencias en los pa

trones de aglutinación en ambos tumores, a pesar de que la Con.A se fija positivamente en los dos, pueden deberse a la localización particular de los sitios de unión específicos para estas lectinas en la superficie de las células tumorales. Si éstos se encuentran en lugares profundos de la membrana (crípticos), la lectina al interaccionar con alguno de ellos en una célula, quedaría impedida de alcanzar estos mismos sitios de unión en otras, y por lo tanto sería incapaz de actuar como puente de unión entre ambas. Por otra parte en la literatura se ha descrito que asociado al proceso de aglutinación por Con.A, existe una reorganización de estos sitios de pegado para esta lectina. Estas moléculas se encuentran homogéneamente distribuidas en la superficie de la célula tumoral, en el momento en que entran en contacto con la lectina, solamente las células en las que se agrupan estos complejos en forma de conglomerados, son capaces de aglutinar (Noonan et al, 1973; Rosenblith* et al, 1973): Con LPC-1 podría darse un fenómeno de este tipo.

Efecto de la AGT en la lisis de LPC-1 tardío utilizado LTCs específicos en contra de antígenos de histocompatibilidad diferentes a los expresados por este tumor.

Si la AGT produce lisis de LPC-1 fundamentalmente como consecuencia de formar interacciones de una manera inespecífica, superando de esta manera el efecto de enmascaramiento producido por gp-160 y el fenómeno de restricción por H-2; entonces LPC-1 también debería de ser igualmente destruído en presencia de esta lectina si se utilizaran LTCs dirigidos en contra de otro H-2 (cualquiera). Como se puede observar en la figura 8, esto no fue el caso, pues LPC-1 permaneció altamente resistente frente a LTCs específicos anti-H-2^b. Es interesante notar que la lisis inespecífica de P 815 mediada por esta lectina al utilizar estos linfocitos, también es muy escasa. Estos resultados complican la función inicialmente asignada a esta lectina en su capacidad de mediar la lisis de LPC-1; la cuál necesariamente ya no puede solo circunscribirse a la formación de uniones conducentes a lisis entre linfocitos y células tumorales, al menos en un sistema que utiliza LTCs específicos.

*.- Rosenblith, J.Z., Ukena, T.E., Yin, H.H., Berlin, R.D., and Karnovsky, M.J. (1973), A comparative evaluation of the distribution of concanavalin A-binding sites on the surfaces of normal, virally-transformed, and protease-treated fibroblast. Proc. Nat. Acad. Sci. 70:1625.

Efecto de preincubar LPC-1 tardío con AGT en un ensayo de citotoxicidad usando LTCs específicos anti-H-2^d.

Es claro que el papel de la AGT en producir lisis de LPC-1 tardío por LTCs anti-H-2^d, en caso de que formara complejo efectora/blanco (todavía -- por demostrarse) su mecanismo de acción no se restringe solamente a esto.-- Trabajos previos del laboratorio habían mostrado que esta lectina es capaz de interaccionar con gp-160 y dada la característica polivalente de la AGT-- podrían producirse rearrreglos en la superficie de la célula tumoral tales -- como la formación de "parches y casquetes" del tipo antígeno-anticuerpo. De hecho recientemente se ha demostrado en el laboratorio que LPC-1 en presencia de la AGT forma agregados que pueden ser desprendidos por la célula tumoral (Celis B, 1983). Complejos moleculares lectina-gp-160 podrían separarse de la célula tumoral o al menos alterar la distribución original de esta -- glicoproteína. Como consecuencia de estos procesos la lectina podría estar descubriendo los aloantígenos H-2^d bloqueados por gp-160, permitiéndole únicamente a los LTCs anti-H-2^d interaccionar específicamente con la célula tumoral y ejercer su efecto lítico. Con la finalidad de determinar la existencia de este posible fenómeno de "desenmascaramiento" producido por la AGT, células LPC-1 tardías se incubaron en presencia de la lectina durante 1.5 horas en condiciones metabólicamente activas. Después de lavarse extensivamente en medio rico en α -metil-manósido, que es el ligando natural de esta lectina, para removerla de la superficie celular y de esta manera observar, en caso de que fuera irreversible, sólo el efecto de la lectina en el proceso de incubación previa y no en el ensayo de citotoxicidad. Células P 815 fueron sometidas al mismo tratamiento como control. En las figuras 9 A y 9-B, se muestran los resultados respectivos obtenidos: a) LPC-1 pretratado -- con la AGT permanece resistente. b) Si la AGT se añade en el ensayo de citotoxicidad, LPC-1 tardío se vuelve susceptible. c) Si la AGT se añade junto -- con el azúcar inhibidor, en el ensayo de lisis, la lectina no tiene efecto. d) P 815 incubado tanto con la AGT como sin tratar es amplia e igualmente -- destruido por estos linfocitos en ausencia de lectinas en el ensayo de citotoxicidad. e) Además si la AGT se añade en el ensayo de lisis de P 815, la destrucción del tumor se inhibe considerablemente. Este efecto de inhibición es suprimido si el azúcar competidor se añade al medio.

Aparentemente los cambios o alteraciones que produce la AGT en la superficie de LPC-1 necesarios para que el mecanismo lítico de los LTCs anti-H-2^d se active, son reversibles y dependen de la presencia de esta lectina--

en el ensayo de citotoxicidad. La AGT, como ha sido reportado en otros trabajos, puede mediar adhesiones inespecíficas no conducentes a lisis entre linfocitos específicos y células tumorales (Wei-Zen et al, 1981; Parker et al, 1980). Tal parece que por sí misma es incapaz de disparar el mecanismo citotóxico de linfocitos efectores específicos. Solamente si los LTCs están dirigidos en contra de los antígenos de histocompatibilidad expresados por IPC-1 la AGT puede mediar su destrucción. Esto indica que si esta lectina actúa de manera similar sobre los linfocitos específicos, sin importar en contra de qué esten producidos, entonces la AGT debe estar "descubriendo" los antígenos pertinentes en la superficie de la célula tumoral, que activen el mecanismo lítico de los linfocitos anti-H-2^d, ya sea desprendiendo a gp-160 de la superficie celular o al menos alterando su función.

RESULTADOS.-

Parte II. Estudio de las interacciones entre el tumor LPC-1 y los LTCs provenientes de ratones DBA/2 que han rechazado el tumor.

Un enfoque diferente al estudio de las interacciones entre LTCs y células tumorales LPC-1, es ofrecido por el comportamiento de este tumor en ratones DBA/2. Si LPC-1 es inyectado intraperitonealmente en ratones de esta cepa, - singénicos con el tumor pero con diferencias en antígenos menores de histo - compatibilidad, las células neoplásicas son eliminadas después de haber cre - cido durante los primeros diez días en igual forma y magnitud que en los ra - tones BALB/c . Estos en cambio , mueren víctimas del tumor alrededor del - día 15. De un promedio de 50×10^7 células neoplásicas viables por ratón DBA /2 el día 10, sólo quedan restos celulares de éstas, dos o tres días después. ¿Cual es el papel de los LTCs en este proceso?

Es importante mencionar que asociado con la destrucción de las células tumorales LPC-1 en la cavidad peritoneal, aparecen, junto con células linfoides, grandes cantidades de células adherentes que morfológicamente poseen - las características propias de los macrófagos activados (Mackness, 1970). - Ver figuras 10A y 10B respectivamente. Estas células podrían estar cooperan - do con los LTCs atacando directamente a las células tumorales y producir un efecto sinérgico de lisis, como ya ha sido previamente reportado en la lite - ratura en un modelo que utiliza precisamente macrófagos activados y LTCs pe - ritoneales de ratones DBA/2 (Robinson et al, 1982). Sin embargo, estudios - preliminares, muestran que estas células adherentes no tienen actividad cito - tóxica antitumoral en contra de LPC-1.

Efecto de ANs en la lisis de LPC-1 in vitro.-

Con la finalidad de determinar si otras poblaciones efectoras aparte - de los LTCs o en conjunción con estos, estuvieran involucradas en el mecanis - mo de rechazo de este tumor, se estudió su susceptibilidad a ser destruido - por células ANs. Como se puede apreciar en la Figura 11, un ensayo de cito - toxicidad mediado por estas células, demuestra que LPC-1, independientemente de la expresión de gp-160, permanece resistente.

Los resultados negativos de macrófagos activados y ANs en cuanto a lisar - LPC-1, sugieren un papel más activo a los LTCs encontrados en la cavidad pe - ritoneal para poder explicar la destrucción del tumor in vivo.

Especificidad de los LTCs obtenidos al inmunizar ratones DBA/2 con células tumorales LPC-1.-

Con el fin de determinar la especificidad de los LTCs presentes en la cavidad peritoneal de los ratones DBA/2 al tiempo en que el tumor es rechazado, se probó su actividad citotóxica in vitro.

Los dos siguientes experimentos fueron enfocados a estudiar la importancia que podrían tener las diferencias en los antígenos menores de histocompatibilidad existentes entre el tumor LPC-1 (originado en BALB/c), y los ratones DBA/2, y su relación con la respuesta de rechazo inmune. Como se puede apreciar en las figuras 12 y 13, estos linfocitos son incapaces de lisis en alto grado células LPC-1 tardías. Sin embargo, si el tumor es pretratado con tripsina, sus valores de lisis aumentan claramente. Lo relevante es que tanto Blastos de BALB/c (Figura 12), como el tumor X63 (Figura 13), que es otro mieloma inducido en ratones BALB/c, gp-160 negativo; mostraron un alto grado de susceptibilidad a ser destruidos por estos linfocitos singénicos. Esto indica que al menos una subpoblación de estos linfocitos, están dirigidos en contra de antígenos menores de histocompatibilidad, y que esta diferencia antigénica puede tener un papel importante en la destrucción de LPC-1.

Producción de LTCs de larga duración.-

La finalidad básica de producir un cultivo de LTCs de larga duración -- era la de obtener una población homogénea y altamente purificada de linfocitos anti-H-2^d, que permitiera validar el estudio microscópico de las interacciones entre linfocitos citotóxicos y las células tumorales LPC-1. Esto haría posible comparar los resultados obtenidos por la AGT en cuanto a su capacidad de mediar lisis, con la de favorecer o forzar interacciones entre LTCs y células LPC-1. De cualquier otra manera, sería sumamente difícil determinar la naturaleza del linfocito unido a la célula neoplásica. Por otra parte, con respecto a los macrófagos existentes en la cavidad peritoneal cuando LPC-1 es rechazado; otro posible mecanismo de cooperación con los LTCs, sería mediante la secreción de factores solubles al medio, o actuando directamente sobre las células tumorales para remover física, o al menos funcionalmente a gp-160 de la superficie de las células LPC-1, y de esta manera

hacer posible una interacción positiva entre linfocitos y células tumorales, provocando así su destrucción. Nuevamente la obtención de un cultivo altamente purificado de LTCs, permitiría evaluar al microscopio esta posibilidad. Además, éstos serían simplemente dos ejemplos de la gran utilidad y aplicación para resolver un problema experimental concreto, de tener a la mano cultivos de linfocitos T con estas características. El reciente desarrollo de esta técnica ha revitalizado el campo de la inmunología celular, permitiéndole analizar fenómenos hasta la fecha inabordable o de difícil interpretación (Schwartz, 1982; Nobel et al, 1981).

En la figura 14 se comparan las actividades líticas de los LTCs convencionales específicos anti-H-2^d producidos en un CMH de 5 días, con el cultivo de LTCs de 20 días crecido ya en presencia de Interleukina 2. Se puede apreciar que aunque los patrones de lisis son muy parecidos, los LTCs de 20 días tienen mejor actividad. Finalmente en la Figura 15 se observa la actividad citotóxica de estas células a los 63 y 104 días de cultivo, utilizando como blancos células P 815 y LPK-1 respectivamente. Sin embargo, a pesar de mostrar que en nuestras condiciones se pueden mantener creciendo estos linfocitos y con altos valores de lisis, es necesario aumentar su viabilidad y velocidad de crecimiento antes de utilizarlos en experimentos más detallados.

DISCUSION GLOBAL Y COMENTARIOS.-

Parte I.- La interpretación del papel de la AGT en mediar lisis de LPC-1 por LTCs es compleja. Por un lado, a diferencia de la Con.A y la FHA, es capaz de aglutinar y volver susceptible al tumor utilizando LTCs inespecíficos inducidos por Con.A, o específicos anti-H-2^d. Si la función de la AGT se limitara a formar interacciones inespecíficas entre linfocitos y células-neoplásicas LPC-1, superando los requerimientos de la expresión de los antígenos del CMH, entonces también debería inducir la lisis de LPC-1 por LTCs dirigidos en contra de otro H-2. Sin embargo, esta lectina no muestra efecto alguno al utilizar LTCs anti-H-2^b como células efectoras en contra del tumor. Este hecho, indica que la función de la lectina no puede restringirse sólo a la formación de agregados celulares. Basados en esto, se estudió la posibilidad de que la AGT al interaccionar con gp-160 en la superficie de la célula tumoral y dadas sus características polivalentes, pudiera formar complejos moleculares cuyas características alteraran la presencia y topografía de esta glicoproteína, y consecuentemente se modificara su función enmascaradora, dejando al descubierto los sitios antigénicos solamente reconocidos por los LTCs específicos anti-H-2^d, permitiendo la activación de su mecanismo lítico. De ser así, porqué entonces esta lectina es capaz de revelar la actividad citotóxica de los LTCs inespecíficos y no la de los LTCs anti-H-2^b. Esta diferencia podría deberse a los distintos estados de diferenciación en que se encuentran ambas poblaciones efectoras.

Por otra parte, hasta aquí resulta imposible definir si gp-160, aparte de enmascarar el H-2, le confiere a las células tumorales LPC-1 otras características de resistencia al ataque lítico de los LTCs, pues la presencia de la AGT en el ensayo puede alterar también su ubicación y funcionamiento. En este punto se vuelve necesario la aplicación de técnicas más sensibles y cuantitativas que permitan por un lado detectar esta glicoproteína en la superficie de las células tumorales, como también su actividad enmascaradora y así determinar en qué manera la presencia de la AGT altera estos parámetros. En esta forma se podrá tener una idea más clara de su mecanismo de acción y un entendimiento aún más detallado del papel de gp-160 en el comportamiento resistente de los tumores que la expresan.

Existen en la literatura algunos reportes de otros tumores que median-

te mecanismos similares son resistentes al ataque inmune por LTCs y anticuerpos. El primero de ellos, trata sobre una glicoproteína de aproximadamente 500 000 daltones, llamada epiglicanina, que se encuentra presente en la superficie celular del adenocarcinoma mamario TA3 (Sanford, 1972; Codrington 1978). Este tumor reacciona poco con anticuerpos anti-H-2 y sobrevive al ser transplantado a través de barreras de histocompatibilidad en otras cepas de ratón e inclusive en ratas y hamsters (Friberg, 1972). Estas células al ser tratadas con neuroaminidasa o tripsina reaccionan mejor con los anticuerpos, pueden ser rechazadas en los trasplantes histoincompatibles y desaparece la epiglicanina de su superficie (Bekesi, 1972). El segundo ejemplo se trata de una glicoproteína de 120-160 000 daltones que se encuentra presente en la superficie de un mieloma de la cepa BALB/c originado en el Japón, que también es resistente a los anticuerpos anti-H-2 más complemento (Tokuyama et al, 1978). Sin embargo, en ninguno de los trabajos mencionados se ha estudiado el efecto de lectinas para inducir la lisis de estos tumores por LTCs, por lo que no se puede establecer un patrón de comparación con los resultados obtenidos en esta investigación.

Parte II.- Con respecto al dramático rechazo de LPC-1 en los ratones DBA/2 donde los macrófagos activados y las ANs no mostraron actividad citotóxica en su contra, se estudió la especificidad de los LTCs obtenidos en estos animales, y los resultados sugieren que diferencias en antígenos menores de histocompatibilidad pueden tener un papel activo en este proceso. Por otra parte, en caso de existir, permanece todavía por demostrarse el tipo de cooperación que para destruir el tumor LPC-1, se daría entre los macrófagos activados y los LTCs encontrados en la cavidad peritoneal de estos ratones. Cultivos de LTCs de larga duración serán de gran utilidad en este tipo de estudios, pues permitirán definir con mayor claridad si el macrófago está haciendo posible interacciones positivas entre linfocitos citotóxicos y las células tumorales LPC-1. En este contexto sería muy interesante demostrar que gp-160 es sensible a plasmina y que las células adherentes mencionadas se encuentran inducidas a sintetizar activador de plasminógeno, como ha sido reportado para otros macrófagos activados (Unkelness; 1974; Gordon et al, 1974; 1978). Estudios de este tipo darían una visión más completa de la compleja dinámica existente en la interacción de este tumor con los mecanismos inmunes del huésped encargados de mantener su integridad; y de cuáles serían algunas de las respuestas alternativas manipuladas por el organismo para en

frentar con mejores posibilidades el mecanismo de enmascaramiento utilizado por estas células neoplásicas, para evadir la respuesta inmune de rechazo.

Finalmente, baste decir que la expresión de gp-160 y glicoproteínas de este tipo en la superficie celular, aunque se han detectado únicamente en células tumorales, no se ha demostrado que sean características de una condición neoplásica. Su presencia en ciertas células normales podría ser determinante para que estas pudieran llevar a cabo correctamente su función. Un ejemplo claro de esto, serían las células del trofoblasto que en mamíferos representan un tipo de aloinjerto, al exponer el feto los antígenos de histocompatibilidad del padre, en contra de los cuales la madre podría entablar una respuesta inmune de rechazo. La existencia de glicoproteínas como gp-160 que bloquearan estos aloantígenos en etapas críticas del desarrollo fetal, podría ser determinante para su sobrevivencia.

EPILOGO.-

Parte I.

Un tumor de mieloma murino (LPC-1), haplotipo de histocompatibilidad- $(H-2^d)$, se vuelve resistente (LPC-1 tardío) a la lisis por LTCs y anticuerpos más complemento, mediante la síntesis de una glicoproteína de superficie de 160 000 daltones (gp-160) que enmascara los antígenos H-2. Sin embargo, si la lectina AGT* (a diferencia de la FHA y la Con.A) está presente en un ensayo de citotoxicidad que utiliza LTCs inespecíficos inducidos por Con.A, o específicos anti- $H-2^d$; el tumor se torna altamente susceptible. La remoción de esta glicoproteína de las células LPC-1 tardías no altera este efecto de la lectina en mediar la destrucción del tumor por LTCs específicos anti- $H-2^d$. Ensayos de aglutinación de las células neoplásicas muestran correlación directa entre la capacidad de las diferentes lectinas para aglutinar el tumor con la de mediar su lisis por los LTCs mencionados.

Inesperadamente, cuando se utilizan LTCs específicos anti- $H-2^b$, la AGT no tiene efecto, y tanto el tumor LPC-1 como P815, gp-160 negativo ($H-2^d$) no son lisados. Se postula que esta lectina además de producir aglutinaciones celulares entre efectoras y blancos, probablemente altera la presencia y función enmascaradora de la gp-160 en la superficie de las células tumorales LPC-1 y que las diferencias observadas en su lisis utilizando LTCs anti- $H-2^d$ y anti- $H-2^b$, se deben, más que a los patrones de aglutinación entre efectoras y blancos, al tipo de interacción que se establece entre ellas. Si el papel de gp-160 es sólo de enmascaramiento o también interfiere con el mecanismo lítico de los LTCs permanece todavía por demostrarse.

Parte II.

Si LPC-1 es inyectado intraperitonealmente en ratones DBA/2, singénicos con el tumor, a pesar de que éste crece inicialmente en grandes cantidades, es rechazado violentamente 12 a 14 días después de haber sido inoculado. Macrófagos activados presentes en grandes cantidades en la cavidad peritoneal de estos ratones al tiempo en que el tumor es destruido, y células ANs estimuladas químicamente, no muestran actividad antitumoral en contra del tumor. En cambio, LTCs obtenidos de estos animales inmunes, reaccionan fuertemente en contra de diferencias en antígenos menores de histocompatibi

lidad expresados por el tumor. Este fenómeno podría tener un papel activo - en el mecanismo de rechazo.

Un estudio más detallado caracterizando los parámetros involucrados en la - destrucción del tumor LPC-1 en este modelo experimental de rechazo singénico nos permitirá entender con más claridad la dinámica de la interacción de estas células neoplásicas portadoras de gp-160, con los mecanismos inmunes antitumorales del huésped.

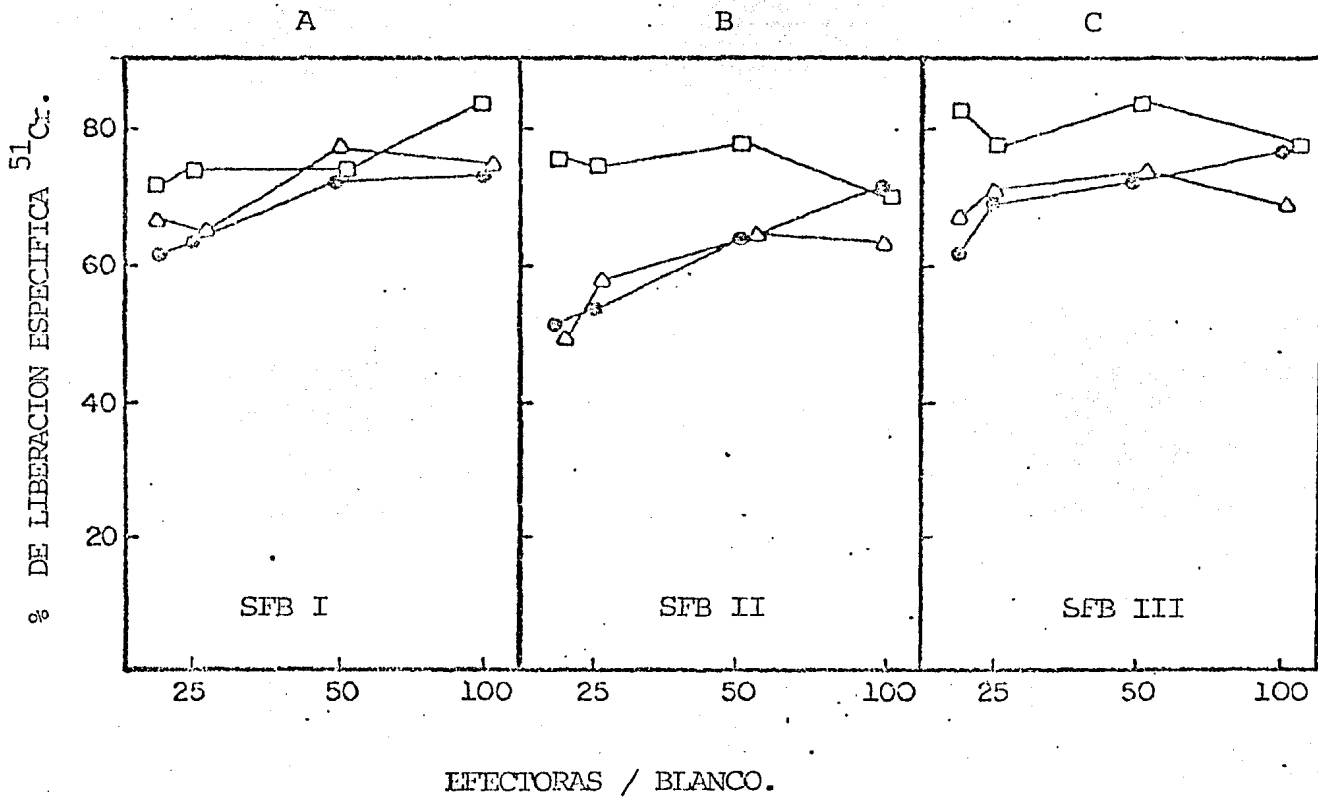


Figura 1. Efecto de diferentes fuentes de SFB (I, II, III) en la producción y actividad de LTCs específicos H-2^d (C57BL/6 \times BALB/c CML). Las células blanco marcadas con ^{51}Cr son : (\bullet), LPK-1; (\square), X63; (Δ), - P815.

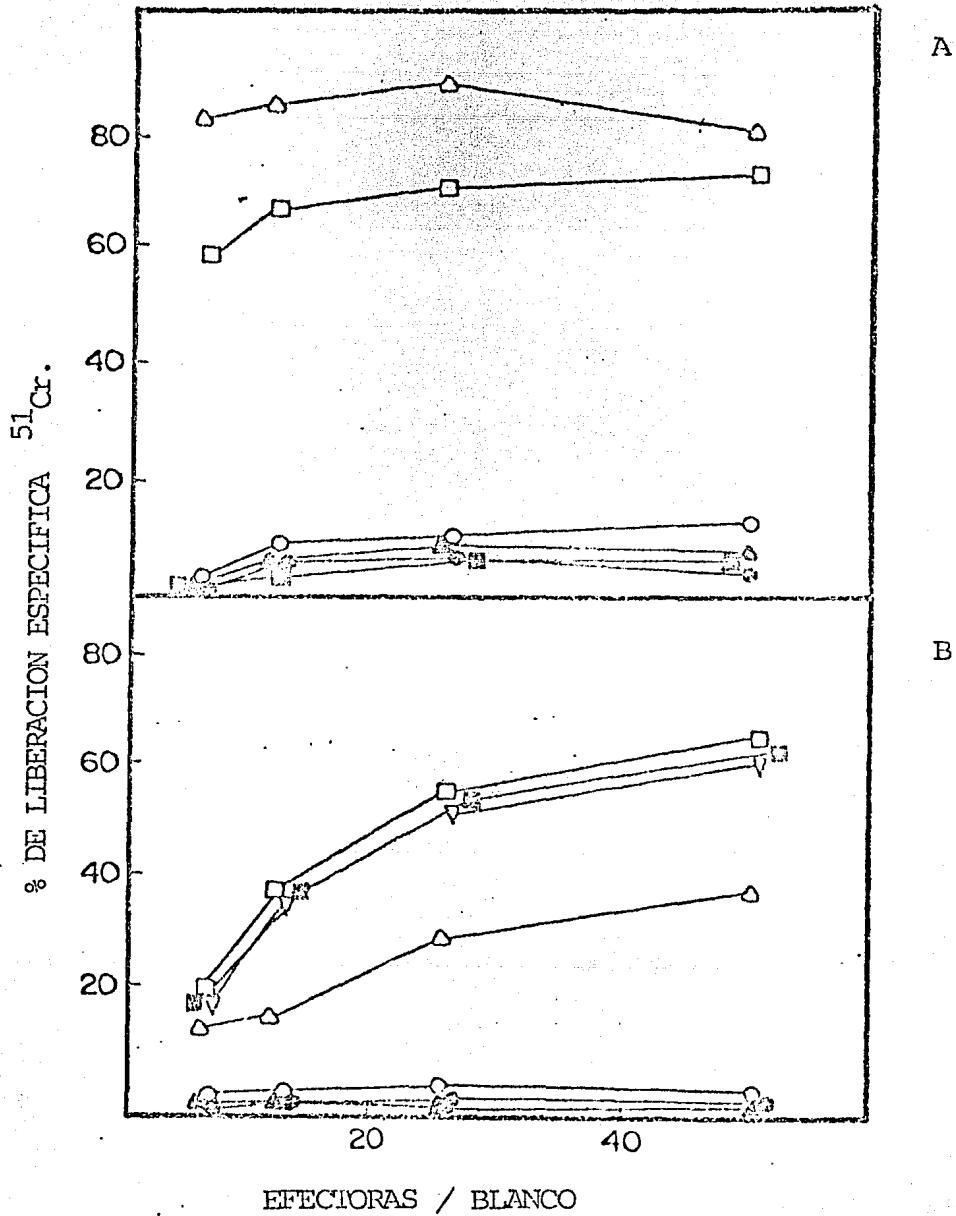


Figura 2. Efecto de diferentes lectinas en la lisis de los tumores LPC-1, P815 y EL-4 por LTCs inespecíficos inducidos por Con.A (figura 2A), y LTCs específicos anti-H-2^b (BALB/c α EL-4) (figura 2B).

Tratamientos: (Δ), P815 + FHA 10 mg/ml; (\triangle), P815 + AGT 10 mg/ml; (\circ), LPC-1 + FHA 10 mg/ml; (\square), EL-4 + FHA 10 mg/ml; (\blacksquare), EL-4 + AGT 10 mg/ml; (∇), EL-4 sin lectina., (\odot), LPC-1 + AGT 10 mg/ml.

Los símbolos utilizados son los mismos en ambas figuras.

TIPO DE LECTINAS	LTCs. Rel. E/B	CONCENTRACION DE LECITINAS EN ug/ml.						% LIBERACION ESPECIFICA 51 Cr
		50	40	30	20	10	5	
AGT- SIGMA (1)	50	2.67	1.21	0.2	2.2	0.8	0.86	
	5	2.04	1.63	-4.1	0.7	0.6	-0.5	
	0	0	0	0	0	0	0	
AGT-PHAR MACIA (2)	50	15.67	20.20	27.6	34.9	37.8	11.5	
	5	4.86	8.33	20.7	25.8	28.5	15.0	
	0	0	0	0	0	0	0	
AGT (1) + FHA 10 $\frac{ug}{ml}$	50	37.92	37.07	32.0	35.7	34.5	28.9	
	5	38.68	39.01	38.6	38.5	38.6	31.7	
	0	0	0	0	0	0	0	
AGT (2) + FHA 10 $\frac{ug}{ml}$	50	17.43	27.2	34.1	41.2	44.7	32.7	
	5	2.39	9.2	22.2	25.3	44.2	38.2	
	0	0	0	0	0	0	0	
FHA 10 $\frac{ug}{ml}$ únicamen te.	50					27.3		
	5					29.3		
	0					0		

Tabla I . Determinación de la concentración óptima de la AGT proveniente de dos diferentes fuentes (Sigma y Pharmacia), y su combinación con la FHA, para mediar lisis del tumor P815. Las células efectoras son LTCs inespecíficos inducidos por Con.A.

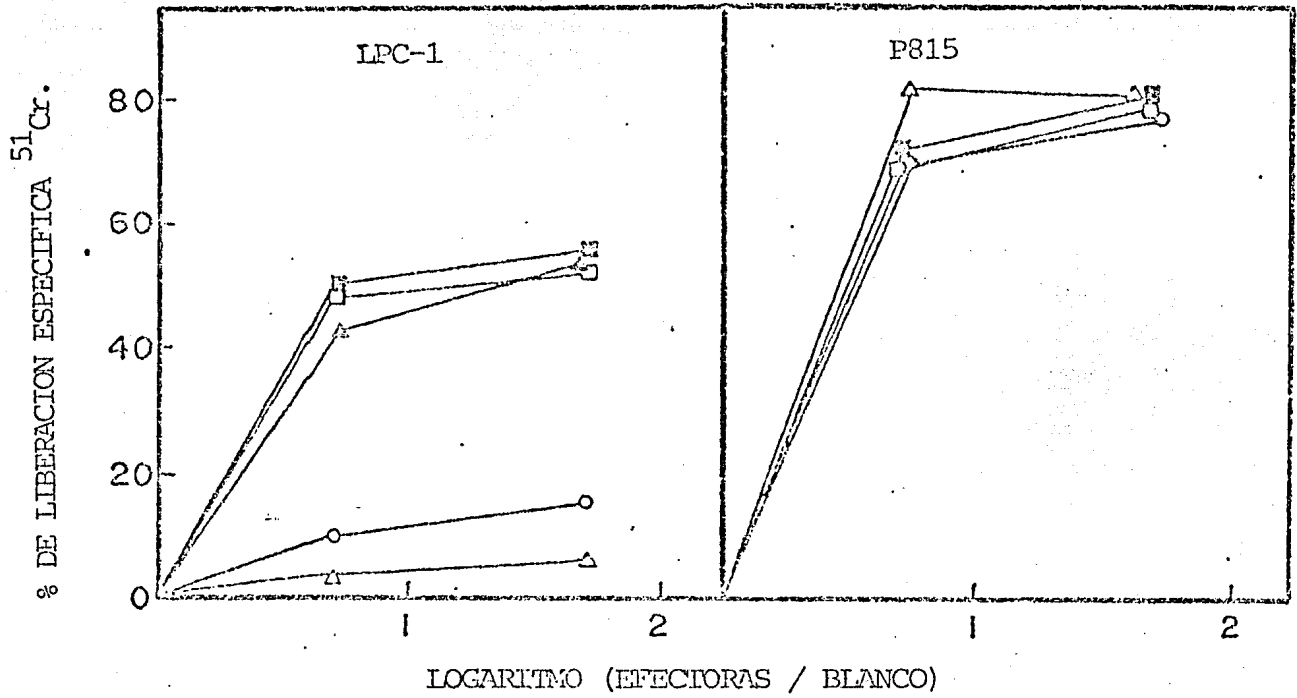


Figura 3. Efecto de diferentes lectinas en la lisis del tumor resistente LPC-1 y P815 (Control positivo), mediada por LITs inespecíficos inducidos por Con.A. Tratamientos: (□), AGT 10 mg/ml; (△), FHA 10 mg/ml; (○), Con.A 10 mg/ml; - (◻) AGT + FHA 10 mg/ml c/u; (◻), AGT + Con.A 10 mg/ml c/u. Los símbolos son los mismos en ambas figuras.

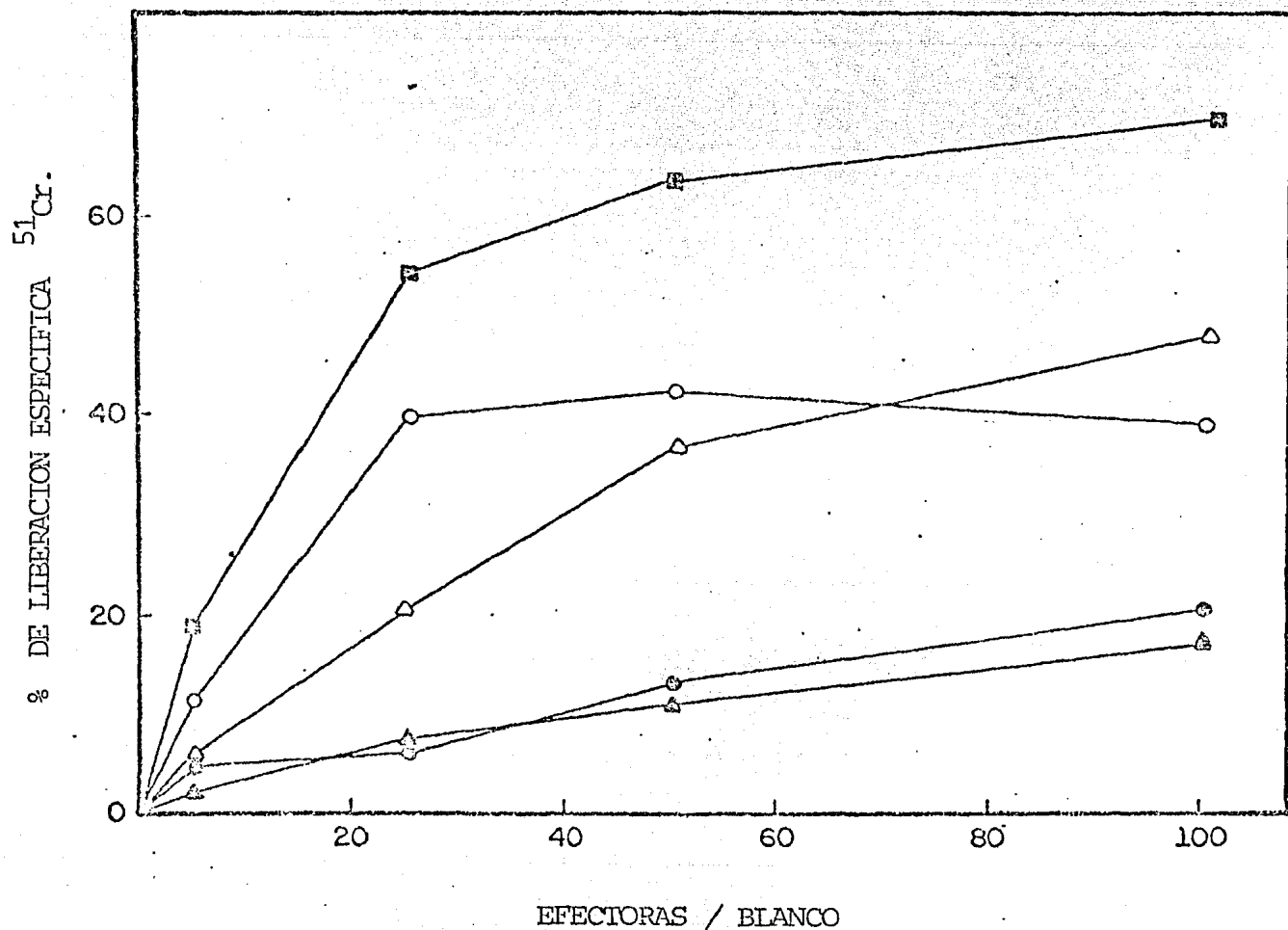


Figura 4 . Susceptibilidad del tumor LPC-1 tardío ha ser lisado por LTCs específicos anti-H-2^d (BALB/b \times LPC-1), en presencia de las lectinas AGT y Con.A Los diferentes símbolos representan: (■), P815; (○), LPC-1 tardío pretratado con tripsina; (△), LPC- 1 + AGT a 10 mg/ml en el ensayo de citotoxicidad; (⊙), LPC-1 tardío + Con.A a 5 mg/ml; (◡) LPC-1 tardío sin lectinas.

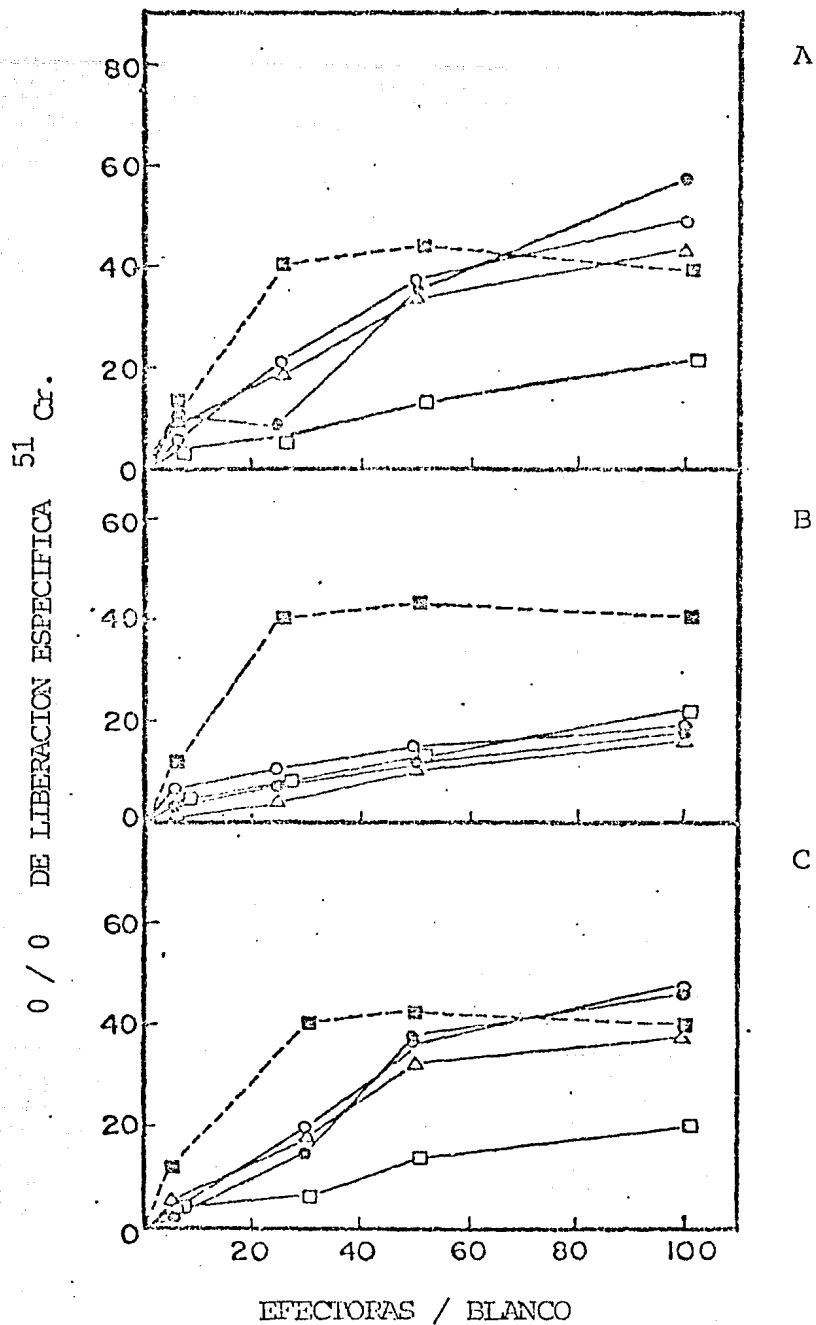


Figura 5 . Susceptibilidad del tumor LPC-1 tardío a la lisis mediada por-LTCs específicos anti-H-2^d (BALB/b α IPC-1) en presencia de diferentes con - centraciones de AGT (figura 5A): (\odot), 30 mg/ml; (\circ), 20 mg/ml; (Δ), 10 - mg/ml respectivamente. De Con.A (figura 5B): (\odot), 30 mg/ml; (\circ), 20 mg/ml (Δ), 10 mg/ml. Y las combinaciones AGT-Con.A (figura 5C): (\odot), 20 mg/ml - c/u; (\circ), 10 mg/ml c/u; y (Δ), 5 mg/ml. LPC-1 tardío sin lectinas (\square), y pretratado con tripsina sin lectinas (\square). Se reportan de la misma manera - en las tres figuras.

TUMOR	LECTINA	CONCENTRACION DE LECTINA ug/ml								
		200	100	50	25	12	6	3	1.5	0
P 815	Con.A	3	3	3	2	2	1	1	0	0
	FHA	3	3	3	3	2	1	1	0	0
	AGT	4	4	4	4	3	2	2	0	0
LPC-1	Con.A	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	FHA	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	AGT	3	4	4	4	4	1	0	0	0
315-OPEC	Con.A	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	FHA	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	AGT	3	4	4	4	3	2	1	0	0

Tabla II . Ensayo de aglutinación de los tumores P815, LPC-1 y 315 OPEC utilizando las lectinas Con.A, FHA y AGT. (Para detalles, ver material- y métodos). Criterio cuantitativo para evaluar el grado de aglutinación:

Todas las células tumorales aglutinadas	4
Casi todas	3
Aproximadamente la mitad de ellas	2
Menos de la mitad	1
Ninguna	0

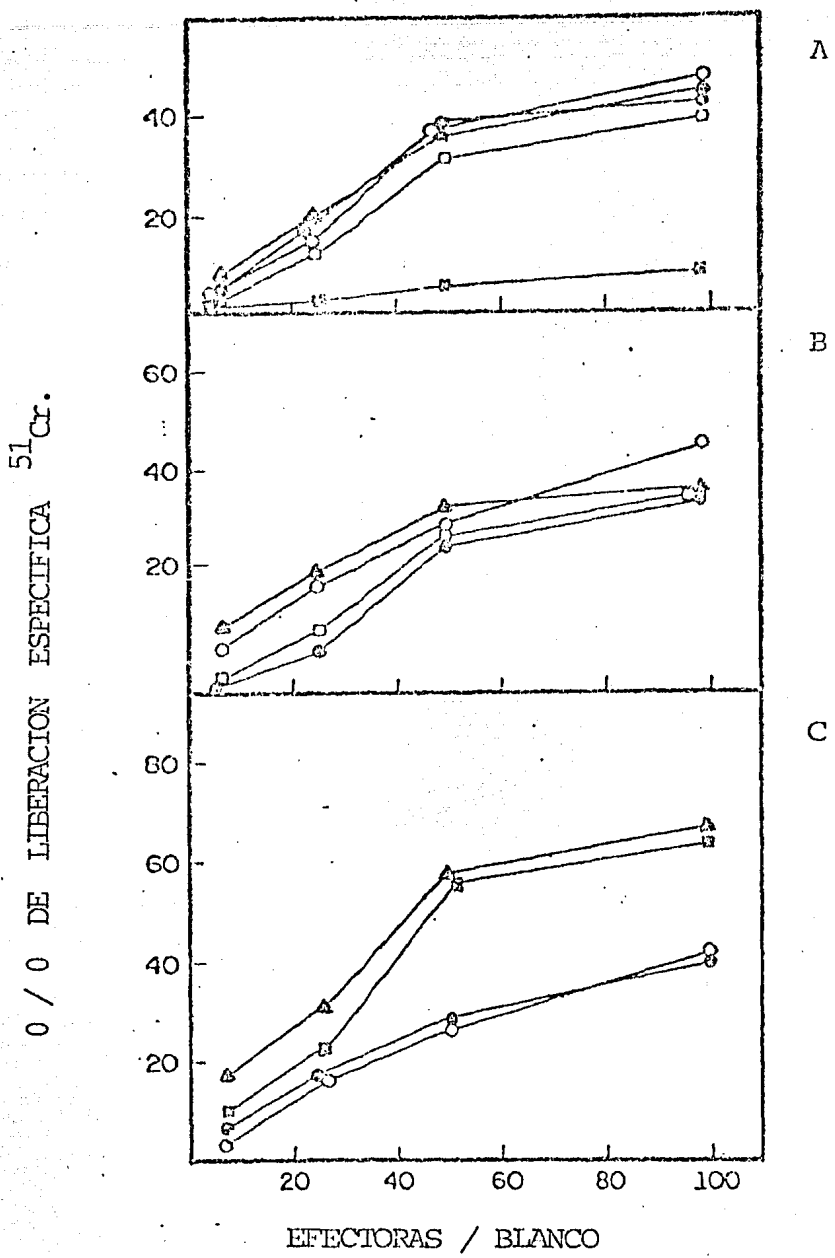
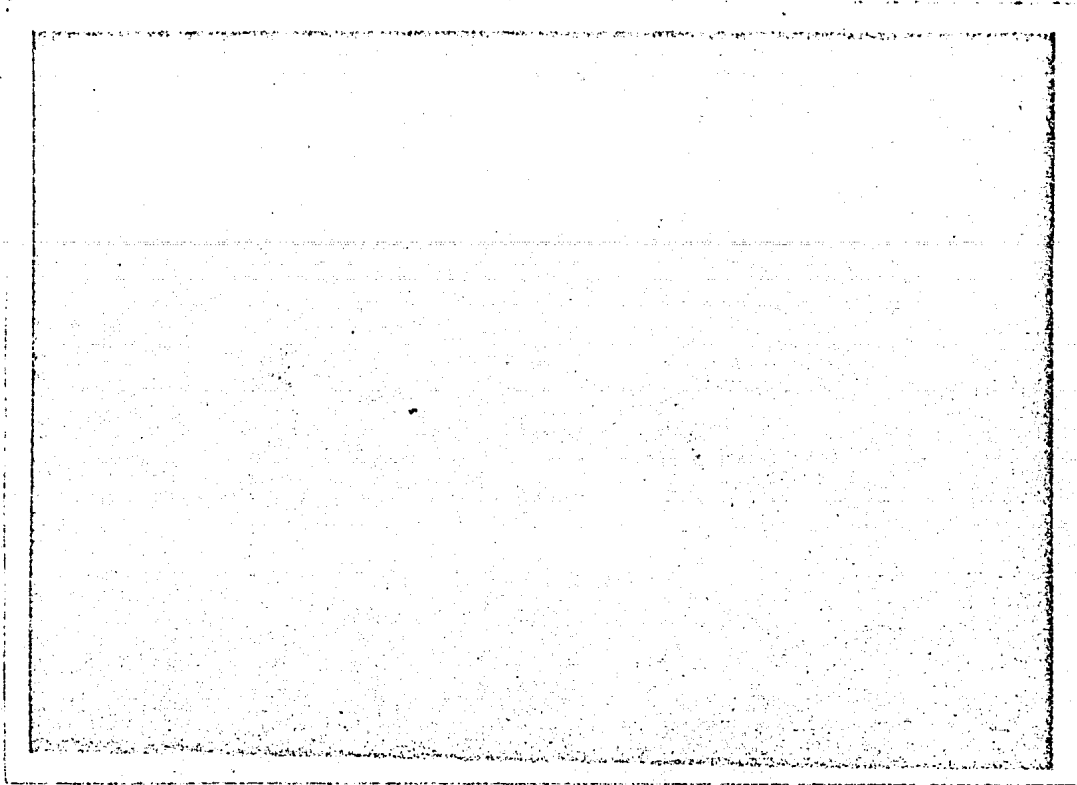
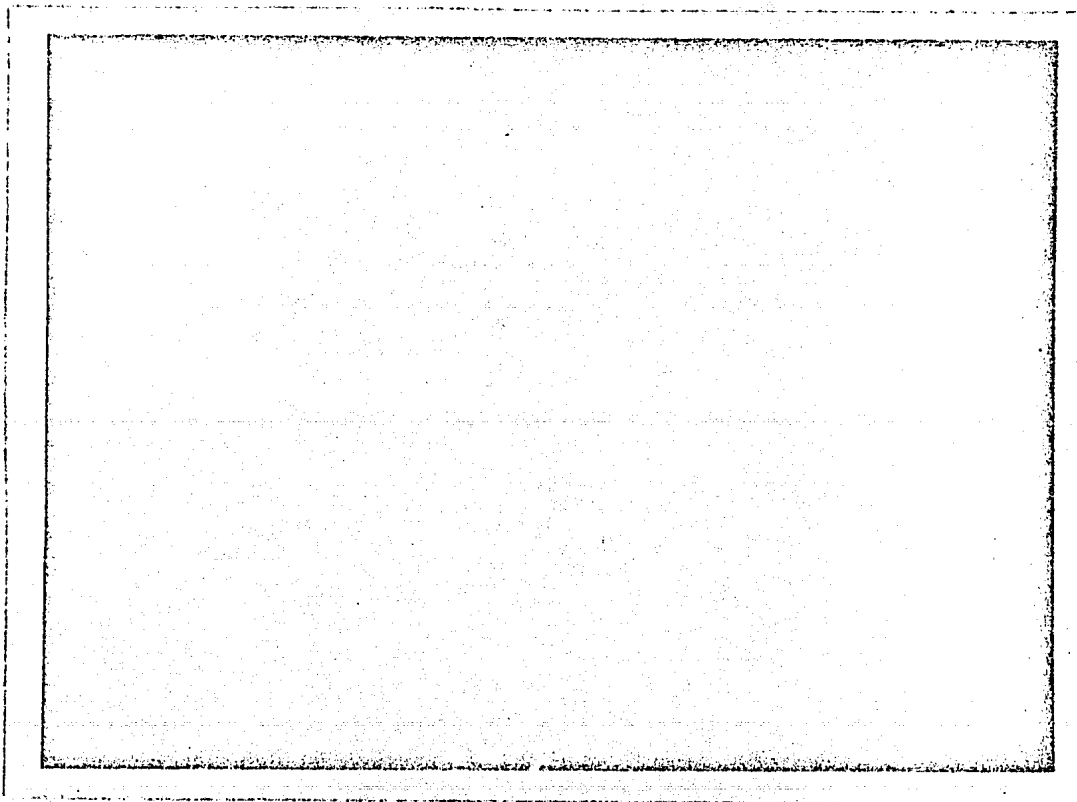


Figura 6. Efecto de la AGT a diferentes concentraciones en la lisis de LPC-1 tardío pretratado con tripsina (figura 6B), por LTCs específicos anti-H-2^d (C57BL/6 \times BALB/c CML). Comparación con la lisis de LPC-1 tardío sin pretratar (figura 6A) y P815 (figura 6C). Células efectoras y blancos son mezclados en presencia de AGT a las siguientes concentraciones: (●), 30 mg/ml; (○), 20 mg/ml; (▲), 10 mg/ml; (□), sin lectina. La curva de lisis LPC-1 tardío pretratado con tripsina y probadas en el ensayo de citotoxicidad en ausencia de lectinas (□) es el patrón de referencia para efectuar las comparaciones.



LPC-1



P 815

Células LPC-1 (Fig. 7 A) y P 815 (Fig. 7 B) incubadas con Con.A fluoresceinada y observadas en el microscopio de epifluorescencia.

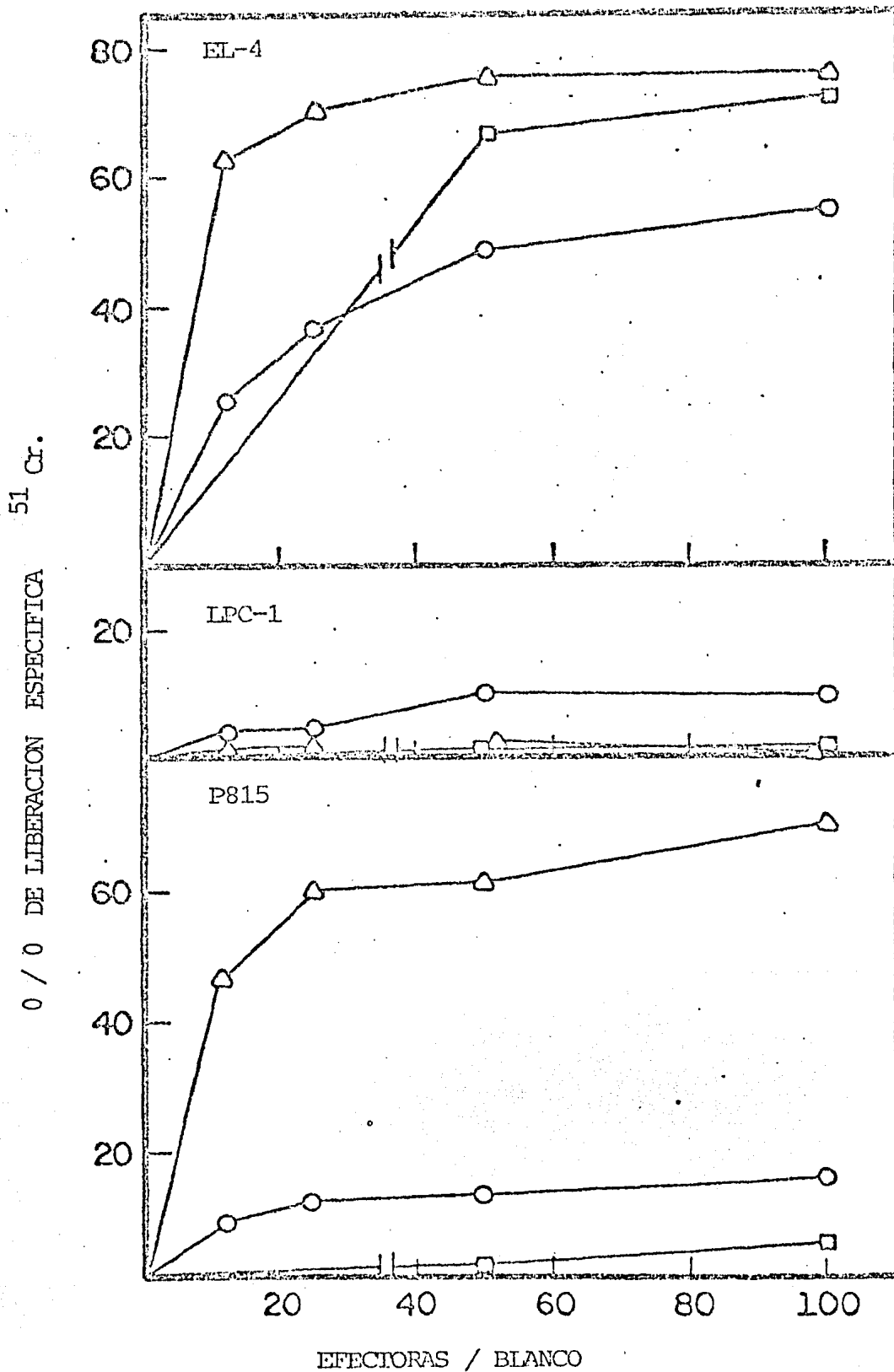


Figura 8 . Ensayo de citotoxicidad mediada por ITCs anti-H-2^b (BALB/c- α C57BL/6 CML). Efecto de la AGT y la FHA en la lisis de LPC-1 tardío , - EL-4, y P815 . (Ver gráficas). Tratamientos: (○), AGT 15 mg/ml; (△), FHA 10 mg/ml; (□), sin lectina. Los símbolos son los mismos para las tres fi guras.

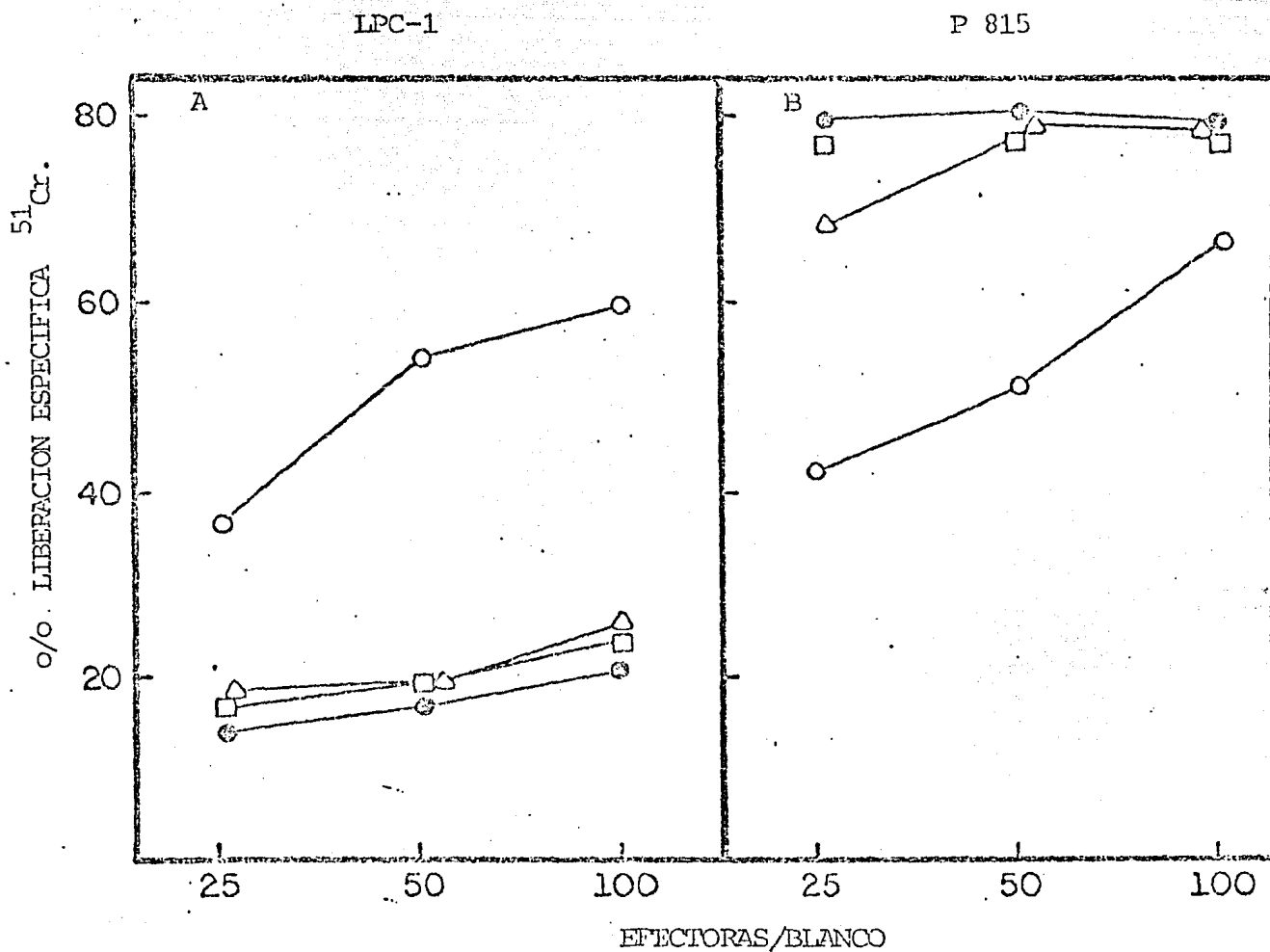


Figura 9 . Efecto de preincubar LPC-1 tardío y P 815 con AGT (20 mg/ml durante 1:5 hrs. a 37° C.) en un ensayo de lisis mediada por LTCs específicos anti-H-2^d (C57BL/6 α BALB/c CML). Tratamientos de la célula blanco : (●) ninguno; (○), AGT 10 mg/ml en el ensayo de citotoxicidad; (△), AGT 10 mg/ml + α metil-manósido al 1% en el ensayo de citotoxicidad; (□), preincubación con AGT, posteriormente se remueve la lectina y se añade α metil-manósido al 1% en el ensayo de citotoxicidad.

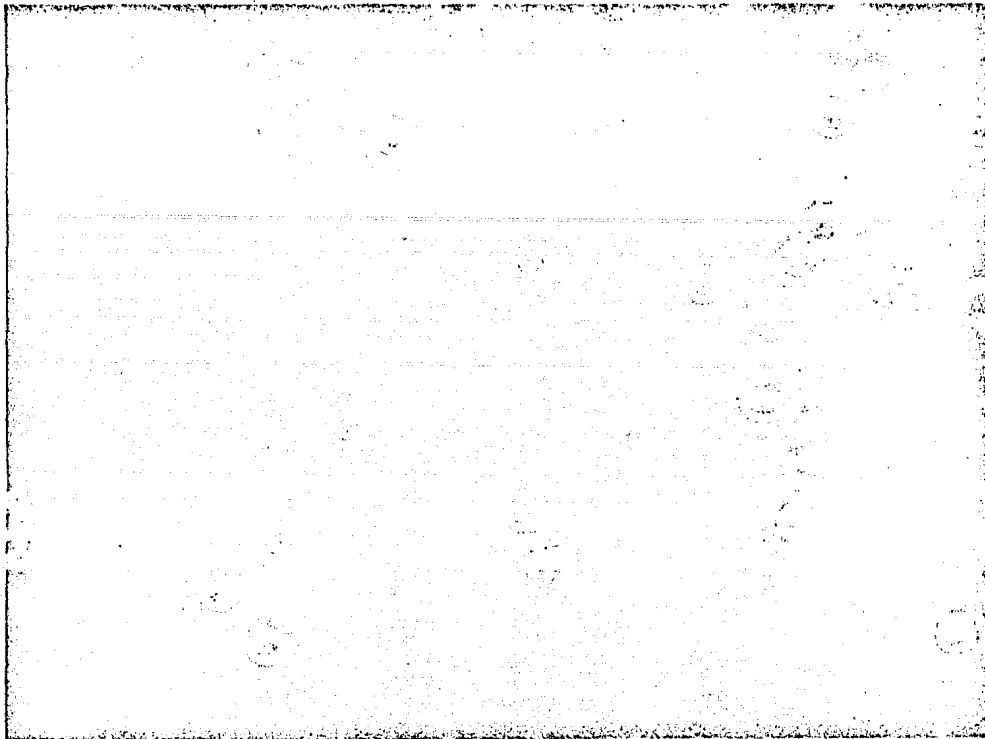


Figura 10. Células adherentes obtenidas de la cavidad peritoneal de ratones DBA/2 inoculadas con células tumorales LPC-1 al momento en que el tumor es rechazado.

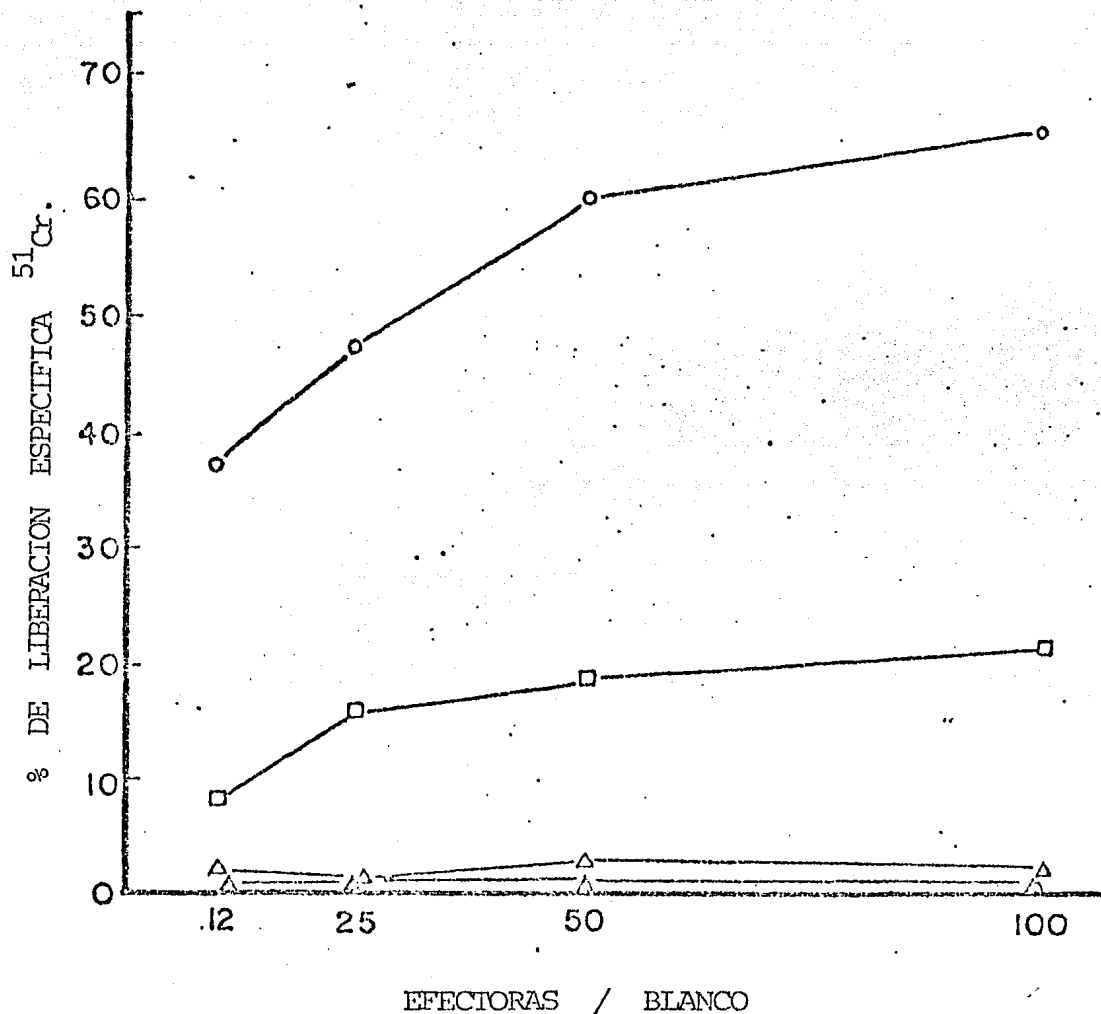


Figura 11 . Susceptibilidad de células LPC-1 tardías (Δ), tempranas (\triangle), y YAC-1 (\circ) (Control positivo)^o, a la lisis mediada por células ANs provenientes de bazo de ratones CBA/n inyectados intraperitonealmente 24 horas antes con ácido Poli I:C. Los símbolos (\square) representan la lisis de YAC-1 por las ANs presentes en la cavidad peritoneal de estos ratones.

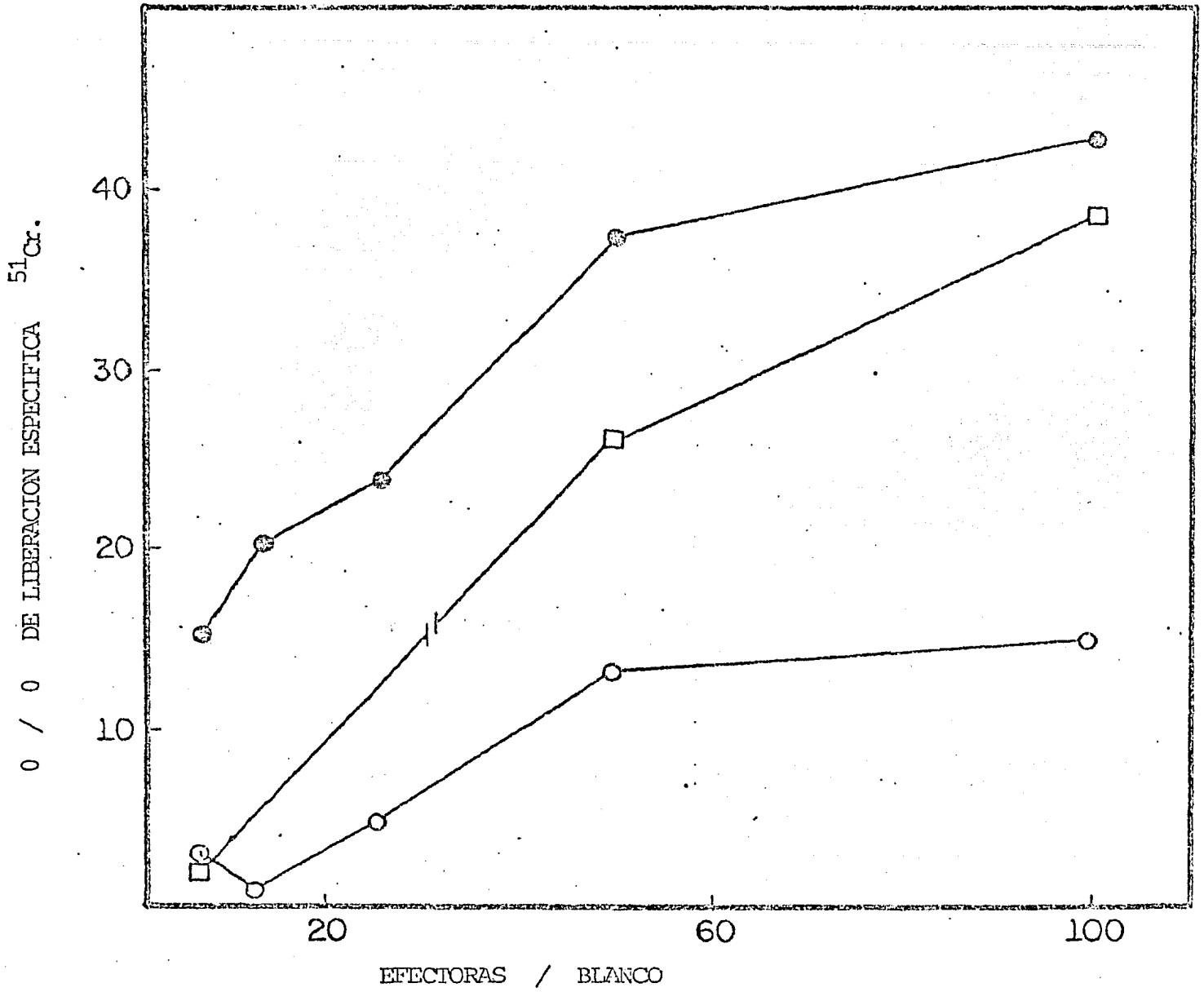


Figura 12 . Especificidad de los LTCs obtenidos 12 días después de inocular intraperitonealmente 1×10^7 células LPC-1 en ratones DBA/2. Reactividad en contra de antígenos menores de histocompatibilidad . Células blanco: (●), LPC-1 tardías pretratadas con tripsina; (○), LPC-1 tardías; (□), blastos de ratones BALB/c estimulados por Con.A.

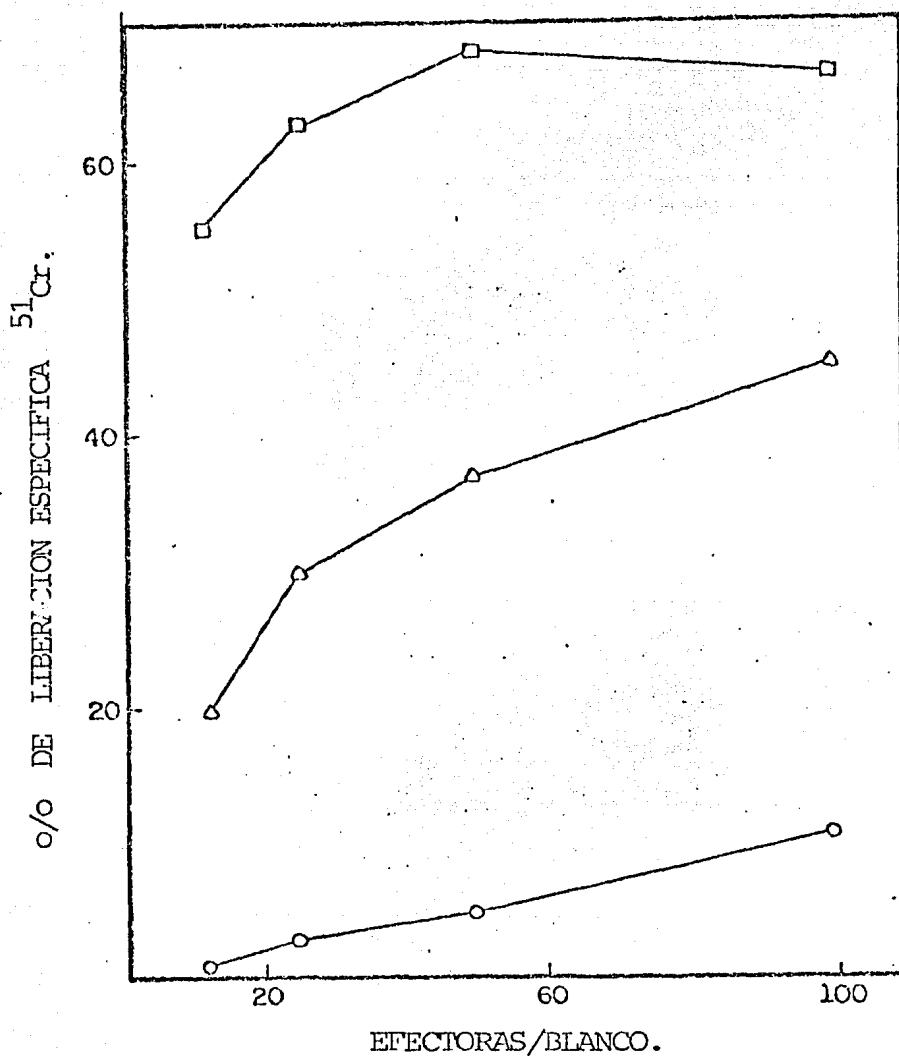


Figura 13 . Especificidad de los LITs obtenidos 12 días después de inocular intraperitonealmente 1×10^7 células LPC-1 en ratones DBA/2. Reactividad en contra de antígenos menores de histocompatibilidad. En este caso las células blanco son : (○), LPC-1 tardías; (Δ), LPC-1 tardías pretratadas con tripsina; (□), X63 (mieloma inducido en ratones BALB/c gp-160 negativo).

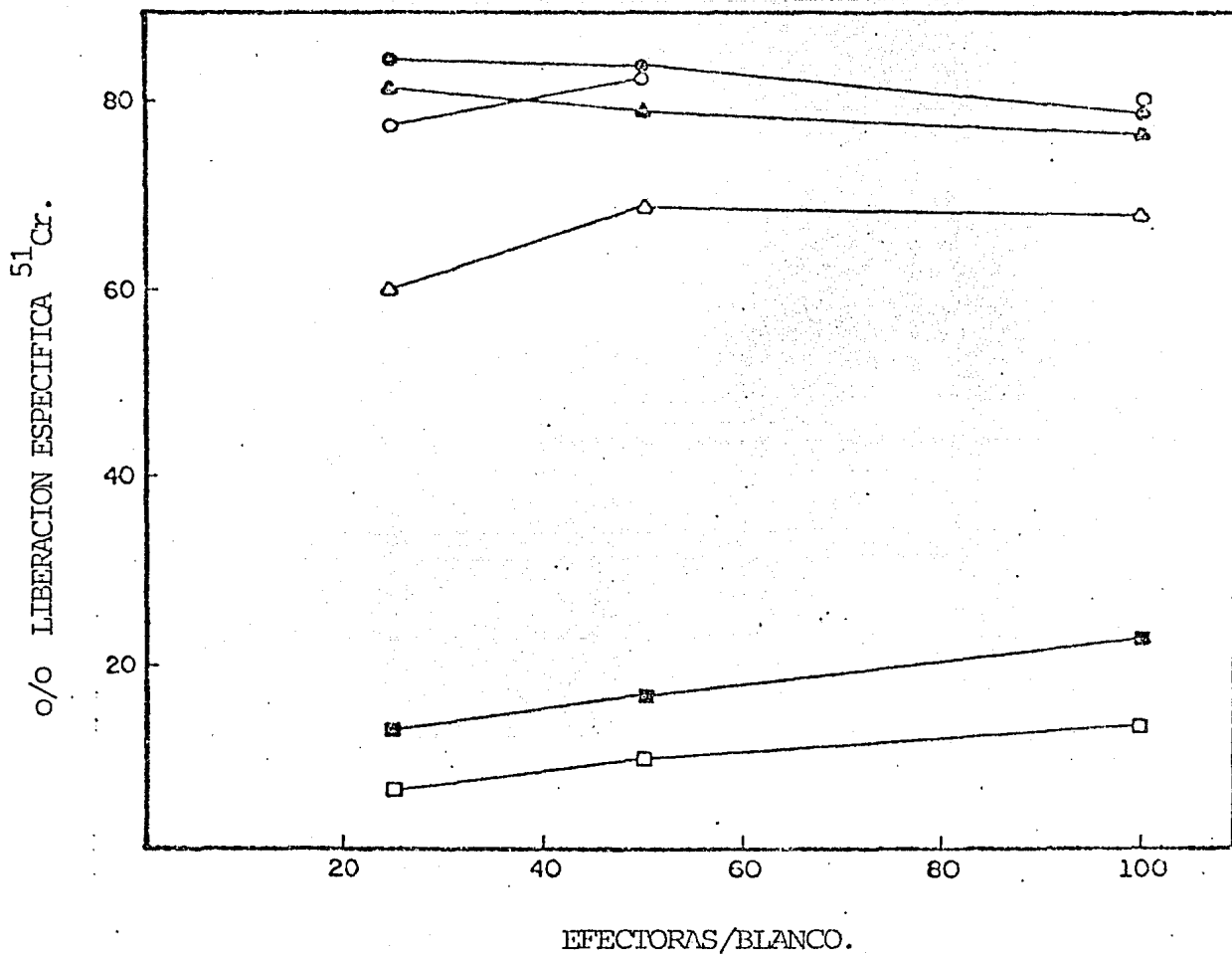


Figura 14 . Comparación de las actividades líticas de los LTCs. de larga - duración crecidos en presencia de Interleukina 2 durante 20 días (símbolo_ los llenos), con los LTCs producidos en un CML de 5 días (estimulación -- primaria), (símbolos vacíos), células blanco : (●), (○) P 815; (◼), (◻) LPC -1 tardío; (▲), (△) LPC -1 tardío pretratado con tripsina.

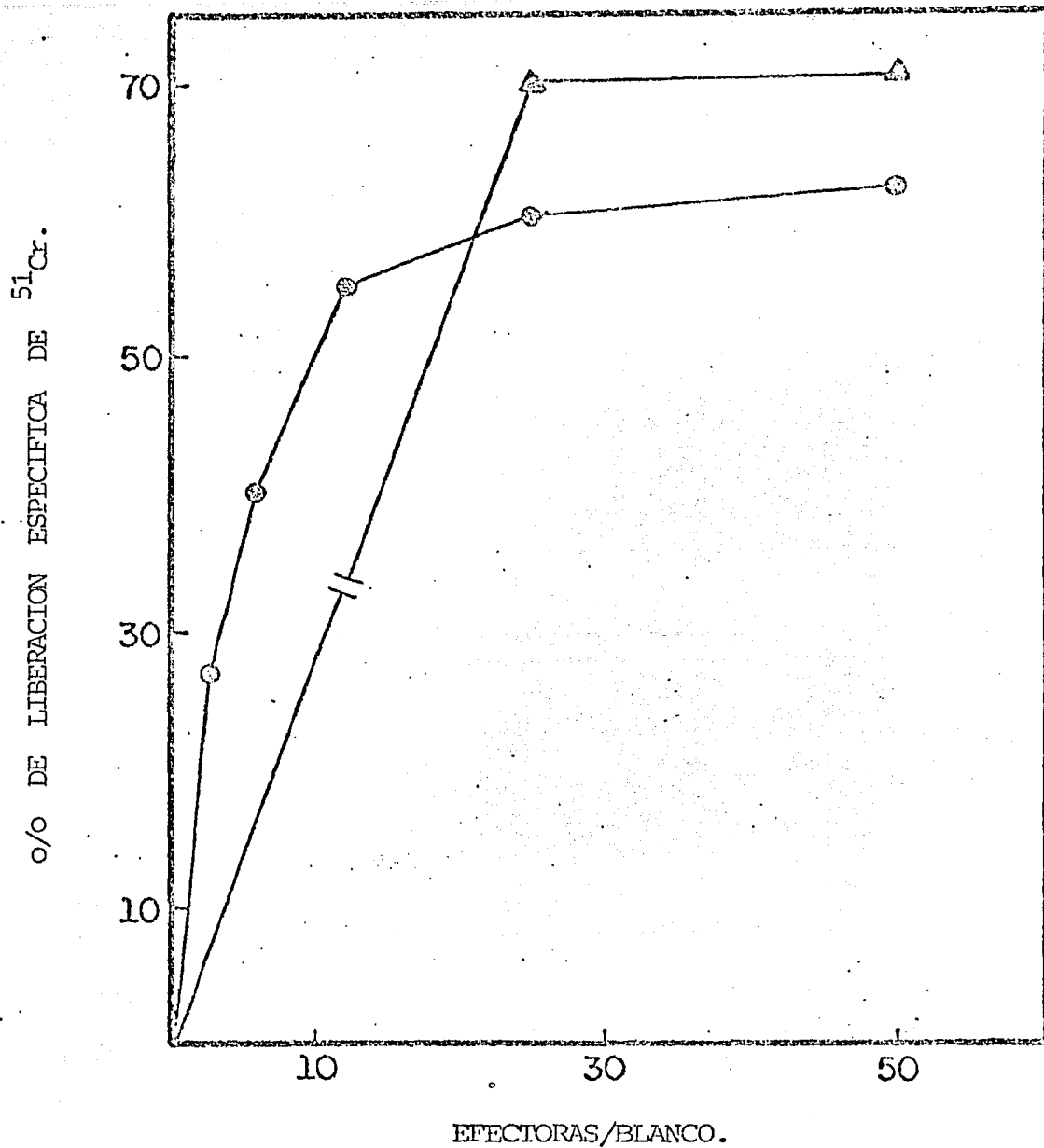


Figura 15 . Actividad lítica de los LTCs específicos anti-H-2^d (C57BL/6 - α BALB/c) de larga duración crecidos en presencia de Interleukina 2 probada a los 63 (●) y 104 (▲) días de cultivo. Las células blanco son P 815- y LPK-1 respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Adler, W.H., Takiguchi, T., and Smith, R.T. (1971) Phytohemagglutinin unresponsiveness in mouse methylcholanthrene sarcoma. *Cancer Res.* 31: 864.
2. Alexander, P. (1974) Escape from immune destruction the host through shedding of surface antigens: Is this a characteristic shared by malignant and embryonic. *Cancer Res.* 34: 2077.
3. Alexander, P. (1976) Surveillance against neoplastic cells- is it mediated by macrophages? *Br. J. Cancer* 33: 344-345.
4. Asherson, G.L., Ferluga, J., and Janossy, G. (1973) Non-specific cytotoxicity by T cells activated with plant mitogens in vitro and the requirement for plant agents during the killing reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 15: 573.
5. Baker, P., Gillis, S. and Smith, K.A. (1979) Monoclonal cytolytic T-cell lines. *J. Exp. Med.* 149: 273.
6. Baldwin, R.W. (1973) Immunological aspects of chemical carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* 18: 1.
7. Baldwin, R.W. and Robins, R.A. (1975) Humoral factor abrogating cell-mediated immunity in the tumor bearing host. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 72: 21.
8. Baldwin, R.W., Path, F.C. and Price, M.R. (1976) Tumor antigens and tumor-host relationships. *Ann. Rev. Med.* 27: 151.

9. Bekesi, J.G., Arneault, G.St., Walter, L., and Holland, J. F. (1972) Immunogenicity of leukemia L1210 cells after neuraminidase treatment. J. Natl. Cancer Inst. Vol. 49: 107.
10. Berke, G., Ax, W., Ginsburg, H., and Feldman, (1969) Graft rejection in tissue culture. II. Quantification of the lytic action on mouse fibroblasts by rat lymphocytes sensitized on mouse embryo monolayers. Immunology 16: 643.
11. Berke, G., McVey, E., Hu, V., and Clark, R. (1981) T lymphocyte mediated cytolysis. II. Role of target cell histocompatibility antigens in recognition and lysis. J. Immunol. 127: 782.
12. Bevan, M.J. (1975a) The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T cells directed against minor histocompatibility antigen. J. Exp. Med. 142: 1349.
13. Bevan, M.J., and Cohn, M. (1975b) Cytotoxic effects of antigen and mitogen-induced T cells on various targets. J. Immunol. 114: 559.
14. Biberfeld, P., and Johansson, A. (1975) Contact areas of cytotoxic lymphocytes and target cells: An electron microscopic study. Exp. Cell.Res. 94: 79.
15. Bonavida, B., and Bradley, T.P. (1976) Studies on the induction and expression of T cell-mediated immunity. V. Lethal induced nonspecific cell mediated cytotoxicity by alloimmune lymphocytes. Transplantation 21: 94.

16. Brunner, K.T., Mavel, J., Cerottini, J.C., and Chapuis, B. (1968) Quantitative assay for the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr labelled allogeneic target cells in vitro: Inhibition by isoantibody by drugs. Immunology 14: 181.
17. Burnet, F.M. (1970) The concept of immunological surveillance. Prog. Exp. Tumor Res. 13: 1.
18. Cebra, J.H., and Goldstein, G. (1965) Chromatographic purification of the tetramethylrhodamine immune globulin conjugates and their use in the cellular localization of rabbit-globulin polypeptide chains. J. Immunol. 95: 230.
19. Celis, B. (1983) Resistencia a la lisis immune mediada por anticuerpos y complemento en algunos mielomas murinos. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica, U.N.A.M.
20. Celis, E., Hale, A.H., and Eisen, H.N. (1979a) Cyclical changes in susceptibility of a mieloma tumor (LPC-1) to immune destruction. I. Change in reactivity with cytotoxic T lymphocytes and anti-H-2^d sera. J. Immunol. 122: 954
21. Celis, E., Chang, T.W., and Eisen, H.N. (1978b) Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction. III. Periodic production of a cell surface glycoprotein and changes in reactivity with cytotoxic T cells and anti-H-2^d sera. J. Immunol. 122: 2245.
22. Celis, E., and Eisen, H.N. (1980) Interactions between a novel cell surface glycoprotein and the H-2K and H-2D antigens on myeloma tumor cells. Eur. J. Immunol. 10:455.

23. Celis, B., and Celis, E. (1983) Complement-mediated killing of myeloma tumour cells: differences in susceptibility to lysis by antibodies and complement are independent of antigen expression and antibody binding. Immunol.: En prensa
24. Cerottini, J., and Brunner, K.T. (1974a) Cell mediated cytotoxicity, allograft rejection, and tumor immunity. Adv. Immunol. 18: 67.
25. Cerottini, J.C., Engers, H.D., MacDonald, H.K., and Brunner, K.T. (1974b) Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. II. Effect of repeated exposure to alloantigens on the cytotoxic activity of long-term mixed leucocyte cultures. J. Exp. Med. 140: 719.
26. Codrington, J.F., Klein, G., Cooper, A.G., Lee, N., Brown, M.C., and Jeanloz, R.W. (1978) Further studies on the relationship between large glycoprotein molecules and allotransplantability in the TA3 tumor of the mouse: studies on segregating TA3-Ha hybrids. J. Natl. Cancer Inst. Vol. 60, No. 4: 811.
27. Codrington, J.F. (1981) The Masking of Cancer Cell Surface Antigens. in: The Handbook of Cancer Immunology. Harold Waters (Editor) Vol. 8: Tumors Antigens, Structure and Function. Garland STPM Press : 71.
28. Coggin, J.H., and Anderson, N.G. (1974) Cancer, differentiation and embryonic antigens: Some central problems. Adv. Cancer Res. 19: 105.

29. Cooper, A.G., Codington, J.F., Miller, D.K., and Brown, M.C. (1979) Loss of strain specificity of the TA3-St subline: Evidence for the role of epiglycanin in mouse allogeneic tumor growth. *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol. 63; 163.
30. Currie, G.A. (1973) The role of circulating antigen as an inhibitor of tumor immunity in man. *Br. J. Cancer* 28: 153.
31. Doljanski, F., and Kapeder, M. (1976) Cell surface shedding - the phenomenon and its possible significance. *J. Theor. Biol.* 62: 253.
32. Engers, H., Collavo, D., North, M., von Boehmer, H., Haas, W., Hengartner, H., and Nabholz, M. (1980) Characterization of cloned murine cytolytic T cell lines. *J. Immunology.* 125: 1481.
33. Esmon, N.L., and Little, J.R. (1976) Different mechanisms for the modulation of TL antigens on murine lymphoid cells. *J. Immunol.* 117: 919.
34. Fathman, C.G., and Hengartner, H. (1978) Clones of alloreactive T cells. *Nature* 272: 617.
35. Forman, J., and Moller, G. (1973) Generation of cytotoxic lymphocytes in mixed lymphocyte reactions. I. Specificity of the effector cells. *J. Exp. Med.* 138: 672.
36. Forman, J. (1975) On the role of the H-2 histocompatibility complex in determining the specificity of cytotoxic effector cells sensitized against syngeneic trinitrophenyl-modified targets. *J. Exp. Med.* 142: 403.

37. Forman, J.C., and Kettman, J. (1976) Specificity of cytotoxic effector cells for hapten-modified targets. Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 35: 474.
38. Friberg, S. (1972) Comparison of an immunoresistant and an immunosusceptible ascites subline from murine tumor TA3. I. Transplantability, morphology and some physicochemical characteristics. J. Natl. Cancer Inst. Vol. 48. : 1463
39. Frye, L.D., and Friou, G.J. (1975) Inhibition of mammalian cytotoxic cells by phosphatidyl-choline and its analogue. Nature 258: 333.
40. Germain, R.N., Dorf, M.E., and Benacerraf, B. (1975) Inhibition of lymphocyte-mediated tumor-specific lysis by alloantisera directed against H-2 serological specificities of the tumor. J. Exp. Med. 142: 1023.
41. Gillis, S., Baker, P., Ruscetti, F.W., and Smith, K.A. (1978a) Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. J. Exp. Med. 148: 1093.
42. Gillis, S., Ferm, M., Ou, W., and Smith, K.A. (1978b) T cells growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. J. Immunol. 128: 2027.
43. Gillis, S., and Smith, K.A. (1977) Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. Nature 268: 154.
44. Glasebrook, A.L., and Fitch, F.W. (1980) Albreactive cloned T cell lines. I. Interactions between cloned amplifier and cytolytic T cell lines. J. Exp. Med. 151: 876.

45. Goldstein, P., and Smith, E.T. (1977) Mechanism of T-cell mediated cytolysis: the lethal hit stage. Cont. top. Immunobiol. 7, 273.
46. Golub, S.H., O'Connell, T.X., and Morton, D.L. (1974) Correlation of in vivo and in vitro assays of immunocompetence in cancer patients. Cancer Res. 34: 1834.
47. Gordon, S., Unkeless, J.C., and Cohn, Z.A. (1974) Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis. Evidence for a two-stage process. The Journal of Experimental Medicine Vol. 140: 995.
48. Gordon, S. (1978) Regulation of enzyme secretion by mononuclear phagocytes: studies with macrophage plasminogen activator and lysozyme. Fed. Proc. Vol. 37. No. 13: 2754.
49. Granger, G.A., and Kolb, W.P. (1968) Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Mechanisms of immune and non-immune small lymphocyte mediated target cell destruction. J. Immunol. 101:111.
50. Green, W.R., Ballas, Z.K., and Henney, C.S. (1978) Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis. XI. The role of lectin in lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol. 121: 1566.
51. Greenberg, P.D., Cheever, M.A., and Fefer, A. (1981) Erradication of disseminated murine leukemia by chemo-immunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Ly⁺¹⁺²⁻ lymphocytes. J. Exp. Med. 154: 952.

52. Gross, L. (1943) Intradermal immunization of C3H mice against sarcoma that originated in animals of the same line. *Cancer Res.* 3: 326.
53. Guillete, R.W., and Boone, C.W. (1973) Changes in mitogen response of lymphoid cells with progressive tumor growth. *Cancer Res.* 35: 3774.
54. Hale, A.H., Celis, E., Russel, J.H., and Eisen, H.N. (1979) Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction. II. Periodic fluctuations during growth in normal and nude mice and in culture. *J. Immunol.* 122: 959.
55. Hanna, N., and Burton, R.C. (1981) Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J. Immunol.* 127: 1754.
56. Hellström, F., and Hellström, K.E. (1969) Studies on cellular immunity and its serum mediated inhibition in Moloney-virus-induced mouse sarcomas. *Int. J. Cancer* 4: 587.
57. Hellström, F., Evans, C.A., and Hellström, K.E. (1969) Cellular immunity and its serum-mediated inhibition in shape-virus-induced rabbit papillomas. *Int. J. Cancer* 4: 601.
58. Hellström, F., Hellström, K.E. and Sjögren, H.O. (1970) Serum mediated inhibition of cellular immunity to methylcholantrene-induced murine sarcomas. *Cell. Immunol.* 1: 18

59. Hellström, K.E., and Hellström, I. (1974) Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv. Immunol.* 18: 209.
60. Henney, C.S., and Lichtenstein, L.M. (1971) The role of cyclic AMP in the cytolytic activity of lymphocytes. *J. Immunol.* 107: 610.
61. Henney, C.S. (1974a) Estimation of the size of a T cell induced lytic lesion. *Nature* 249: 456.
62. Henney, C.S., Gaffney, J., and Bloom, B.R. (1974b) On the relation of soluble mediators to cell mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 140: 837.
63. Henney, C.S. (1977) T cell mediated cytotoxicity: An overview of some current issues. *Cont. Top. Immunobiol.* 7: 245.
64. Henney, C.S. (1980) The mechanism of T cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 2: 36.
65. Herberman, R.B. (1974) Delayed hypersensitivity skin reactions to antigens on human tumors. *Cancer* 34: 1469.
66. Herberman, R.B., Nunn, M.E. Holden, T.H., and Larvin, D.H. (1975a) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* 16: 230.
67. Herberman, R.B., Nun, M.E. and Lavrin, D.H. (1975b) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* 16: 216.

68. Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R. (1981) Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science* 214: 24.
69. Hibbs, J.B. Jr., Chapman, H.A. Jr., and Weinberg, J.B. (1978) The macrophage as an antineoplastic surveillance cell. Biological perspectives. *J. Reticuloendothel. Soc.* 24: 549.
70. Hilgers, T.A., Sonnenberg, F., and Nusse, R (1980) Antigenic modulation of mammary tumor virus envelope antigen on GR thymic lymphoma cells in relation to expression of H-2, TL cell surface antigens and Thy 1. *Br. J. Cancer* 42: 542.
71. Katz, D.H. and Benacerraf. (editores) (1974) The Role of the Products of the Histocompatibility gene complex in immune responses. Academic Press, New York pp 780.
72. Kennel, S.J., and Feldman, J.D. (1976) Distribution of viral glycoprotein gp69/71 on cell surfaces of producer and non-producer cells. *Cancer Res.* 36: 200.
73. Kim, U., Baumler, A., Carruthers, C., and Bielat, K. (1975) Immunological scape mechanism in spontaneously metastasizing mamary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 1012.
74. Kirkwood, J.M., and Gershon, R.K. (1974) A role for suppressor T cells in immunological enhancement of tumor growth. *Prog. Exp. Tumor Res.* 19: 157.
75. Klein, J. (1973-74) Immunological surveillance against neoplasia. *Harvey Lect.* 69: 71.

76. Klein, J. (1975) Biology of the mouse histocompatibility H-2 complex. Springer-Verlag, New York pp. 600.
77. Koszinowski, U., and Ertl, H. (1975) Lysis mediated by T cells and restricted by H-2 antigen of target cells infected with vaccina virus. Nature 255: 552.
78. Kuppers, R., and Henney, C.S. (1977) IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T cells. J. Immunol. 118: 71.
79. Kurth, R. (1975) Tumor virus proteins of the cell surface. Nature 256: 613.
80. Levy, J.P. (1974) Antigens Associated with C Type RNA Virus Induced Tumors. In Progress in Immunology II Brent, L., and Holborow, J. (ed) Amsterdam: North-Holland press.
81. Lloyd, J.O. (1977) Cancer Immunology. Scientific Amer. 236: 62.
82. Lutz, C.T., Glasebrook, A.L., and Fitch, F.W. (1981) III. Accessory cell requirements for the growth of cloned cytolytic T lymphocytes. J. Immunology 126: 1404.
83. MacDonald, H.R. (1975) Early detection of potentially lethal events in T cell-mediated cytotoxicity. Eur. J. Immunol. 5: 251.
84. Mackaness, G.B. (1970) The mechanisms of macrophage activation en: Infectious Agents and Host Reactions Stuart Mudd. (Editor). W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa. 62.

85. Martz, E., Burakoff, B., and Benacerraf, B. (1974) Interpretation of the sequential release of small and large molecules from tumor cells by low temperature during cytotoxicity mediated by immune T cell or complement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 177.
86. Martz, E. (1975) Early steps in specific tumor cell lysis by sensitized mouse T lymphocytes. I. Resolution and characterization. J. Immunol. 115: 261.
87. Martz, E. (1976) Early steps in specific tumor cell lysis by sensitized mouse T lymphocytes. II. Electrolyte permeability increase in the target cell membrane concomitant with programming for lysis. J. Immunol. 117: 1023.
88. Martz, E. (1977) Mechanism of specific tumor-cell lysis by alloimmune T lymphocytes: Resolution and characterization of discrete steps in the cellular interaction. Contemp. top. Immunobiol. 7: 301.
89. Mes, T. (1979) The MLR test in the mouse. En: Immunological Methods. Lefkovits, I., and Pernis, B. (editores) Academic Press, New York pp 232.
90. Mitchison, N.A., and Kinlen, L.T. (1980) Present Concepts in Immunology. IV: 641 Fougereau, M., and Dausset, J. (ed) New York, Academic Press.
91. Moller, E. (1964) Contact induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigens. Science 147: 873.
92. Moller, G., and Moller, E. (1979) Immunological surveillance revisited. Transplant. Proc. 11: 1041.

93. Moore, M. (1978) Antigens of experimentally-induced neoplasms: A conspectus. En: Immunological Aspects of Cancer. Castro, J.F. (ed) Lancaster, England: MTP Press.
94. Nabel, G., Fresno, M., Chessman, A. and Cantor, H. (1981) Use of cloned populations of mouse lymphocytes to analyze cellular differentiation. *Cel*, Vol. 23: 19.
95. Nathenson, S.G., and Cullen, S.E. (1974) Biochemical properties and immunochemical genetic relations of mouse H-2 alloantigens. *Biochem. Biophys. Acta.* 344: 1.
96. Natori, T., Law, L.W., and Appella, E. (1977) Biological and biochemical properties of Nonidet P40-solubilized and partially purified tumor specific antigens of the transplantation type from plasma membrane of a methylcholantrene induced tumor. *Cancer Res.* 37: 3406.
97. Nicolson, G.L. (1974) The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 39: 89.
98. Nicolson, G.L. (1976) Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* 458: 1.
99. Noonan, K.D., and Burger, M.M. (1973) The relationship of concanavalin A binding to lectin-initiated cell agglutination. *J. Cell. Biol.* 59: 134.
100. Obata, Y., Stockert, E., DeLeo, A.B., O'Donnell, P.V., Snyder, A.W. Jr., and Old, L.J. (1981) A cell surface antigen of the mouse related to xenotropic MuLV defined by naturally occurring antibody and monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 154: 659.

101. Old, L.J., and Boyse, E.A. (1965) Antigens of tumors and leukemias induced by viruses. Fed. Proc. 24: 1009.
102. Okazaki, E., Aoki, T., and Koslowski, S.J. (1976) AKR leukemia-specific surface antigens acquired by malignant transformation: their common and individual specificities. Int. J. Cancer 17: 640.
103. Palacios, R. (1982) Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptor for activation. J. Immunol. 128: 337.
104. Palladino, M.A., Old, L.J., and Oettgen, H.F. (1982) In vivo inhibition of mouse leukemia by cytotoxic T-cell clones and exogenous IL-2. Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 41:406.
105. Parker, W.L. and Martz, E. (1980) Lectin-induced non-lethal adhesions between cytolytic T lymphocytes and antigenically unrecognizable tumor cells and nonspecific "triggering" of cytolysis. J. Immunol. 124: 25.
106. Plant, M., Bubbers, J., and Hennoy, C.S. (1976) Studies on the mechanism of lymphocyte mediated cytolysis. VII Two stages in the T cell mediated lytic cycle with distinct cation requirements. J. Immunol. 116: 150.
107. Plescia, O.J., Smith, A.H., and Grinwich, K. (1975) Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 1848.
108. Pollack, R.E., and Horg, P.V.C. (1974) The cell surface and malignant transformation. Ann. Rev. Med. 25: 431.

109. Prehn, R.T. (1974) Immunological Surveillance: Pro-
ord con. En: Clinical Immunobiology. 2: 191. Good, R.
A. (ed) New York, Academic Press.
110. Rapin, A.M.C., and Burger, M. (1974) Tumor cell surfaces:
general alterations detected by agglutinins. Adv. Cancer
Res. 20: 1
111. Rees, R.C., Price, M.R. and Baldwin, R.W. (1979) Onco-
developmental antigen expression in chemical carcino-
genesis. En: Methods in Cancer Research, Busch, H.
(ed). New York: Academic Press.
112. Reit, A.E. (1978) Organ Specificity of Defenses Against
Tumors. En: Handbook of Cancer Immunology. 1: 173.
Walters, H. (ed). Garland STPM press.
113. Robinson, M.K., and Wheelock, E.F. (1982) Synergistic
cytolytic activity by combined populations of peritoneal
T lymphocytes and macrophages during the L5178Y
tumor-dormant state in DBA/2 mice. Cellular Immunology
73: 230-246.
114. Roder, J.C., and Kiessling, R. (1979) Target-effector
interaction in the natural killer cell system. I.
Co-variance and genetic control of cytolytic and target-
cell-binding subpopulations in the mouse. Scand. J.
Immunol. 8: 135.
115. Rosenberg, S.A., Schwarz, S., and Spiess, P.J. (1978a)
In vitro growth of murine T cell. II. Growth of in vitro
sensitized cells cytotoxic for alloantigens. J. Immuno-
logy 121: 1951.

116. Rosenberg, S.A., Spiess, P.J., and Schwarz, S. (1978b) In vitro growth of murine T cell. I. Production of factors necessary for T cell growth. J. Immunology 121: 1946.
117. Rubens, R.P., and Henney, C.S. (1977) Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. VIII. The use of Con.A to delineate a distinctive killer T cell subpopulation. J. Immunology 118: 180.
118. Ruscetti, F.W., Morgan, D.A., and Gallo, R.C. (1977) Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. J. Immunology 119: 131.
119. Ryser, J.E., Rungger-Brandle, E., Chaponnier, C., Gabbiani, G., and Vassalli, P. (1982) The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells show high motility and polarization of actin, but not myosin. J. Immunol. 128: 1159.
120. Sanjord, B.H., Codrington, J.F., Jeanloz, R.W., and Palmer, P.D. (1973) Transplantability and antigenicity of two sublines of the TA3 tumor. J. Immunol. 110: 1233.
121. Schrader, T.W., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. (1975). Functional interactions of viral and histocompatibility antigens at tumor cell surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 5066.
122. Schrade, J.W., and Edelman, G.M. (1976) Participation of the H-2 antigens of tumor cells in their lysis by syngeneic T cells. J. Exp. Med. 143: 601.

123. Schwartz, R.S. (1975) Another look of immunological surveillance. Medical Intelligence 293: 181.
124. Schwartz, R.H. (1982) The cloning of T lymphocytes. Immunology Today, Vol. 3 No. 43.
125. Selin, D., Wallach, D.F.H., and Fischer, H. (1971) Intercellular communication in cell-mediated cytotoxicity. Fluorescein transfer between H-2^d target cells and H-2^b lymphocytes in vitro. Eur. J. Immunol. 1: 453.
126. Shreffler, D.C., and David, C.S. (1975) The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region. Genetic variation, function, and organization. Adv. Immunol. 20: 125.
127. Silver, J. and Hood, L. (1974) Detergent solubilized H-2 alloantigen is associated with a small molecular weight polypeptide. Nature 249: 764.
128. Smith, R.T., and Landy, M. (1970) Immuno Surveillance. New York, Academic Press.
129. Stackpole, C.W. (1980) Modulation of tyms leukemia antigens on mouse leukemia cells induced in IgG but not IgM antibody. J. Natl. Cancer Inst. 64: 917.
130. Sura, S.N., Chernya Khorskaya, Y.U., Kadashidze, A.G., Fuks, B.B., and Svet-Moldausky, G.I. (1967) Cytochemical sutdy of interaction between lymphocytes and target cells in tissue culture. Exp. Cell Res. 48: 656.

131. Thomas, L. (1959). Cellular and humoral aspects of hypersensitive state. Lawrence, H.S. (ed). New York, Harper (Hoeber).
132. Thorn, R.M., and Henney, C.S. (1976) Studies on the mechanism of lymphocyte-T cell-mediated lysis. *J. Immunol.* 116: 146.
133. Ting, C.C., Laurin, D.H., Shiv, G., and Herberman, R.B. (1972) Expression of fetal antigens in tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 1664.
134. Todd, R.F., Stuiting, D., and Berke, G. (1973) Mechanism of Blocking by hyperimmune serum of lymphocyte-mediated cytolysis of allogenic tumor cells. *Cancer res.* 33: 3202.
135. Tokuyama, H., and Migita, S. (1978) Cell surface major glycoprotein of Balb/c mouse plasmacytoma 58-8 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 203.
136. Toyashima, S., Iwata, M., and Osawa, T. (1976) Kinetics of lymphocyte stimulation by concanavalin A. *Nature* 264: 447.
137. Unkeless, J.C., Gordon, S., and Reich, E. (1974) Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *J. Exptl. Med.* Vol. 139: 834-850.
138. Von Blitterswijk, W.J., Emmelot, P., Hilgers, J., Kamlug, D., Nusse, R., and Feltkamp, C.A. (1975) Quantitation of virus-induced (MLr) and normal (thy.1.2) cell surface antigen in isolated plasma membranes and the extracellular ascitis fluid of mouse leukemia cells. *Cancer Res.* 35: 2743.

139. Warner, J.F., and Dennert, G. (1982) Effects of a cloned cell line with NK activity on bone marrow transplants, tumour development and metastasis in vivo. Nature. 300: 31-34.
140. Weinberg, T.B., and Hibbs, J.B. Jr. (1978) The role of macrophages in cancer resistance and therapy. En: The Handbook of Cancer Immunology. Walters, H. (ed) New York, Gorlond STOM Press. 5: 51.
141. Wei-Zen, W., and Lindquist, R.R. (1981) Alloimmune cytolytic T lymphocyte activity: triggering and expression of killing mechanisms in cytolytic T lymphocytes. J. Immunol. 126: 513-516.
142. Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1975). H-2 compatibility requirement for T cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic chorio-meningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. J. Exp. Med. 141: 1427.
143. Zinkernagel, R.M. (1976) H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated cytolysis. The H-2K structure involved is coded by a single cistron defined by H-2K^b mutant mice. J. Exp. Med. 143: 437.