



11261
9
20

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INMUNIDAD CELULAR CONTRA LINEAS
TUMORALES HUMANAS Y MURINAS**

T E S I S

Que para obtener el grado Académico de
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(INMUNOLOGIA)**

p r e s e n t a

EMMA VERASTEGUI AVILES

Director de Tesis: **Dr. Guillermo Alfaro Martínez**

México, D. F.

1994

**TESIS CON
FOLIA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis hijos Alonso y Aline

Gracias por estar a mi lado en todo momento,

por su alegría contagiosa y por su ayuda

para alcanzar esta meta.

A ustedes dedico mi trabajo.

A mis padres Francisco y Emma,

ejemplo de superación y trabajo.

Gracias por su apoyo y amor.

A mis hermanos Francisco, Federico y Aldo,

compañeros de mi infancia y amigos

para siempre.

*Al Dr. Guillermo-Alfaro-Martinez
por darme la oportunidad de realizar bajo su
tutela este trabajo. Gracias por sus
críticas tan formativas como frecuentes.
Agradezco también tu valiosa amistad.*

*A las autoridades del Instituto Nacional de Cancerología;
los Dres. Jaime G de la Garza, Arturo Beltrán y
Alejandro Mohar, por estimular y apoyar
siempre mi trabajo*

*A los Dres. Lionel Manson, Jorge Alcocer V. y Evan Hersh
quienes despertaron en mí el interés por la inmunología.*

*A los miembros de mi comité tutorial,
los Dres Beatriz Gómez y Rafael Saavedra, por
su valioso tiempo, comentarios y amistad.*

*A mis amigos y compañeros de trabajo, M. en C. Gabriel Nava,
M. en C. Venancio Ortega, M. en C. Marisol Lopez,
Dr. Antonio Velazquez, M. en C. Leda Torres,
QFB. Roxana del Rio, LIB. Román Vidal,
Biol Ma Luisa Benitez y Emmy Estudillo.*

*Respetuosamente dedico esta tesis a los
pacientes del Instituto Nacional de Cancerología,
por todo lo que me han enseñado y para
quienes esta investigación está dirigida.*

INDICE

	Páginas
ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
I. Complejo Principal de Histocompatibilidad	
1. Generalidades	4
2. Estructura	5
2.1. Clase I	6
2.2. Clase II	7
3. Ensamble del péptido al CPH-I	8
3.1. Procesamiento	8
3.2. Ensamble	8
3.3. Expresión	9
4. Ensamble del péptido al CPH-II	9
4.1. Procesamiento	9
4.2. Ensamble	10
4.3. Expresión	10
II. Respuesta Inmune Celular	
1. Linfocitos T	11
1.1. Generalidades	11
1.2. Linfocitos T, CD4+	11
1.3. Linfocitos T, CD8+	11
1.4. Receptor de Células T	12
1.5. Linfocitos T γ/δ	13
1.6. Moléculas Accesorias	13
1.7. Activación de Linfocitos T	14
2. Células Asesinas Naturales	
2.1. Generalidades	15
2.2. Marcadores	16
2.3. Células AN y cáncer	16
2.4. Activación	17
3. Células Asesinas Activadas por Citocinas	17
4. Linfocitos Infiltrantes de Tumores	18
5. Citotoxicidad	18
6. Citocinas	21
6.1. Generalidades	21
6.2. Factor de Necrosis Tumoral	23
6.3. Interleucina 2	25
6.4. Interferones	27
III. CANCER	
1. Antígenos Tumorales	29
1.1. Antígenos reconocidos por Ac.	30

1.2. Antígenos reconocidos por LTC	32
2. Melanoma Maligno	33
2.1. Generalidades	33
2.2. Características Clínicas	34
2.3. Histología	34
2.4. Inmunología del Melanoma	36
2.5. Tratamiento	37
IV. ANTECEDENTES DIRECTAMENTE RELACIONADOS CON EL PROYECTO	
1. Modelo experimental: LR.4	39
1.1. Antecedentes	39
1.2. Respuesta en animales	39
2. Uso de BCG en Pacientes con Melanoma	41
2.1. Generalidades	41
2.2. Bacilo de Calmette- Guerin	41
2.3. Experiencia en el I. N Can	42
V. OBJETIVOS	45
VI. MATERIALES Y METODOS	
1.1. Pacientes con Melanoma	46
1.2. Tratamiento con BCG	46
2. Animales	47
3. Obtención de Antisueros	47
4. Inmunofluorescencia indirecta	48
5. ELISA para FNT	48
6. Cultivos Celulares	49
7. Líneas Celulares	49
8. Muestras de Tejidos Humanos	50
9. Separación de Células Mononucleares	51
10. Tratamiento con Mitomicina C	51
11. Cultivo Mixto de Linfocitos	51
12. Marcaje de Células con Cr ⁵¹	51
13. Evaluación de Células Citotóxicas	
13.1. Linfocitos T Citotóxicos	52
13.2. Citotoxicidad por Células AN	53
13.3. Inducción de Células CAAC	53
13.4. CCDA	54
RESULTADOS Y DISCUSION	
I. Actividad de LTC en ratones C57BL/6J63	
1. LTC anti LR.4	56
2. LTC anti L5178Y	57
3. LTC anti Antígenos menores y mayores	58
4. Células CAAC y AN	60
II. Respuesta Humoral	
1. Análisis de la Especificidad de antisueros	61
III. Citotoxicidad Celular Dependiente de AC	65

IV. Evaluación de la Respuesta Inmune en ratonas viejas	
1. Fenotipo de linfocitos Esplénicos	67
2. Evaluación de la Función Citotóxica	69
2.1. Citotoxicidad por LTC	69
2.2. Citotóxica por Células AN	70
2.3. Citotóxica por CAAC	71
V.Efecto del BCG en la respuesta inmune en enfermos con melanoma	
1. Niveles Séricos de FNT	73
2. Determinación de células AN	78
CONCLUSIONES	
Modelo Experimental	85
Enfermos con Melanoma Maligno	86
Apéndice A	89
Apéndice B	91
BIBLIOGRAFIA	93

ABREVIATURAS

ABC	"ATP Binding Cassette"
Ac	Anticuerpos
AN	Células AN
AT	Actividad tumoral
B-2m	Beta 2 microglobulina (gen)
β -2m	Beta 2 microglobulina
B6	C57BL/6J (en figuras por motivos de espacio)
BB	Balb.b (en figuras por motivos de espacio)
BC	Balb/c (en figuras por motivos de espacio)
BCG	Bacilo Calmette Guérin
BP-1	Biopsia piel-1
BSA	Albumina sérica bovina
CAAC	Células Asesinas Activadas por Citocinas
CCA	Comité Conjunto Americano
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de Ac
cdk4	Cinasa dependiente de ciclina 4
CD	"Cluster of Differentiation"
Ci	Cadena Invariante
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CR	Crecimiento y Rechazo
DMB	9,10-Dimetil-1,2-benzotraceno
DP	Derrame pleural
EC	Estadio clínico
ELISA	Inmunoensayo enzimático
F	Fibroblastos
FCDP	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FCE	Factor de crecimiento epidérmico
FCF	Factor de crecimiento sintetizado por fibroblastos
FCN	Factor de crecimiento neural
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
F/R	Ficoll/Radialar
H-2	CPH de ratón
HAT	Hipoxantina Aminopterina Triptofano
HLA	" Human Leukocyte Antigen"
ICAM-1	Moléculas de adhesión intracelular-1
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL-()	Interleucina- ()
IL-2r	IL-2 recombinante
ILGF	Factor de crecimiento parecido a la insulina
ip	Intra peritoneal
LE	Liberación espontánea
LIT	Linfocitos Infiltrantes de Tumores
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LT	Liberación Total
LTC	Linfocitos T Citotóxicos
MAGE	Gen asociado a Melanoma
MC	Metil colantreno

Mel	Melanoma
MetGI	Metástasis ganglionar
MMC	Mitomicina C
MMVL	Virus de linfoma murino tipo Moloney
MST1	Gen supresor múltiple de tumores
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
NF- κ b	Factor nuclear- κ b
NKCF	Factor Citotóxico de Células AN
PCut	Primario cutaneo
PHA	Fitohemaglutinina
RCT	Receptor de Células T
RE	Retículo Endoplásmico
RT	Rechazo del tumor
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SOD.	Superóxido dismutasa
S/V	Sobrevida
T	Linfoide T
TACA	"Tumor associated CHO antigens"
TAP	Proteínas asociadas al transporte
TGF β	Factor transformante de crecimiento- β
Th	T de ayuda
TIP	Tumor intraperitoneal
TNM	"Tumor-Nodes-Metastasis"
VF	Virus Friend
WSXWS	Triptofán-serina-X-triptofán-serina

RESUMEN

Los mecanismos de vigilancia inmune proveen los medios necesarios para discriminar lo propio de lo extraño²⁵⁷. Las respuestas de linfocitos T contra células neoplásicas indican que los LTC pueden reconocer antígenos asociados a tumores a través de receptores de superficie y mecanismos restringidos por el CPH^{3,20}. Los antígenos asociados a tumores pudieran ser el producto del procesamiento de proteínas intracelulares codificada por genes expresados en células tumorales únicamente⁹². En otros casos, sin embargo, algunas de estas moléculas corresponderían a proteínas expresadas en etapas tempranas del desarrollo embrionario³⁴ o bien a proteínas portadoras de mutaciones^{34,53}. Como ya se ha mencionado, el reconocimiento de antígenos por LTC puede llevarse a cabo independientemente de la presentación por el CPH, como sucede en la lisis de células tumorales que expresan un cierto tipo de mucina⁵⁸.

Las células AN y los macrófagos tienen un mecanismo de reconocimiento independiente del CPH y son capaces de lisar a sus blancos mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo^{23,26,158,201,350}.

Parte de la complejidad de la respuesta inmune en tumores se analiza en este trabajo con dos enfoques diferentes:

1) mediante el análisis de la actividad de AN en enfermos con melanoma tratados o no con BCG. Los resultados de este análisis revelaron que la actividad lítica mediada por células AN en contra del blanco convencional fue baja, en general, en el grupo control. Los enfermos tratados con BCG mostraron un incremento, en ocasiones asociado con una elevación en los niveles de FNT α .

2) a través del estudio de la participación de productos del CPH en el reconocimiento de células neoplásicas en un modelo experimental de origen murino. Desde el punto de vista experimental, los distintos defectos genéticos de las células LR.4 permitieron demostrar con claridad que el rechazo por parte de ratones C57BL/6J está mediado, al menos en parte, por anticuerpos específicos. Otros tipos celulares, tales como las células AN, no tuvieron un efecto sobre la línea celular en estudio.

INTRODUCCION

A woman must have money and a room of her own if she is to write
Virginia Woolf... *A room of one's own*

Una de las principales funciones del sistema inmune consiste en discriminar entre moléculas codificadas por el genoma celular en condiciones normales o en condiciones patológicas¹. En el cáncer, los determinantes antigénicos pueden ser expresados en la superficie mediante proteínas de membrana anormales o bien asociados a productos del CPH^{2,3}. Las respuestas mediadas por anticuerpos estarían dirigidas principalmente contra el primer grupo de antígenos, y aquellas mediadas por linfocitos T, estarían restringidas por moléculas clase I y II del CPH^{4,5}.

Los linfocitos T citotóxicos representan el mecanismo más eficiente para el reconocimiento y destrucción de células malignas. Los antígenos asociados a tumores son reconocidos por receptores de membrana específicos, codificados por el genoma de células CD8+. Sin embargo, también se han sido descritos linfocitos citotóxicos CD4+, y con menos frecuencia linfocitos CD3+CD4-CD8^{-6,8}.

Los linfocitos T α/β CD8+ pueden reconocer, en ocasiones, antígenos en forma no restringida por el CPH³. Recientemente, ha sido documentada la participación de linfocitos T γ/δ en la destrucción de algunas neoplasias^{9,10}.

La unión del péptido a las moléculas clase I es consecuencia de una serie de eventos intracelulares que involucran el ensamble de la cadena α a la β_2m en el RE, el transporte de este complejo a través del aparato de Golgi su la expresión en la membrana celular¹¹⁻¹⁴. Alteraciones en cualquiera de los pasos de esta secuencia puede traducirse en la falta de presentación de antígenos a LTC (Linfocitos T citotóxicos) CD8+ como se ha demostrado en diferentes sistemas experimentales¹⁵. Un grupo diferente de mutantes incluye a la línea linfoblastoide humana 721.174 y a la mutante murina RMA-S. Estas células presentan defectos genéticos a nivel del sistema de transporte responsable del ensamble de los péptidos antigénicos en las moléculas clase I^{16,17}.

La mayor parte de los antígenos presentados por células tumorales están codificados por el genoma celular o de un virus y son presentados por moléculas clase I¹⁸⁻²⁰. En consecuencia, aquellas

variantes celulares con defectos en la expresión de este complejo son menos antigénicas y en ocasiones evaden exitosamente los mecanismos de vigilancia inmune^{16,17,21}. Las células AN constituyen una población de linfocitos que no expresan Ig or TCR en la superficie²²⁻²⁵ y reconocen antígenos de una manera diferente a la descrita para LTC²⁶. El papel de estas células en la inmunología tumoral esta limitado a algunos tipos de neoplasias, las cuales carecen o expresan niveles bajos de moléculas clase I del CPH²⁷⁻³⁰. Sin embargo, se han descrito células resistentes a AN las cuales no expresan moléculas del CPH, lo que sugiere que el (los) mecanismo(s) responsable de susceptibilidad a AN no esta limitado a la expresión de moléculas de H-2 o HLA³¹⁻³².

I. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

1. Generalidades.

El complejo principal de histocompatibilidad está localizado en el cromosoma 6 en el humano (HLA) y en el cromosoma 17 en el ratón (H-2)⁷⁴⁻⁷⁶. Los genes del CPH han sido clasificados en tres grupos en base a su estructura y/o función: clase I, II y III. Sin embargo, la caracterización de esta región cromosómica ha revelado que existe una complejidad todavía mayor^{77,79}. En las Figuras 1a y 1b, se muestra en forma simplificada la organización de los CPH del ratón y del hombre⁷⁶.

Las moléculas de clase I, y posteriormente las moléculas de clase II, fueron identificadas por sus propiedades antigénicas al transplantar tejidos entre individuos de una misma especie o que pertenecían a distintas especies^{77,78,80,81}. En la actualidad se ha demostrado que esta diversidad antigénica está determinada por el polimorfismo de las moléculas y por péptidos unidos a ellas en el interior de la célula¹¹. Las moléculas clase III son componentes del complemento y no participan en la comunicación celular por lo que no se incluyen en esta presentación^{74,76}.

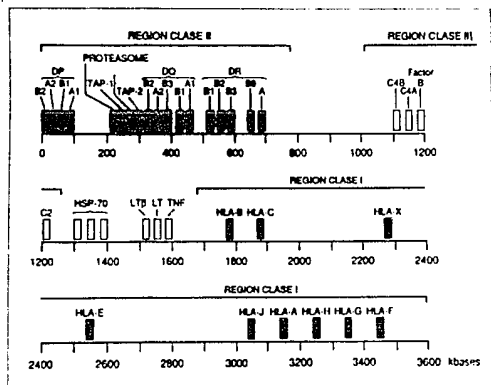
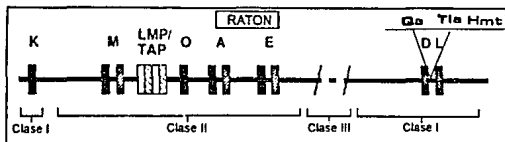


Fig 1a. Esquema de la organización genética del CPH humano⁷⁶.

Fig 1b. Esquema de la organización genética del CPH de ratón⁷⁶.



2. Estructura

2.1. Moléculas clase I:

Están formadas por la asociación de dos cadenas polipeptídicas: una cadena pesada α de 45 kD codificada en el CPH y una cadena ligera de 12 kD, la β_2m , codificada por un gen localizado en el cromosoma 15 en el humano y 2 en el ratón⁷⁴⁻⁷⁶.

La cadena pesada posee tres dominios extra citoplasmáticos (α 1, α 2 y α 3). Los dominios α 1 y α 2 conforman una cavidad limitada por estructuras helicoidales en la parte superior y planas en el interior en la cual se localizan péptidos pequeños de 7 a 8 a.a.^{76,83,84} (ver más adelante). Mediante estudios de cristalografía ha sido posible caracterizar el sitio de unión entre la molécula de clase I y el péptido que ocupa la cavidad^{85,86}. Este análisis ha mostrado la presencia de sitios de unión al péptido determinados por a.a. específicos (anclaje); cambios en la secuencia de a.a, como en el caso de las mutantes H-2^{bm} del ratón, han revelado que la afinidad por el péptido puede variar⁸⁷.

Esta asociación entre moléculas de clase I y péptidos endógenos permite a los receptores para antígeno de las células T (principalmente

CD8+), reconocerlos y desarrollar una respuesta inmune cuando son antigénicos^{88,89}. El polimorfismo de las moléculas de clase I facilita la interacción con un repertorio también polimórfico de receptores y la asociación con uno o mas péptidos, lo que eventualmente se traduce en una mayor capacidad para responder ante el universo antigénico¹¹.

El dominio $\alpha 3$ posee una secuencia de aminoácidos conservada entre las moléculas clase I, tiene una conformación globular parecida a la de las inmunoglobulinas y constituye el sitio de unión a la β_2m y a la molécula CD8^{76,90}. La otra región conservada tiene 25 aminoácidos, es intramembranal y define al dominio $\alpha 4$ ^{74,76}. Finalmente, la región intracitoplásmica consta de 30 residuos de aminoácidos y es prescindible^{74,76}.

La cadena β (β_2m) posee dos alelos en el ratón y ninguno en el humano^{13,17}. Al igual que la cadena pesada, tiene la estructura globular característica de las moléculas que forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas^{13,17,74,76}. Además de interactuar con el dominio $\alpha 3$ de la cadena pesada la β_2m tiene puntos de unión con el sitio de unión al péptido, lo cual parece ser crítico para mantener la conformación de las moléculas clase I, Figura 2^{13,17,74-76}.

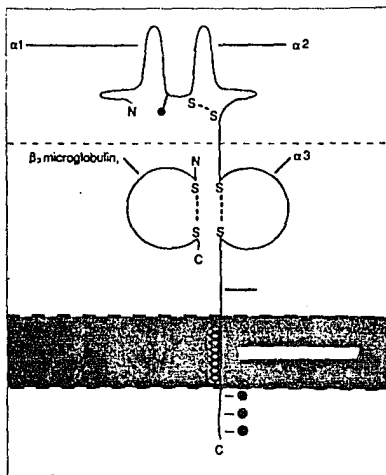


Fig. 2. Diagrama de la molécula clase I⁷⁶.

2.2. Moléculas clase II

Las moléculas clase II están formadas por la unión no covalente de las cadenas polipeptídicas α (32-34 kD) y β (29-33 kD). Cada subunidad está codificada por un gen diferente dentro del CPH y forman pares específicos (i.e IA α/β en el ratón y HLADR α/β en el humano)^{76,77,91,92}. Las cadenas α y β poseen dos regiones extracitoplasmáticas de 90 aminoácidos cada una, llamadas $\alpha1/\alpha2$ y $\beta1/\beta2$ respectivamente⁷⁷. El sitio de unión al péptido está formado por la interacción de las regiones $\alpha1$ y $\beta1$, las cuales adoptan una estructura similar, pero ligeramente más grande, a la descrita para las moléculas de clase I^{13,74}. La cavidad permite el ensamble de péptidos de 10 a 12 aminoácidos existiendo al igual que en las moléculas clase I sitios para aminoácidos de anclaje^{13,74,93}.

Los segmentos $\alpha2$ y $\beta2$ no son polimórficos y probablemente son importantes para uniones no covalentes entre las cadenas. Las moléculas clase II poseen también regiones transmembranales e intracitoplasmáticas Figura 3⁷⁶.

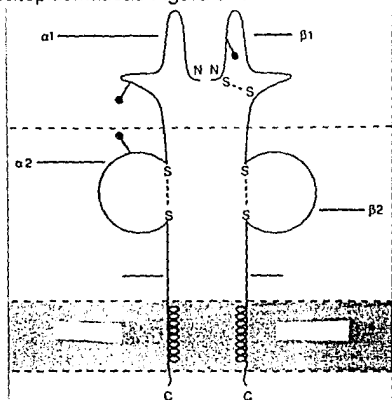


Fig 3. Diagrama de la molécula clase II⁷⁶.

En el RE las moléculas clase II se asocian con una tercera subunidad, la cadena invariante (Ci)^{11,13}. Esta cadena es una glicoproteína tipo II, con un sólo dominio transmembranal y una cola intracitoplásmica aminoterminal. Existen 4 formas de Ci determinadas por procesamiento alternativo del ARNm (p31, p33, p41 y p43)⁷⁶. Este péptido se disocia del

complejo α/β_2m en los endosomas y no se expresa en la membrana celular¹³. La ausencia de Ci no impide que las moléculas clase II sean expresadas en la superficie celular; sin embargo, el sitio de unión al péptido es diferente a las que poseen la Ci, lo que sugiere que la Ci actúa como chaperona en el doblamiento del sitio de unión al péptido¹³.

3. Ensamble del péptido a las moléculas clase I

3.1. Procesamiento de péptidos endógenos:

El procesamiento de péptidos endógenos (derivados de proteínas sintetizadas en la célula) no requiere el paso a través de un compartimiento ácido o proteasas lisosómicas^{11,13,83}. Existe evidencia de que los péptidos son generados en el proteasoma (20S) o complejo proteasa multicatalítico^{13,94-101,104}. El paso inicial al parecer requiere de la unión de las proteínas citosólicas a moléculas del sistema ubiquitina^{13,103}.

3.2. Ensamble del péptido:

Las moléculas clase I y β_2m entran al RE a través de un aparato transportador^{13,102}. En el RE, la cadena pesada de la molécula clase I se asocia rápidamente con la proteína **p88**^{13,94}. Posteriormente se forma un trímero con β_2m del cual eventualmente se libera **p88**^{94,104}.

En el RE se han identificado dos proteínas membranales denominadas **TAP-1** y **TAP-2**, con homología con los transportadores **ABC**^{11,13,105-108}. Estas moléculas forman heterodímeros, se localizan en las membranas del RE y cis Golgi y son responsables de la translocación de péptidos a las moléculas clase I¹⁰⁰. La unión del péptido al complejo α/β_2m se lleva a cabo una vez que **p88** ha sido liberada, Figura 4^{13,104}.

En humanos y animales se ha demostrado cierto polimorfismo en los genes que codifican para estos transportadores¹⁰⁵⁻¹⁰⁸, lo que sugiere que estas moléculas juegan un papel importante en la selección de los péptidos disponibles para unirse a las moléculas clase I^{11,13,76,100}.

Defectos a nivel de los transportadores han sido detectados en líneas celulares humanas (**Tap 1** en la línea .134, **Tap 2** en **BM36.1** y **Tap 1** y **Tap 2** en **T2**) y murinas (**Tap 2** en **RMA-S**). Estas células sintetizan moléculas clase I y β_2m , sin embargo, son incapaces de ensamblar el péptido^{16,17,21109,110}.

El ensamble de las cadenas clase I, β_2m y péptido es

indispensable para la expresión de este complejo en la superficie celular. Con algunas excepciones no hay expresión de moléculas clase I en ausencia de β_2m^{87} y los heterodímeros clase I/ β_2m en ausencia de péptidos en la superficie celular son inestables^{87,21}.

3.3. Expresión en la superficie celular:

Una vez liberadas del RE las moléculas clase I son transportadas a través del aparato de Golgi en donde sufren modificaciones en las cadenas laterales de carbohidratos^{11,13}. Las moléculas clase I tardan aproximadamente 30 min en llegar a la superficie en donde principalmente se encuentran heterodímeros de las moléculas clase I unidos a péptidos^{11,13,102}.

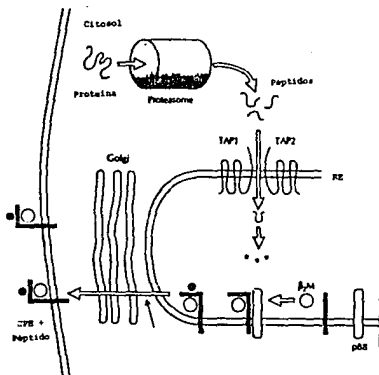


Fig 4. Modelo esquemático de la generación de péptidos. Ensamble y transporte intracelular de las moléculas clase I. Las proteínas citosólicas son degradadas por proteasomas dependientes de ATP y son translocadas a la luz del RE por los transportadores de péptidos: TAP-1 y TAP-2. Las moléculas clase I y β_2m se depositan en el RE y se ensamblan con la ayuda de la chaperona p88. El péptido se une al heterodímero β_2m/α y se transporta a través del Golgi a la superficie celular¹³.

4. Ensamble del péptido a las moléculas clase II:

4.1. Procesamiento de antígenos extracelulares:

Estas moléculas son endocitadas o fagocitadas por células presentadoras de antígenos. Las proteínas son posteriormente

fragmentadas en péptidos de 10 a 18 residuos de a.a. en los compartimentos lisosomales y en endosomas^{11,13,77}.

4.2. Ensamble del péptido:

Después de entrar al RE, las moléculas clase II se asocian con la Ci para ser transportadas posteriormente a través del aparato Golgi^{11,13,108}. Posteriormente, los complejos Clase II/Ci interceptan a los endosomas tempranos (ver Fig 5) y mediante una serie de reacciones no bien caracterizadas todavía se lleva a cabo el ensamble de péptidos con la moléculas Clase II y la liberación de la Ci Figura 576.

4.3. Expresión de moléculas del CPH en la superficie celular:

El tiempo requerido para la expresión de moléculas Clase II en la membrana celular es de aproximadamente 2-4 hs¹³. Al igual que en el caso de las moléculas clase I, la ausencia de péptidos repercute en la estabilidad de la molécula¹¹¹.

La presentación de péptidos es un evento continuo en las células. Los mecanismos antes descritos constituyen los más conocidos, sin embargo otras formas de presentación de péptidos probablemente existan. Los péptidos presentados en condiciones normales no son capaces de inducir respuestas inmunes debido a los mecanismos de tolerancia establecidos durante el desarrollo.

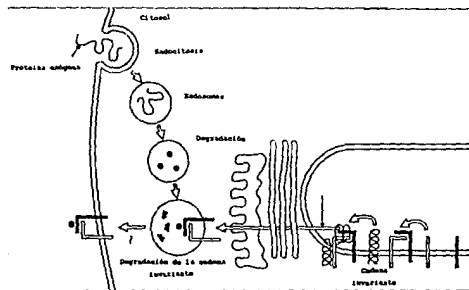


Fig 5 Modelo esquemático del ensamble y transporte intracelular de las moléculas clase II. Las cadenas α y β se ensamblan en presencia de la Ci. Los complejos Clase II/Ci son transportados a través del Golgi hasta los endosomas tempranos. En los endosomas tardíos la Ci se degrada permitiendo el ensamble del péptido procesado con anterioridad. El complejo de moléculas clase II/péptido se transportan a la superficie celular¹³

II. RESPUESTA INMUNE CELULAR

1. LINFOCITOS T

1.1. Generalidades

Los linfocitos T tienen un papel central en la respuesta inmune. Las funciones de los linfocitos T se llevan a cabo a través de contacto directo entre células y/o la acción de factores solubles. Los linfocitos T se han dividido en dos grupos basados en la expresión en la superficie de las moléculas CD4 y CD8. La expresión de estas moléculas se adquiere en el timo durante el desarrollo¹⁶².

1.2. Linfocitos CD4+

Los linfocitos CD4+ tienen funciones reguladoras de la respuesta inmune y se denominan linfocitos Th (cooperadores) y generalmente reconocen al antígeno en el contexto de moléculas clase II del CPH. Las funciones de los Th son ejercidas principalmente a través de citocinas¹⁶². Recientemente los linfocitos CD4+ se han subdividido en tres subtipos en base a las citocinas que secretan:

- (a) Cooperadores tipo I (**Th1**) que secretan IFN γ e IL-2¹¹³.
- (b) Linfocitos cooperadores tipo II (**Th2**) que secretan IL-4¹¹³.
- (c) Linfocitos (**Th0**), son células con la capacidad para producir ambos tipos de citocinas³²² y probablemente son las células precursoras de los linfocitos TH1 y Th2.

Es importante mencionar que no todos los linfocitos CD4+ presentan estos patrones de secreción, algunos linfocitos "naive" únicamente son capaces de secretar IL-2 y casi nunca secretan IL-4^{81,162}.

Se ha sugerido que los linfocitos T CD4+ tienen un precursor común a nivel de células tronco del sistema hematopoyético. La diferenciación en Th1 o Th2 podría estar determinada en parte, por citocinas, tales como la IL-10 o IL-12¹¹³.

1.3. Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T citotóxicos fueron identificados **in vitro** como células capaces de reaccionar en CML contra moléculas alogénicas del CPH¹¹⁴. Posteriormente se demostró que tenían capacidad para lisar

células neoplásicas o infectadas por virus^{114,115}. Esta variedad de células T constituye la población mayoritaria entre aquellas que expresan la glicoproteína CD8 en la membrana. Primordialmente, pero no en forma exclusiva, los LTC reconocen antígenos endógenos presentados por moléculas clase I de CPH ^{20,114,116}.

En circulación el porcentaje de LTC es bajo⁷³, sin embargo en cultivo es posible identificar estos linfocitos al co incubarse con IL-2 después de 5 a 10 días. Los linfocitos CD8+ requieren de cuando menos dos señales para adquirir características funcionales; es necesario el reconocimiento del antígenos en la célula blanco así como la presencia de citocinas (IL-2, IFN γ y probablemente IL-4, IL-6, IL-7 e IL-12) ^{76,113}.

1.4. Receptor de Células T

El reconocimiento de antígenos se lleva a cabo a través de dos tipos de receptores especializados: (a) la variedad α/β que esta presente en >95% de las células circulantes y (b) los receptores conformados por las subunidades γ/δ , expresados por una pequeña fracción de la población ^{10,117-128}.

La estrategia mediante la cual se genera la diversidad para el reconocimiento es similar en el caso de las Igs y el RCT^{81,92,102,197,198}. Ambos tipos de moléculas requieren de regiones variables y una región constante de anclaje, la cual en el caso del RCT es responsable de la activación de células T. Las regiones variables de la cadena β del RCT están codificadas por un gran número de segmentos génicos denominados V (variable), J (unión), D (diversidad) y la región constante C (constante). En el caso de la cadena α , los genes involucrados son V, J y C. Las regiones variables únicas se generan por la recombinación somática de estos genes en las dos cadenas, el número de combinaciones posibles es mayor a 1×10^{16} ⁽²⁵⁹⁾.

El RCT es parte de un complejo molecular en la cual participan un mínimo de ocho proteínas integrales de membrana tipo I, codificadas por seis genes diferentes ^{124,125,129-131}.

El sitio de unión al antígeno lo constituyen los heterodímeros conformados por las cadenas α/β o γ/δ el RCT. Las subunidades del complejo CD3: γ , δ , ϵ , ζ y ν ¹²⁹⁻¹³¹, no tiene participación en el reconocimiento antigénico, sin embargo son importantes en la activación de la célula. Dentro del complejo CD3 se ha demostrado que

pueden constituirse dos elementos de activación disociables formados por las subunidades ζ/ζ , ζ/v y las distintas variedades de la cadena ζ (a, b, c), los cuales tienen función de transductores de señales ^{76,123,130,132}, Figura 6.

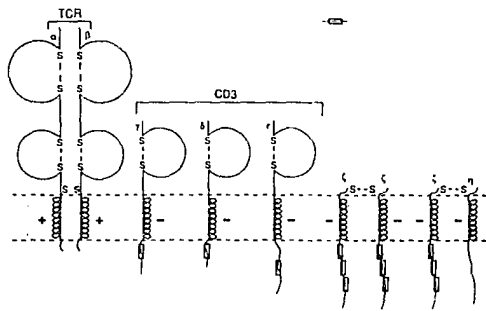


Fig 6. Componentes del complejo del RCT. El RCT está constituido por las subunidades α/β o γ/δ , las subunidades del complejo CD3 γ , δ y ϵ están presentes como monómeros unidos en forma no covalente al RCT. Las cadenas ζ y ν están presentes como homodímeros $\zeta-\zeta$ o heterodímeros $\zeta-\nu$ ⁷⁶.

Es importante mencionar que una de las principales funciones de las proteínas ζ , y ν es el facilitar la expresión en la superficie del complejo del RCT.

1.5. Linfocitos T γ/δ

Los linfocitos T γ/δ , constituyen una población de células que difieren ontogénicamente de los linfocitos T α/β , utilizan un repertorio restringido de regiones variables, predominan en epitelios y participan en el reconocimiento de antígenos bacterianos, proteínas de choque térmico y superantígenos^{10,113,122,128,138-141}. Tal y como ocurre con las células AN, los linfocitos γ/δ , no están restringidos por productos del CPH¹²².

1.6. Moléculas accesorias:

Existen además otras moléculas que funcionan como elementos accesorios de adhesión o bien de activación: **CD2**, **CD28**, **LFA-1**, **CD45** y **CD4/CD8**¹³³⁻¹³⁷. La Figura 7 muestra esquemáticamente el complejo de reconocimiento antigénico y las moléculas accesorias⁷⁶.

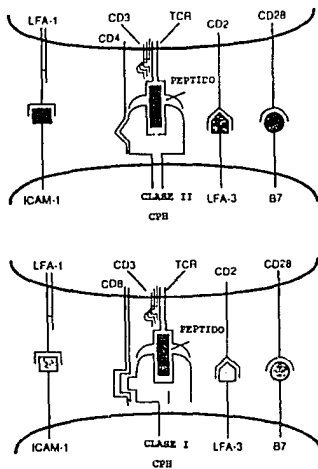


Fig 7. Moléculas en la superficie de células T involucradas en el reconocimiento antigénico y respuesta celular. Las interacciones entre las células T CD4⁺ y las CPA o las CD8⁺ y célula blanco, involucran diferentes moléculas en la superficie celular las cuales reconocen diferentes ligandos⁷⁶.

1.7. Activación de células T:

Los mecanismos que conducen a la activación de células T son complejos, involucran la participación de proteínas de membrana, transducción de señales y la activación de distintos genes.

En las células T al reconocer al péptido en asociación al las moléculas del CPH se generan los siguientes eventos: (a) Transducción temprana de señales, (b) transcripción de genes, (c) expresión de moléculas de superficie, (d) secreción de citocinas y /o inicio de funciones citolíticas y (e) inducción de la actividad mitótica^{132,144-152}.

Las señales de activación tempranas incluyen: (1) la fosforilación de tirosinas de proteínas de membrana y citoplasmáticas, (2) hidrólisis del inositol fosfolípido de la membrana celular, (3) aumento de las concentraciones de calcio y (3) aumento de la actividad de la proteína cinasa C^{132,144-152}.

Durante la activación de células T se expresan tres categorías de genes: proto-oncogenes celulares/genés de factores de transcripción, genes de citocinas y genes de receptores de citocinas ^{132,144-152}.

La Figura 8 muestra un esquema simplificado de algunos de los eventos que tienen lugar al activarse la célula T.

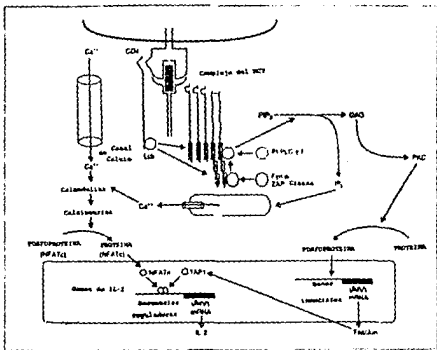


Figura 8. Rutas intracelulares que participan en la activación de células T. Los principales eventos bioquímicos que suceden después de la unión del RCT al antígeno, se esquematizan en la figura 76.

2. CELULAS ASESINAS NATURALES

2.1. Generalidades

Las células AN han sido definidas morfológicamente como linfocitos grandes, cuyos diámetros varían dependiendo de su estado funcional, que contienen abundantes gránulos en el citoplasma y que constituyen entre el 5-15% de las células circulantes con apariencia linfocid^{22,23,26,153}.

A diferencia de los LTC, la actividad lítica de las células AN no está restringida por productos del CPH²⁷. De hecho, existen diversos ejemplos que demuestran una correlación inversa entre los niveles de expresión de moléculas de clase I y la susceptibilidad a esta variedad de células del sistema inmune²⁷. Sin embargo, es importante señalar que existen también excepciones a esta propiedad de las células AN²⁴. También es importante mencionar que las células AN no requieren de sensibilización previa para ejercer su actividad lítica contra células tumorales o células infectadas por virus¹⁵⁹.

La actividad lítica de las células AN o la inhibición de la misma es la consecuencia de reacciones no del todo definidas^{26,27,161-165}. Por ejemplo, la capacidad de inducir lisis por las células AN depende de la

cantidad de receptores NKR-P1 presentes en la membrana de la célula¹⁵⁴. Por el otro lado, la respuesta a las señales inhibitorias a través de **Ly-49** es más intensa¹⁵⁵.

2.2. Marcadores de superficie

El análisis con anticuerpos monoclonales ha revelado que expresan **CD14**, **CD56**, **CD16**, niveles bajos de **CD2**, sólo la cadena α del complejo **CD3** y la subunidad **p70** del **RIL-2**²⁶. No se han identificado arreglos en los genes que codifican para las Igs o los **RCT**²⁶.

Recientemente se han identificado dos familias de receptores presentes en las células AN^{154,155}. Es posible que los miembros de estas familias estén relacionados genéticamente, ya que comparten algunas características estructurales. Sin embargo, la unión a sus ligandos tiene efectos distintos en la actividad celular¹⁵⁴⁻¹⁵⁸.

Una de las familias de receptores contiene a las moléculas **NKR-P1** (en la rata) y **NK1.1** (en el ratón)¹⁵⁴. La otra familia esta definida por el antígeno **Ly-49**¹⁵⁵.

El antígeno **Ly-49** se expresa en el 20% de las células AN esplénicas del ratón, corresponde a una proteína integral tipo II y a diferencia de NK1.1, envía señales inhibitorias a las células AN¹⁵⁴⁻¹⁵⁸. Es importante señalar que los genes que codifican para estas moléculas están localizados en el cromosoma 6 del ratón, en una región denominada complejo de genes de células AN (**NKC**)¹⁵⁵. En humanos recientemente se ha identificado al antígeno **p58** como la molécula responsable del reconocimiento del CPH¹⁶⁵.

2.3. Papel de las células AN en cáncer

Se piensa que este tipo celular representan el principal mecanismo de protección contra metástasis hematógenas, como se ha podido documentar en modelos animales experimentales¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Pacientes con cáncer, particularmente aquellos con carga tumoral importante o con metástasis, tienen disminución en el número de células AN circulantes^{166,169-172}. La interpretación de estos datos es controvertida¹⁶⁶; sin embargo, algunos estudios han mostrado una correlación entre la baja actividad de células AN y la presencia de cáncer familiar¹⁷². Una evidencia adicional en favor de un papel en la vigilancia

inmunológica por parte de las AN se obtuvo de la mayor frecuencia de neoplasias en individuos con terapia inmunosupresora quienes tienen niveles disminuidos de esta variedad celular^{166,173}.

El papel de las células AN puede ser especialmente importante en algunos tipos de neoplasia. En tumores de cabeza y cuello, la disminución en la función de células AN puede tener valor pronóstico en predecir recurrencias, respuesta al tratamiento y sobrevida libre de enfermedad¹⁶⁶. Varios estudios han mostrado una correlación inversa en el nivel de actividad de las células AN y la presencia de enfermedad metastásica, particularmente en cáncer de mama y melanoma metastásico, existe evidencia de una actividad de células AN significativamente menor que pacientes con enfermedad localizada^{166,170}. En neoplasias hematológicas, como en leucemia sin tratamiento se han encontrado niveles disminuidos de la función de células AN¹⁶⁶. Estos datos, sin embargo, no son consistentes ya que en otros estudios no se han mostrado alteraciones¹⁶⁶.

La explicación a estas discrepancias no se conoce, sin embargo, podría ser debida a factores que en forma independiente de la neoplasia modifican la actividad AN^{166,174,175}.

2.4. Activación In Vivo de células AN

Se ha demostrado la capacidad de algunos agentes de aumentar la proliferación, activación y citotoxicidad de células AN. Ejemplos de estos factores incluyen citocinas (IFN, IL-2, IL-12), productos bacterianos, lectinas y Ac monoclonales^{32,163,164,176,177}.

3. CELULAS ASESINAS ACTIVADAS POR CITOCINAS

El estudio de células CAAC ha resultado ser altamente complejo debido en parte a lo heterogéneo de esta población celular. La actividad citotóxica de células CAAC está mediada por células AN (**CD3-/CD16+**) y por linfocitos T (**CD3+/CD8+**) activadas por IL-2 y posiblemente por otras citocinas¹⁷⁹. Las células citotóxicas generadas a través de este método son capaces de lisar, en forma no restringida por el CPH, una gran variedad de células tumorales^{178,179}.

La mayor parte de células CAAC son inducidas mediante la unión de la IL-2 a la cadena p75 β del receptor de IL-2¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Algunos agentes biológicos, tales como los interferones, la interleucina 12, los productos

bacterianos, algunas lectinas y anticuerpos monoclonales pueden incrementar el número y actividad lítica de las células CAAC^{177,180}.

4. LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES

Como su nombre lo indica son linfocitos presentes en el estroma en el cual se encuentran inmersas las células neoplásicas. Su actividad citotóxica **in vivo** o **in vitro** es baja, sin embargo, al incubarse con IL-2 la actividad lítica se incrementa considerablemente, razón por la cual se han utilizados en el tratamiento de tumores^{181,182}.

Las diferencias en el fenotipo, en las estructuras que reconocen al antígenos, así como el tipo de péptidos que las células AN, LTC, CAAC y LIT son capaces de identificar, enriquecen considerablemente las estrategias utilizadas por el organismo al desarrollar una respuesta en contra de células alteradas.

5. CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad mediada por células constituye uno de los mecanismos efectores más importantes de los sistemas de vigilancia inmunológica¹¹⁴. Dentro del sistema inmune se han descrito diversos tipos celulares con actividad citotóxica, dentro de los cuales destacan los LTC (α/β o γ/δ), las células AN, las células LAK y aquellas que ejercen su actividad al ser transfectadas experimentalmente con genes que codifican para la síntesis de alguna citocina¹¹⁴.

Los LTC y las células AN pudieran ejercer funciones complementarias **in vivo**. En una fase inicial células neoplásicas o infectadas por virus serían detectadas y atacadas con células AN. Posteriormente, como consecuencia del estímulo antigénico, los LTC darían lugar a una población con distribución clonal y altamente específica.

Aunque los mecanismos de lisis pudieran ser comunes a todos los tipos de células citotóxicas es importante enfatizar que el reconocimiento del antígeno se lleva a cabo a través de diferentes estructuras, pudiendo además estar restringido (LTC) o no (AN, T γ/δ y CAAC) por el CPH^{149,183}.

Los cambios celulares que determinan la actividad lítica de las células son complejos. El primer paso consiste en la rápida adhesión de la célula citotóxica a la célula blanco a través de moléculas de superficie específicas, tales con RCT y/o moléculas accesorias¹⁸³⁻¹⁸⁵. Estudios de microscopía electrónica han demostrado la presencia de extensas interdigitaciones entre las membranas en los sitios de contacto¹⁴⁹. Este sitio de contacto es rico en talina. También se ha demostrado polarización de los microtúbulos hacia el sitio de contacto a partir del MTOC^{74,149}, un esquema simplificado se presenta en la Figura 9.

Existe probablemente más de un mecanismo por el cual las células citotóxicas ejercen su acción lítica:

1) La formación de conjugado es seguido en ocasiones de lisis dependiente de calcio que induce apoptosis en la célula blanco¹⁸⁶.

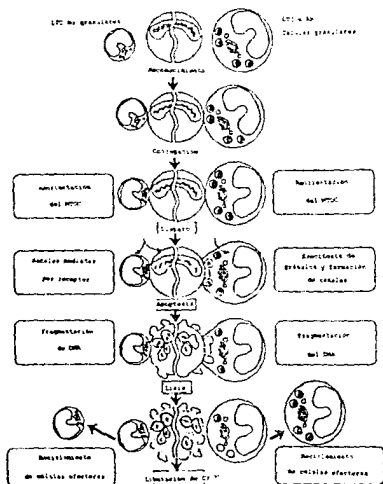


Fig. 9. Esquema de los pasos que determinan la actividad citotóxica mediada por LTC o células AN⁷⁴.

2) Algunos LTC y las células AN lisan a sus blancos mediante la secreción de proteínas contenidas en vesículas o gránulos intracitoplásmicas. Algunas de las moléculas contenidas por estas estructuras son:

- (a) La **perforina**, que induce la formación de canales en la membrana celular¹⁸⁷⁻¹⁹¹.
- (b) Un conjunto de proteasas que reciben el nombre genérico de **granzimas 1, 2 y 3**¹⁸⁷⁻¹⁹¹.
- (c) **Proteoglicanos**¹⁸⁷⁻¹⁹¹.
- (d) **Factor quimiotáctico** que participa activamente en el "reclutamiento" de PMN¹⁸⁷⁻¹⁹¹.
- (e) **Factor inductor** de la **degradación de DNA**¹⁸⁷⁻¹⁹¹.
- (f) Componentes lisosomales tales como la **β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa y aril-sulfatasa** ¹⁸⁷⁻¹⁹¹.

El mecanismo lítico mejor caracterizado es el de la perforina. La perforina es una proteína antigenicamente relacionada al C9 del complemento que al polimerizarse forma estructuras tubulares que atraviesan la membrana celular¹⁸⁷. Los canales que resultan de la inserción de los polímeros de perforina inducen cambios en la concentración de iones y en la presión osmótica intracelular¹⁸⁷. La incubación **in vitro** de moléculas de perforina con células resulta en la lisis de las mismas¹⁸⁷.

El gen que codifican para la perforina murina se encuentra localizado en el cromosoma 10, tiene tres exones, dos de los cuales codifican para el polipéptido. El gen de la perforina humana tiene una organización similar¹⁸⁷.

3) La apoptosis es otra de las rutas líticas y es objeto de estudio por varios grupos^{186,192,193}. Los mecanismos mediante los cuales las células citotóxicas inducen la muerte a través de esta vía no están bien dilucidados, sin embargo, recientemente se ha descrito la inducción de apoptosis a través de la liberación de gránulos de serino proteasas en presencia de perforina^{191,194}.

La inducción de la muerte programada no requiere la síntesis de proteínas, lo cual sugiere que las proteasas inician la desintegración nuclear mediante mecanismos postraduccionales en los cuales esta involucrada la activación prematura de la serin-treonina cinasa **p34^{cdc2}** inducida por la **Fragmentina-2** (en células AN) y por la **Granzima B (LTC)**¹⁹⁵.

4) Los linfocitos CD4+ con actividad citotóxica han sido descritos en distintos sistemas experimentales, incluyendo ratones en los que se ha inactivado el gen que codifica para la β_2m ^{194,196}. La actividad lítica esta determinada posiblemente por FNT α , FNT β o IL-12 (factor

citotóxico de AN; NKCF)¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.

5) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). La participación de anticuerpos en el reconocimiento de antígenos tumorales ha sido mencionada anteriormente. Algunos tipos de células citotóxicas como los macrófagos, células AN y posiblemente LTC, poseen receptores Fc en la superficie celular^{74,158,200,201}. Las Igs unidas a estos receptores son responsables del reconocimiento de determinantes antigénicos presentes en la superficie de las células tumorales; posterior al cual la célula citotóxica lisa a su blanco a través de cualquiera de los mecanismos antes descritos (perforina, fragmentina, apoptosis, etc.)¹⁵⁸.

Es importante señalar que la actividad lítica no es un acontecimiento terminal, ya que las células efectoras pueden reiniciar el ciclo y lisar a otras células blanco⁷⁴.

Como ya se ha mencionado es necesaria la participación de factores solubles en las respuestas inmunes. Estas moléculas actúan como cofactores en la activación de linfocitos T y otros tipos celulares. En ocasiones tienen una acción lítica directa en contra de diferentes blancos celulares. Genéricamente se les conoce con el nombre de citocinas las cuales se discuten a continuación.

6. CITOCINAS

6.1. Generalidades

Son hormonas protéicas producidas por diferentes tipos celulares que regulan respuestas inmunes e inflamatorias. Su secreción es momentánea y autolimitada, depende de la presencia de un receptor y pueden ejercer su función en diferentes tipos celulares^{202,203,212}.

A continuación se describen brevemente algunas de las características de los receptores para interleucinas que han sido identificados:

- (a) El primer grupo posee varios dominios extracitoplasmáticos característicos de la superfamilia de las Igs.
- (b) Los receptores tipo I unen a factores de crecimiento hematopoyético y otras citocinas tales como la IL-2, IL-4 e IL-6;

estos receptores tienen en los dominios extracitoplasmáticos una región conservada de cinco aminoácidos (WSXWS).

- (c) Los receptores Tipo II se han identificado solamente a nivel de secuencia de aminoácidos y son los receptores para los interferones, este tipo de estructuras pudieran también incluir receptores para factores de la coagulación.
- (d) Los receptores tipo III son los sitios de unión para los FNT α y FNT β , este tipo de receptores tienen secuencias homólogas a la proteínas Fas, CD40 y a receptores para factores de crecimiento nervioso.
- (e) Los receptores para citocinas tales como la IL-8 poseen siete cadenas alfa helicoidales transmembranales, características que han sido también descritas para los receptores β -adrenérgicos Figura 10^{76,204-212}.

El número de citocinas descritas en los últimos años ha ido en aumento; actualmente se han caracterizado quince interleucinas^{203,211,212}, además de los factores que han conservado su nombre original como los factores estimulantes de colonias, los interferones, etc. La IL-2, el FNT α y los IFN α , β y γ , son citocinas especialmente importantes en la inmunidad tumoral, no solo por los efectos *in vivo* sino por el uso de éstas en el manejo de algunas neoplasias, por lo que se describen con mayor detalle a continuación.

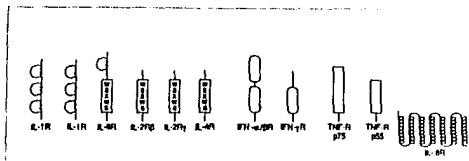


Fig 10. Miembros de la familia de receptores para citocinas. Estos receptores comparte algunas regiones estructurales que permite agruparlos en familias. Existen cinco familias de receptores para citocinas; (a) con estructuras similares a las inmunoglobulinas, (b) de tipo I, que contienen la secuencia WSXWS, (c) de tipo II, que corresponden a los receptores para los IFN, (d) tipo IV, corresponden a los receptores para FNT y (e) receptor de la IL-8⁷⁶.

6.2. Factor de Necrosis Tumoral

El FNT α , también llamado caquectina, es producido principalmente por macrófagos y otras células fagocíticas en respuesta a diferentes tipos de estímulos (endotoxina, mycobacterias, lisados parasitarios, IFN, IL-1, etc). Otros tipos celulares, como linfocitos T activados, células AN y eosinófilos son igualmente capaces de producir esta citocina^{213,214}. El FNT β o linfotóxina es producida por linfocitos T en respuesta a diferentes estímulos antigénicos²¹⁵. Estos dos tipos de FNT tienen una homología en su secuencia de aminoácidos del 28%, están funcionalmente relacionados y se unen al mismo receptor²¹³.

En humanos, el FNT α es una proteína de 157 a.a, que en la circulación forma dímeros y trímeros^{213,216}. El gen que codifica para esta proteína está localizado en el cromosoma 6, en la misma región cromosómica en la que se encuentran los genes que codifican para productos del CPH ^{215,217,218}.

La síntesis del FNT α se induce después de que las células han sido estimuladas; en el caso particular de los macrófagos, existe una reserva intracitoplásmica que es liberada también después del estímulo²¹³, por lo que el FNT α se produce en grandes cantidades y fácilmente satura sus receptores²¹³. La biosíntesis de esta molécula es regulada positivamente por IFN γ ²¹³. Por otro lado, su producción es inhibida por esteroides y otros agentes antiinflamatorios²¹³.

Las acciones del FNT α , se inician al unirse el trímero a los receptores de la superficie celular con una afinidad muy baja ^{213,219}.

Es especialmente interesante para este trabajo el hecho de que partículas no digeridas por macrófagos producen liberación sostenida de FNT α , lo cual puede ser importante para entender la inducción de granulomas por *M. tuberculosis* y *M. bovis*^{213,220,222,227}. También se ha reportado que los macrófagos estimulados con BCG son capaces de producir FNT α ^{213,220-222,228}.

In vitro el FNT α induce la activación de macrófagos, tiene un efecto sinérgico con la IL-2 en la activación de células T, estimula la proliferación de timocitos y favorece la actividad de células AN y CAAC^{213,223,224}. Otros de sus efectos han sido descritos sobre el sistema de coagulación o sobre células endoteliales, lo cual es importante en la fisiopatología del choque séptico^{213,225,226}. En piel la administración de

FNT α puede producir necrosis hemorrágica, principalmente en tumores muy vascularizados.

Los efectos sistémicos del FNT α incluyen:

- (a) La inducción de choque séptico en colaboración con otras citocinas, tales como la IL-1, IL-6 e IFN γ . Clínicamente estas citocinas producen fiebre, hipotensión, choque, depresión de la función del miocardio, falla pulmonar, hipoxemia, falla renal, isquemia gastrointestinal, hipoglicemia y acidosis láctica, datos característicos del choque séptico^{213,228}.
- (b) Caquexia: El FNT α es capaz de inducir caquexia como consecuencia de anorexia, pérdida de peso, anemia, catabolismo de lípidos y proteínas. Se han encontrado en diferentes patologías niveles altos de FNT α que pudieran ser los responsables de la caquexia presente en estos padecimientos tales como infecciones parasitarias, cáncer ^{220,226,228} y SIDA²¹³.
- (c) Inflamación: El FNT α tiene un papel importante en la remodelación tisular durante los procesos inflamatorios y en otros mecanismos de daño inmune²¹⁹.

El FNT α tiene también es importante en la fisiopatogenia de algunas reacciones inmunopatológicas tales como la enfermedad de injerto contra huésped²¹³, esclerosis múltiple²¹³, reacciones alérgicas cutáneas²²⁰, enfermedad por complejos inmunes²¹³ y en algunas enfermedades autoinmunes²¹³.

a. FNT γ y cáncer

Es posible que el FNT α en cáncer sea liberado por linfocitos infiltrantes de tumores (LIT) y macrófagos al interactuar con las células tumorales²²⁶. **In vitro** se han observado tres patrones de respuesta al FNT α : líneas celulares resistentes, efectos citostáticos y muerte celular por apoptosis²²⁹⁻²³⁰. La resistencia a FNT α en algunos tumores parece ser secundaria a un incremento en la producción de la enzima superóxido dismutasa (SOD)²¹³. De este hallazgo se deduce que uno de los mecanismos líticos en la destrucción de tumores además del efecto citotóxico directo, es la inducción de superóxidos reactivos^{213,231} que aumentan la actividad procoagulante en el centro del tumor y producen hemorragia^{213,231}.

Algunos tumores sólidos son capaces de producir FNT α el cual ejerce un efecto autócrino negativo, regulando el crecimiento del tumor²¹³.

b. Infección por BCG.

La inyección del BCG produce, independientemente de la vía de administración, la formación de granulomas formados por células epitelioides y linfocitos T activados. En la génesis de los granulomas es importante FNT α ^{221,222,227}. Esta citocina está involucrada así mismo en la destrucción de la bacteria^{220,227,228}. Experimentalmente el administrar anticuerpos anti-FNT α en animales infectados con mycobacterias evita la formación de granulomas y el crecimiento bacteriano produce la muerte del huésped²²⁰.

El FNT α liberado en el microambiente del granuloma parece estar involucrado en un mecanismo autócrino y parácrino que aumenta la síntesis y liberación de esta citocina, favoreciendo la acumulación de macrófagos e incrementando su capacidad bactericida²²⁷. A nivel sistémico el FNT α pudiera ser responsable de la caquexia presente en enfermos con tuberculosis pulmonar^{213,220,227}.

6. 3. Interleucina-2

La IL-2 es un polipéptido de 15.5kD, es producida por los Th1 y otras células granulares (AN) al ser activadas^{207,211,212}. Tiene efectos autócrinos y parácrinos y no han identificado efectos endócrinos^{232,233}. Sus acciones relevantes son; a) estimular el crecimiento de las células T, b) promueve el crecimiento y acción citotóxica de las células AN y c) en los linfocitos B actúa como factor de crecimiento promoviendo la síntesis de Igs^{207,234,235}.

Al activarse las células T como consecuencia del reconocimiento antigénico y en presencia de IL-1 e IL-6, se inicia la producción de IL-2 y en forma simultánea la expresión del receptor para este ligando²⁰⁷.

El receptor de IL-2 está compuesto de cuando menos tres cadenas proteicas: Un receptor de baja afinidad de 55kD (p55 o cadena α), un receptor de mediana afinidad compuesto por una proteína de 75kD (p75 o cadena β) unida a una proteína de 64 kD (p64 o cadena γ), las cadenas α , β y γ se unen para formar un receptor de alta afinidad,

Figura 11 76,204,207.

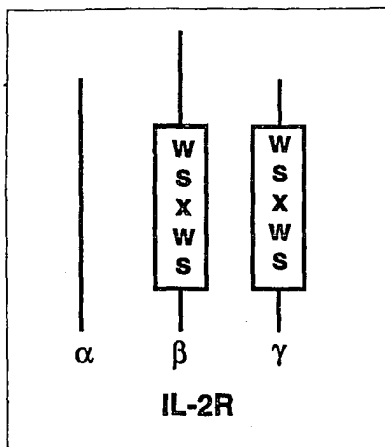


Fig 11. Diagrama del receptor de la IL-276.

Para inducir proliferación de células T la IL-2 debe unirse al receptor de alta afinidad²⁰⁷. La estimulación de células AN por IL-2 requiere aparentemente solo p75²⁰⁷.

La regulación de p55 y p75 se lleva a cabo a través de diferentes citocinas. A nivel transcripcional el IFN η induce la expresión de p55²⁰⁷ y la IL-2 induce la expresión de p75 en monocitos humanos²⁰⁷.

a. Efectos Antitumorales

Los efectos en células tumorales de esta citocina son indirectos, tienen lugar a través de la activación de células AN, LTC y CAAC^{234,236} y al inducir la producción de otras citocinas tales como IFN γ , FNT α y FNT β ^{207,234,236}.

La IL-2 ha sido utilizada *In vivo* en diferentes tipos de neoplasias, como terapia única a dosis variables o simultáneamente con células CAAC o TIL autólogos activados *in vitro*. Diferentes porcentajes de respuestas se han observado en neoplasias tales como; cáncer renal, melanoma maligno, cáncer de ovario, y algunos tipos de neoplasia

hematológicas 236-239.

La administración exógena de IL-2 induce efectos sistémicos, en ocasiones muy graves. Algunas los efectos secundarios son consecuencia de la liberación de citocinas tales como FNT_n e INF_n . A nivel cardiopulmonar induce hipotensión y/o síndrome de fuga capilar. Entre otros efectos no deseados deben mencionarse la pancreatitis, la anemia y en el 23% los pacientes desarrollan infecciones frecuentemente por *S. aureus*²⁴⁰.

6. 4. Interferones

Los interferones (IFN) fueron descubiertos en 1956 por su actividad antiviral²⁴¹. Posteriormente se demostró que los INF tienen la capacidad de inducir o suprimir funciones celulares a través de la regulación de distintos genes portadores de secuencias específicas en la región reguladora²⁴².

Existen tres tipos de interferones: α , β y γ . Algunas de las diferencias entre ellos están determinadas por los estímulos y las células que los producen^{243,244}.

a. $INF\alpha/\beta$

Los interferones tipo I (α o β) son secretados por todas las células nucleadas en respuesta a infecciones virales^{245,246}. El interferon tipo II o inmune, es producto de linfocitos T activados por antígenos o mitógenos^{247,248}.

Se han identificado 26 genes para $IFN\alpha$ (incluyendo algunos pseudogenes) localizados en el cromosoma 9 en el humano y 4 en el ratón. Los genes carecen de intrones y codifican para un total de 22 proteínas con un peso molecular promedio 20 kD²⁴⁹. La razón de esta complejidad no es clara, sin embargo, al parecer los distintos tipos de $IFN\alpha$, tienen acciones diferentes dependiendo del tipo celular^{250,251}.

Existe una sola forma de $IFN\beta$. Esta citocina es codificada por un gen localizado en el mismo cromosoma que contiene a los genes que codifican para los $INF\alpha$ ^{250,251}. Aunque existe solamente entre 15-30 % de homología entre los $INF\alpha$ y β , estas citocinas se unen al mismo receptor de membrana^{250,251}.

b. $\text{INF}\gamma$

El $\text{INF}\gamma$ es una proteína de 17 kD codificada por genes localizados en el cromosoma 10 del ratón y 12 del humano²⁵². La síntesis de esta citocina es inducida en linfocitos Th1, en LTC y en células AN al ser estimuladas por IL-2 y $\text{FNT}\alpha$ ^{243,253}. La presencia de IL-10 regula negativamente la producción de $\text{INF}\gamma$ ²¹¹.

Aunque comparte algunas de las características biológicas de los INFs tipo I es inducido por algunas infecciones virales solamente y en general tiene menor acción antiviral²⁵⁰. Sin embargo, su actividad inmunomoduladora es mayor²⁵⁴.

Una de las funciones más relevantes del $\text{INF}\gamma$ consiste en su capacidad para regular los niveles de expresión de moléculas clase I y clase II del CPH^{248,255}. En consecuencia, las células tratadas con $\text{INF}\gamma$ incrementan su capacidad para presentar antígenos²⁴⁸.

Otras funciones importantes del $\text{INF}\gamma$ son:

- (a) La activación de monocitos y macrófagos^{253,254}.
- (b) Incrementan la expresión de moléculas de adhesión^{253,254}.
- (c) Influyen en el cambio de clase de las Ig^{253,254}.
- (d) Regulan negativamente la proliferación de las células Th2^{253,254}.
- (e) Ejerce un efecto cooperador con la IL-2 en la regulación de algunas respuestas del sistema inmune^{253,254}.

El receptor para el $\text{INF}\gamma$, al igual que el receptor para los $\text{INF}\alpha$ y β pertenece al grupo de receptores tipo II para citocinas^{204,254}. Sin embargo, aún cuando existen regiones de homología entre los dos receptores, la unión al ligando es específica²⁵⁴.

III. CANCER

1. ANTIGENOS TUMORALES

Una de las características más importantes de la respuesta inmune es la capacidad de reconocer moléculas y discriminar lo propio de lo extraño³³. El reconocimiento de antígenos por anticuerpos y células se lleva a cabo a través de receptores especializados: las Igs y el RCT. La diversidad de estos sistemas de reconocimiento está determinado por complejos mecanismos genéticos cuya expresión constituye parte del programa de diferenciación de las células linfoides.

Las Igs reconocen antígenos expresados por moléculas en suspensión, asociados a células o estructuras extracelulares⁷⁴. Por el contrario, los RCT requieren que los antígenos sean presentados por moléculas del CPH¹²; esta restricción no es absoluta ya que algunos determinantes antigénicos reaccionan directamente con los RTC².

El papel que desempeñan los sistemas de vigilancia en la identificación de células neoplásicas así como en su erradicación constituye uno de los campos más activos y controvertidos en la inmunología. Gran parte de esta controversia surgió de la dificultad para identificar antígenos expresados exclusivamente por células neoplásicas³⁴⁻³⁸.

Los primeros antígenos tumorales fueron identificados en tumores inducidos en roedores por agentes químicos^{36,39}, luz ultravioleta⁴⁰ o virus⁴¹⁻⁴³. Sin embargo, es importante mencionar que tumores inducidos experimentalmente diferían en sus características antigénicas, aún cuando hubiesen sido inducidos por el mismo agente oncogénico^{44,45}.

En el caso particular de tumores inducidos por virus también se identificaron respuestas inmunes dirigidas contra proteínas codificadas por el agente infeccioso^{43,46,47}.

En tumores espontáneos los determinantes antigénicos identificados en las células neoplásicas pueden ser consecuencia de:

- (1) La expresión de proteínas codificadas por genes portadores de mutaciones⁴⁸⁻⁵².
- (2) La síntesis de proteínas que son expresadas exclusivamente en algún momento de la diferenciación celular³⁷.

- (3) El incremento en la síntesis de proteínas sin alteraciones detectables^{37,53,54}.
- (4) Por genomas de origen viral^{41-43,49,55}.

1.1 Antígenos reconocidos por anticuerpos

Por razones históricas el estudio de las moléculas de superficie en tumores se ha llevado a cabo principalmente utilizando anticuerpos. En general, los antígenos identificados mediante esta estrategia no son exclusivos de las células neoplásicas ya que algunos son detectables en la superficie de células normales⁵³. Sin embargo, su participación en algunas de las propiedades de las células tumorales justifican su inclusión. También es importante mencionar que estas moléculas no son reconocidas en su forma nativa por LTC⁵³.

A continuación se presenta una lista de algunos de los antígenos de interés oncológico:

- (a) Carbohidratos asociados a tumores (TACA), tales como: La serie Lacto (tipos 1 y 2) y los antígenos /Tri/sialosil-Tn/T. Debe señalarse que algunas de estas son moléculas de adhesión que determinan el o los sitios de metástasis⁵⁶.
- (b) Antígeno mucinoso de células epiteliales: codificado por el gene MUC-1. Este antígeno no está restringido por moléculas de clase I del CPH, es reconocido por linfocitos T n / β . Se encuentra presente en adenocarcinomas de mama, páncreas y en algunos tumores del ovario⁵⁷⁻⁵⁹.
- (c) HER2/neu: Adquiere propiedades antigénicas cuando se expresa en concentraciones elevadas por células de tumores de ovario, mama y pulmón⁵³.
- (d) Moléculas clase II del CPH: No son propiamente antígenos tumorales; sin embargo, son moléculas expresadas en forma anormal en el 75% de los melanomas primarios. Pudieran estar involucrados en las respuestas inmunes mediadas por células al presentar péptidos exógenos y probablemente endógenos⁵³.
- (e) Proteínas de matriz extracelular: Son secretadas en grandes cantidades por las células de melanoma y pudieran tener un papel importante en la adhesión, movilidad e invasión de estas células ⁵³.

- (f) ICAM-1: Esta molécula de adhesión es una glicoproteína de 89 kD que se encuentra presente en el 70% de los melanomas primarios⁵³.
- (g) MUC18: Es una glicoproteína de 113 kD, semejante a la molécula de adhesión neuronal, que se expresa normalmente en el músculo liso de los vasos y en melanoma ⁵³.
- (h) Proteínas Oncofetales: Entre las que se encuentra el proteoglicán condroitín sulfato y el antígeno placentario⁵³.
- (i) Gangliósidos: Al igual que algunas proteínas oncofetales, estas moléculas interactúan con proteínas de matriz extracelular. Los gangliósidos GM3, GD2 y GD3 son expresados en melanoma⁵³.
- (j) Receptores para hormonas de crecimiento: Están involucradas en el transporte intracelular de materiales biológicamente activos al igual que las proteínas de transporte catiónico. Existen cuando menos seis sistemas de receptor-factor de crecimiento en el melanoma, los cuales más que antígenos capaces de evocar una respuesta inmune han servido para caracterizar a la célula maligna. Algunos ejemplos incluyen los siguientes factores: FCE, FCN, ILGF, FCDP, TGFβ y FGF⁵³.
- (k) Antígenos asociados a la pigmentación: Existen tres antígenos que se expresan tanto en melanocitos normales como en neoplásicos: 70-80 kD, 50/8/17 kD y HMSA-1⁵³.
- (l) Antígeno neuroglandular altamente glicosilado: Es un excelente marcador inmunohistoquímico que se expresa además en algunos tejidos normales y en carcinomas⁵³.
- (m) Antígenos de diferenciación: Algunos ejemplos incluyen a la alfa-feto proteína y el antígeno carcinoembrionario, etc⁵³.
- (n) Productos codificados por genes portadores de mutaciones:
 - i) p53: Es una molécula relevante en el control del ciclo celular que puede funcionar como un supresor de tumores. En aproximadamente el 50% de los cánceres humanos se han encontrado mutaciones en este gen^{48,49,60,351}.

ii) p210: es la proteína producto de la fusión génica que resulta de la translocación de los genes BCR y ABL, predominantemente en leucemias mielógenas crónicas⁵⁰.

lii) En un grupo pequeño de neoplasias se ha documentado la expresión de proteínas virales, i.e HPV-16, que esta asociado con el 90 % de los cánceres epidermoides del cérvix ^{61,62} .

iv) p16: Recientemente descrita como inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina-4 (cdk4)⁶³. Este inhibidor está codificado en una región génica de menos de 40 kb localizada en el brazo corto del cromosoma 9, en la que se encuentra el gen supresor múltiple de tumores-1 (MST1)⁶⁴. El MST1 se encuentra deletado frecuentemente en líneas tumorales provenientes de tumores de mama, pulmón, cerebro, hueso, piel,vejiga, riñón, ovario y linfomas^{63,64}. En líneas de melanoma maligno frecuentemente existen mutaciones sin sentido⁶⁴.

1.2 Antígenos reconocidos por Linfocitos T Citotóxicos

Actualmente se considera que los linfocitos T son las células más importantes en el desarrollo de respuestas inmunes específicas contra tumores malignos ^{34,58,65,66}.

Gran parte de la información que favorece la actividad de LTC como el mecanismo principal en la respuesta inmune contra tumores malignos ha sido obtenida a partir de modelos murinos^{51,52,67-69}. Dentro de esta serie de experimentos ocupan un lugar preponderante los experimentos de Boon y cols., quienes indujeron LTC específicos contra antígenos de superficie expresados por la línea P815 y una serie de mutantes incapaces de proliferar *in vivo* designadas genéricamente como tum- ⁶⁷⁻⁶⁹. El análisis genético reveló que las líneas celulares tum- expresaban antígenos específicos determinados por mutaciones puntuales⁶⁷⁻⁶⁹. Solo una de las líneas tum- debía su antigenicidad a la expresión de un gen sin alteraciones en la secuencia de nucleótidos⁶⁷⁻⁶⁹.

En humanos, utilizando una estrategia equivalente fue posible identificar cuatro Ag estables en la línea celular de melanoma MZ2-E codificados por el gen MAGE 1. Los determinantes antigénicos son péptidos de nueve aminoácidos codificados por el tercer exón del gen MAGE-1 y están restringidos por moléculas HLA-A1^{34,66,70,71} .

Así mismo, en tumores epidermoides de cabeza y cuello, se describió el antígeno SC-CHN que está restringido por moléculas HLA-A27². Estos antígenos son reconocidos únicamente a través de linfocitos T citotóxicos⁷³.

2. MELANOMA MALIGNO

2.1. Generalidades

El melanoma maligno es una neoplasia derivada de los melanocitos, principalmente cutánea, pero que puede aparecer en otros sitios del organismo, como mucosas y retina²⁵⁹. Este tumor es responsable del 90% de las muertes por cáncer cutáneo²⁵⁹.

Se calcula que cada año se presentan 70,000 casos nuevos de melanoma en el mundo, principalmente en individuos de tez blanca²⁶⁰. En Australia, el país con más casos de melanoma en el mundo, 40 de cada 100,000 individuos desarrollan este tumor²⁶¹. En Japón, por el contrario, <1 por 100,000 habitantes padece esta enfermedad²⁶⁰⁻²⁶³.

La etiología del melanoma es desconocida; sin embargo, la historia familiar de melanoma, la presencia de nevos displásicos, el color de la piel y la exposición solar prolongada son antecedentes importantes para el desarrollo de esta neoplasia^{263,264}.

El factor ambiental más importante para la aparición del melanoma es la radiación UV (280 a 320 nm) debido a su capacidad de inducir mutaciones en el genoma^{265,266}. El papel que la luz UV pudiera tener en la etiología del melanoma se fortalece por la observación de que individuos con *Xeroderma pigmentoso* tienen un riesgo 2000 veces mayor que el resto de la población general de desarrollar melanoma maligno y otras neoplasias cutáneas²⁶⁷.

Aunque no existe un patrón hereditario característico para el desarrollo de melanoma, se calcula que del 8 al 12 % de los individuos con esta neoplasia tienen historia familiar de melanoma²⁶⁸⁻²⁷⁰. En pacientes con nevo displásico el porcentaje de melanoma familiar es aún mayor, y la susceptibilidad es heredada en forma autosómica dominante²⁶⁴. En algunos individuos se han reportado alteraciones en el brazo corto del cromosoma 1²⁷⁰.

2.2. Características clínicas y factores pronósticos

Se han descrito cuatro variedades de melanoma maligno: a) de diseminación superficial, b) el léntigo maligno melanoma, c) el melanoma nodular y d) el melanoma acral lentiginoso²⁷¹.

La estadificación de esta neoplasia es importante para establecer el pronóstico y tratamiento. El sistema de estadificación más utilizado fue propuesto por la Sociedad Americana del Cáncer (Tabla 1a)²⁶³. Sin embargo, estos criterios de estadificación no incluyen a la profundidad de la lesión, que es fundamental para el pronóstico de la enfermedad (Breslow)²⁷². Recientemente, el Comité Conjunto Americano ha recomendado un sistema de estadificación más adecuado (Tabla 1b)^{262,263}.

Tabla 1a. Clasificación clínica de melanoma

Estadio	Localización
I	Piel
II	Metástasis Ganglionares
III	Metástasis Sistémicas

2.3. Histología

Los melanocitos son células dendríticas derivadas de la cresta neural que migran a la epidermis, tracto uveal, meninges y mucosas en el segundo mes de vida intrauterina^{273,274}. En la edad adulta la mayoría de los melanocitos se encuentran en la unión dermoepidérmica y en el ojo, aunque pueden encontrarse en otras regiones del cuerpo²⁷³. La concentración de melanocitos varía en diferentes regiones del cuerpo, siendo mayor en cara y genitales. Una función importante de los melanocitos es la síntesis de la melanina, la cual tiene un papel muy importante en la protección de la luz.

En condiciones normales los melanocitos establecen contactos con los queratinocitos, lo que permite la regulación de la proliferación y pigmentación a través de IL-1, IL-6, FNT_n y FCF^{274,275}.

El melanoma maligno se origina en la unión dermoepidérmica a partir de la cual puede crecer verticalmente o en forma radial y vertical²⁷⁸. Las células tumorales no tienen una morfología característica, en general son pleomórficas (fusiformes, epitelioides, células gigantes, multinucleares, etc²⁷⁶) y sólo muestran moderada actividad mitótica. La cantidad de melanina es variable y en algunos casos es necesario usar tinciones especiales para identificar el pigmento²⁷⁶⁻²⁷⁸.

Tabla 1b. Sistema de Clasificación del CCA

Estadio	TNM y nivel de invasión
I	T1(75mm, invasión a dermis) T 2 (0.76-1.5 mm, invasión a la interfase retículo papilar) NO,MO.
II	T3(a. 1.5-3mm; b, 3-4 mm, invasión a la dermis reticular), NO,MO.
III	T 4 (a. 4mm e invasión a tejido subcutáneo; satelitosis), NO,MO. Cualquier T, N1(metástasis en tránsito o regionales), N2 a. más de 3 metástasis ganglionares; b. metástasis en tránsito; c. a+b), MO.
IV	Cualquier T, cualquier N, M1 a. metástasis a piel, tejido subcutáneo ganglios; b. metástasis viscerales).

La cantidad de infiltrado linfocitario varía de tumor a tumor, siendo más abundante en tumores *in situ*. En melanomas avanzados, la infiltración linfoide disminuye considerablemente^{279,280}. En algunas ocasiones se han documentado en zonas de infiltrado inflamatorio intenso áreas de regresión tumoral^{262,263}.

Para el diagnóstico histológico son importantes los siguientes criterios: falta de cohesividad de las células névicas, núcleo y nucleolo prominente e invasión de la dermis^{262,263}.

2.4. Inmunología del Melanoma

a. Antígenos de melanoma

El melanoma maligno es una de las neoplasias humanas mejor caracterizadas desde el punto de vista inmunológico. Algunos de los antígenos presentes en este tumor han sido descritos previamente en el texto. Entre los antígenos importantes para el diagnóstico por inmunohistoquímica deben mencionarse en forma particular: la proteína S-100 y HMB-45²⁸¹.

b. Respuesta inmune en melanoma

El melanoma maligno es una de las pocas neoplasias en las cuales se ha identificado una respuesta inmune específica^{34,65,282,284,285}. Entre los diferentes elementos del sistema inmune involucrados en la respuesta contra el tumor deben mencionarse:

- i) Las células AN obtenidas de donadores sanos que muestran un incremento en la actividad lítica contra líneas de melanoma²⁹.
- ii) En diferentes estudios se ha demostrado actividad citotóxica a través de células CAAC contra líneas celulares de melanoma¹⁸⁰. El porcentaje de lisis es dependiente de la dosis de IL-2 utilizada para activar este tipo celular²⁸⁶.
- iii) El papel de los LTC ha quedado claramente demostrado con el aislamiento de clonas específicas, en particular contra células que expresan el antígeno MAGE^{34,65,284,285,287-289}.
- iv) Linfocitos T infiltrantes de tumores constituyen una población con mayor especificidad contra antígenos expresados por el tumor pero con una menor actividad lítica^{181,182}. Sin embargo, constituyen una población importante para el uso potencial en la inmunoterapia después de ser cultivadas en presencia de IL-2²⁸⁶.
- v) Inmunidad humoral: Se han identificado varios tipos de anticuerpos en el suero de pacientes de melanoma la relevancia como mecanismo antitumoral no es clara²⁸⁶.

2.5. Tratamiento

a. Manejo de la lesión primaria

La cirugía continúa siendo la mejor opción terapéutica para el manejo del melanoma maligno. La extensión de la resección dependen del tamaño y la profundidad del melanoma. Estas características también son tomadas en consideración para la realización o no de disección ganglionar regional²⁹⁰⁻²⁹³.

La radioterapia se ha utilizado en Europa para tratamiento de melanoma superficiales con dosis que frecuentemente exceden los 10,000 cGy²⁹⁴.

b. Manejo del melanoma maligno metastásico

En los pacientes con melanoma metastásico a ganglios linfáticos, además del tratamiento quirúrgico han sido incluidos diferentes terapias adyuvantes con el propósito de prevenir o retardar la posibilidad de recurrencia del tumor. Las estrategias empleadas han incluido: quimioterapia, inmunoterapia activa pero inespecífica (tratamiento con BCG, *C. parvum*, levamisol, y factor de transferencia), inmunoterapia activa específica (utilizando células de tumor autólogo y BCG) y vacunas^{290-301, 345-350}.

Las opciones terapéuticas incluyen:

- i) Cirugía, en lesiones cutáneas superficiales, metástasis cerebrales, o lesiones viscerales sintomáticas principalmente en pulmón^{262,263}.
- ii) Radioterapia, en lesiones cutáneas superficiales, metástasis cerebrales o en hueso^{262,263}.
- iii) Quimioterapia, es principalmente efectiva en metástasis en piel, tejido celular subcutáneo, ganglios linfáticos y pulmón, los esquemas utilizados incluyen agentes únicos tales como DTIC o combinaciones que incluyen Vinblastina^{262,263,300}.
- iv) Perfusión de agentes quimioterapéuticos en recurrencias en extremidades^{262,263}.

- v) Hipertérmia, se ha utilizado experimentalmente en metástasis hepáticas^{262,263}.
- vi) Tratamientos intralesionales con diferentes agentes algunos ejemplos incluyen BCG, derivados purificados de paredes bacterianas, citocinas recombinantes etc^{262,263}.
- vii) Inmunoterapia sistémica utilizando IL-2 y células CCAC, IFN α etc^{263,286,345-350}.

La sobrevida media en pacientes con melanoma metastásico es de 6 meses, por lo que el o los tratamientos instituidos se consideran paliativos ³⁰²⁻³⁰⁴.

Estos resultados obligan a instituir programas de detección de lesiones tempranas y son la razón de que el melanoma sea objeto de estudios con tratamientos experimentales.

La frecuencia de lesiones tempranas en el Instituto Nacional de Cancerología es menor al 1%, la mayor parte de los pacientes acuden con estadios clínicos II y III, razón por la que se han utilizado diferentes agentes en el manejo de la enfermedad sistémica como en terapia adyuvante en individuos de alto riesgo. El presente trabajo representa un análisis de algunos parámetros inmunológicos de la terapia adyuvante más utilizada en este Instituto en los últimos 20 años, el BCG en melanoma maligno.

IV. ANTECEDENTES DIRECTAMENTE RELACIONADOS CON EL PROYECTO

1. Modelo Experimental: LR.4

1. 1. Antecedentes

La línea celular H-2- LR.4, fue obtenida a partir del linfoma murino de células T L5178Y que fuera inducida por metilcolantreno en ratones DBA/2 (H-2^d). Esta variante celular es una mutante espontánea seleccionada mediante la exposición a concentraciones crecientes a 5-bromo-2'-deoxiuridina y es sensible a HAT²⁵⁶.

La caracterización genética de LR.4 mostró la ausencia de moléculas clase I y clase II del CPH en la superficie celular debido a la extensa metilación de las moléculas clase I, a mutaciones en los genes de B2m e IAB, y a la ausencia de transcritos para IE_n β²⁵⁷. Estas alteraciones son probablemente en parte responsables de la falta de reconocimiento de estas células por el sistema inmune de animales con diferentes haplotipos: H-2^a (A/J), H-2^b (BALB.b), H-2^d (BALB/c) y H-2^k (C3H) en los cuales el tumor crece en la cavidad peritoneal y eventualmente mueren^{257,258}.

1.2. Respuesta de animales

A diferencia de los animales con haplotipos antes mencionados, los ratones C57BL/6J (H-2^b), rechazan LR.4 después de una fase inicial en la cual prolifera el tumor en cavidad peritoneal. La línea celular LR.4 alcanza un máximo crecimiento en los ratones C57BL/6J alrededor del día 20 después de haber sido inoculados con el tumor^{257,258}. El rechazo varía dependiendo de cada ratón; sin embargo, la mayor parte de los animales recuperan su peso alrededor del día 40 post inoculación. Es importante señalar que en ocasiones es posible obtener células viables de la cavidad peritoneal en ese momento.

El mecanismo de rechazo de este tumor esta mediado inmunologicamente, ya que al inocular células LR.4 viables en animales que han rechazado el tumor o en ratones C57BL/6J inmunizados con LR.4 tratada con MMC, no existe crecimiento tumoral. Así mismo, se ha observado que la capacidad de rechazo desaparece con el envejecimiento, ya que la inoculación de LR.4 a animales C57BL/6J no inmunes de 87 semanas permite el crecimiento del tumor e

Justificación

invariably mata a los animales en un periodo incluso menor que otros animales susceptibles²⁵⁷.

Debido a que la caracterización molecular inicial de LR.4 se realizó con células en cultivo, existía la posibilidad de que estas células al crecer en la cavidad peritoneal pudieran expresar moléculas de CPH y a través de este mecanismo presentar péptidos relevantes para ser reconocidas y rechazadas por CTL aún en ausencia de β_2m , como han demostrado otros autores⁸⁷. La posibilidad de que moléculas clase II pudieran presentar péptidos relevantes como se ha sido publicado en algunos modelos experimentales⁶⁻⁸, fue descartada debido a que los ratones H-2^b tienen una mutación en punto en el promotor de E β ²⁵⁷.

Estudios realizados previamente en este laboratorio han mostrado así mismo la presencia de títulos bajos de anticuerpos citotóxicos contra LR.4; sin embargo, debido a la importancia que las células citotóxicas tienen en el reconocimiento y destrucción de tumores decidimos explorar diferentes posibilidades a nivel de la inmunidad celular para tratar de entender el o los mecanismos involucrados en el rechazo de LR.4.

2. Uso de BCG en pacientes con Melanoma

2.1. Generalidades

La inmunoterapia en cáncer tiene como objetivo principal el lograr la destrucción tumoral a través de la modulación general de diferentes mecanismos inmunológicos o bien mediante citotoxicidad directa^{286,301,338}. La posibilidad de evaluar la repercusión de estas terapias en el sistema inmune en el humano resulta compleja ya que más de un tipo celular participa en la destrucción tumoral en respuesta a los diferentes agentes utilizados.

En el caso de agentes inmunomoduladores complejos, tales como el BCG, los blancos celulares pueden ser diversos y por lo tanto los mediadores liberados reflejan esta diversidad^{339,342}.

2.2. Bacilo de Calmette-Guerín (BCG)

Es una cepa de *M. bovis* aislada por Albert Calmette y Emile Guérin en 1928 que se ha usado en forma atenuada como vacuna contra la tuberculosis y en algunas otras enfermedades³⁰⁵. Esta cepa de bacterias ha sido distribuida a diferentes países y en consecuencia las condiciones de cultivo han variado, reflejándose en la virulencia y antigenicidad cuando se les compara con el original³⁰⁵.

En México, los microorganismos provienen de la cepa Danesa 1331, la cual es más virulenta que otras cepas disponibles en el mercado (i.e. Tice o la proveniente Instituto Pasteur). Cada ampollita consiente 2.5×10^6 bacilos vivos, lo que equivale a 5 mg de masa³⁰⁶.

El BCG fue una de las primeras terapias inmunes utilizadas; sin embargo, hasta la fecha se desconocen los mecanismos precisos que son responsables de los cambios en la respuesta inmune contra tumores³³⁹.

El uso del BCG se ha limitado progresivamente en distintos países a la administración local en cáncer de vejiga^{340,341}. En México, sin embargo, este complejo continua usándose en enfermos con melanoma maligno cutáneo. La aplicación intratumoral del BCG ocasiona la formación de granulomas y eliminación de las células neoplásicas en el sitio de aplicación como lo ha demostrado el análisis histopatológicas. Por el contrario, el uso sistémico del BCG para el tratamiento de

melanoma maligno es controvertido y con el advenimiento de algunas citocinas recombinantes, tales como IL-2 y el, IFN α , su uso se ha abandonado^{286,340}.

2.3 Experiencia en el Instituto Nacional de Cancerología

En el Instituto Nacional de Cancerología los resultados de un estudio de pacientes con melanoma maligno en estadios I, II o III (no seleccionados aleatoriamente), mostró aumento en la sobrevida y en el periodo libre de enfermedad en aquellos pacientes que recibieron BCG (Tablas 2 a y b, y [datos no publicados]).

Tabla 2a. Sobrevida a 5 años en pacientes que recibieron BCG como terapia adyuvante post quirúrgica, con diagnóstico de melanoma EC I

	BCG(+)	BCG(-)
Número	59	37
% Sobrevida (5 años)	96	42 *
% de recurrencia	15	45 **
PLE(m)	23	11 ***

El grupo control fueron pacientes con el mismo EC que no recibieron BCG, la selección no se realizó en forma aleatoria. *X² p < 0.001, t** p < 0.001 PLE. Periodo libre de enfermedad.

Las diferencias en la sobrevida observadas en este estudio se atribuyeron al tipo de BCG empleado, la dosis y la vía de administración.

En el presente estudio se decidió analizar algunos parámetros inmunológicos en pacientes con melanoma maligno estadio clínico II con o sin terapia adyuvante con BCG que pudieran explicar diferencias tan importantes con respecto a la literatura mundial³⁴⁰.

Tabla 2b. Sobrevida a 3 años en pacientes que recibieron BCG como terapia adyuvante post quirúrgica, con diagnóstico de melanoma EC II.

	BCG (+)	BCG (-)
Número	27	54
% Sobrevida (3 años)	78	29 *
% de recurrencias	56	77 **
PLE(m)	12	6 ***

El grupo control fueron pacientes con el mismo EC que no recibieron BCG, la selección no se realizó en forma aleatoria. * Log Rank $p < 0.01$, ** $X^2 p < 0.021$, *** $t p < 0.01$.

La respuesta clínica a la administración intradérmica del BCG en la mayor parte de los pacientes se puede resumir de la siguiente manera:

- 1º. Respuesta inmediata, caracterizada por la presencia de fiebre 24 o 48 hrs posterior a la vacunación que dura de 48 a 72 hrs.
- 2º. La respuesta tardía que aparece 2 a 3 semanas después a la aplicación del BCG. Los pacientes presentan nuevamente fiebre y en los sitios de aplicación del BCG existe inflamación y necrosis.
- 3º. La administración de nuevas dosis de BCG induce una respuesta inflamatoria en las aéreas que corresponden a los sitios de inyecciones previas.

En algunos pacientes estas respuestas no se presentan en las primeras aplicaciones del BCG, y en un número menor de pacientes no existen en ningún momento, lo que clínicamente se ha interpretado como un estado de inmunosupresión.

Se ha propuesto que la actividad antitumoral del BCG pudiera llevarse a cabo ser a través de dos mecanismos: la inducción de citotoxicidad mediada por macrófagos a través de CCDA y la liberación

de factores solubles, tales como el FNT α ^{213,219,229,231}. **In vitro** se ha demostrado la liberación de esta citocina por macrófagos activados por endotoxina o por BCG^{201,220}. **In vivo**, en diferentes patologías infecciosas y neoplásicas se han encontrado niveles séricos elevados de esta citocina^{220,226}.

En pacientes con cáncer el FNT α pudiera ser secretado tanto por las células neoplásicas como por las células del sistema inmune que infiltran el tumor^{220,224,226}.

V. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue documentar la eficiencia del sistema inmune en contra de diferentes líneas tumorales humanas y murinas, a través de diferentes estrategias *in vitro*.

El proyecto se divide en dos fases:

FASE I. Modelo experimental:

1. Establecer los principales mecanismos inmunes involucrados en el rechazo de un modelo murino tumoral.
 - 1.1 Caracterizar los diferentes mecanismos inmunes celulares en contra de la línea tumoral murina LR.4.
 - 1.2 Investigar el papel de las moléculas clase I o clase II del CPH en la susceptibilidad a LTC, células AN y células CAAC en un modelo experimental de origen murino.

FASE II. Modelo humano:

1. Los conocimientos obtenidos del modelo murino se utilizaron para plantear una estrategia en el estudio del sistema inmune humano en pacientes con melanoma recibiendo terapia *ad y u v a n t e* con BCG.

MATERIALES Y METODOS

1. Pacientes con Melanoma

1. 1. Selección de Pacientes

Se incluyeron en el estudio 20 pacientes con diagnóstico de melanoma maligno cuyas características se resumen en la Tabla 3 Como controles se estudiaron 10 enfermas con cáncer de la mama y 10 individuos sanos.

1.2 . Tratamiento con BCG

Los pacientes con diagnóstico clínico e histológico de melanoma maligno con ganglios linfáticos clínicamente positivos fueron distribuidos al azar mediante sorteo para recibir o no BCG.

Aquellos pacientes que resultaron elegidos (n=10) recibieron la primera dosis de BCG (Una ampolleta con 2.5×10^6 bacilos vivos) dos semanas después del tratamiento quirúrgico y de la confirmación histológica de metástasis en ganglios linfáticos. La administración de BCG fue por vía intradérmica y equivalió a 50 dosis, distribuidas en 4 puntos, en el tercio superior de la pierna o en regiones interescapulo-vertebrales. Es importante mencionar que los sitios de administración eran lejanos al sitio de la disección ganglionar. La periodicidad con la que el BCG fue administrado a los enfermos fue de acuerdo al siguiente esquema: 1a (día 0), 2a (día 15), 3a, 4a y 5a (días 30, 60 y 90).

Antes de cada aplicación de BCG se colectaron 20 cc de sangre en tubos heparinizados y 5cc de sangre sin anticoagulante para obtener suero. La sangre heparinizada se proceso el mismo día para el ensayo de células AN y marcadores de superficie. Los sueros se almacenaron a -20°C para determinar los niveles de FNT_n . Las muestras de sangre tomadas antes de la primera administración del BCG correspondieron al día 0.

Tabla 3. Selección de pacientes

	Pacientes + BCG	Pacientes - BCG
Edad (años)		
Promedio	47.9	50.6
Rango	29-60	28- 86
Sexo (%)		
Masculino	70	30
Femenino	20	80
Localización del tumor (%)		
Cabeza y cuello	10	0
Tronco	20	20
Extremidades:		
Superiores	20	30
Inferiores	40	40
Mucosas	10	10
Ulceración(%)	55	45
Tratamiento quirúrgico (%):		
Escisión amplia	100	100
Diseccción ganglionar	100	100

2. Animales.

Se utilizaron ratones de la siguientes cepas: BALB/c (H-2^d), BALB.b y C57BL/6J (H-2^b) de ocho a doce semanas. Para algunos experimentos se utilizaron hembras C57BL/6J de 87 a 95 semanas.

3. Protocolo de inmunización para la Obtención de Antisueros

Grupos de ratones C57BL/6J jóvenes fueron inmunizados semanalmente por cinco semanas con 1×10^6 de los diferentes tipos celulares o bazos tratados con MMC (anti H-2^d o anti LR.4) de acuerdo a

protocolo antes descrito^{256,257}. Los animales fueron sangrados del corazón una semana después de la última inmunización. El título de anticuerpos fue determinado por inmunofluorescencia de acuerdo a protocolo que se describe mas adelante. Los sueros fueron almacenados a -20°C.

4. Determinación de Ag de Superficie por Inmunofluorescencia Indirecta

Para la evaluación de antígenos de superficie se incubaron 1×10^6 células humanas o de ratón con $100 \mu\text{l}$ del anticuerpo en estudio²⁵⁷:

(a) Para los ensayos en humanos se utilizaron células mononucleares y se evaluaron con los siguientes anticuerpos: αCD16 , αCD4 , y αCD8 .

(b) Las células de ratón analizadas incluyeron: células mononucleares de C57BL/6J de 8 a 12 semanas, C57BL/6J de 87 semanas y las diferentes líneas tumorales (LR.4, L5178Y, EL4.4, L929, Yac-1, 745, 5ab1, L929).

Los anticuerpos empleados incluyeron: αCD4 , αCD8 y αCD25 . En algunos experimentos se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti LR.4 (inducido con LR.4 tratada con MMC y por CR), anti timo de BALB.b y anti H-2 d.

Después de la incubación durante 1 hr en hielo, las muestras se lavaron con PBS-BSA y se incubaron durante 1 hr más con el anticuerpo fluoresceinado. Las muestras se analizaron al microscopio y mediante citometría,

El análisis de las muestras se realizó en un citómetro marca Coulter EPICS-PROFILE II.

Los resultados se obtuvieron mediante un programa y fueron registrados en forma de histogramas. En el eje de las X se grafica la intensidad de la fluorescencia en unidades en una escala logarítmica (10⁻¹, 10¹, 10², 10³), y en el eje de las Y el número de células.

5. Inmunoensayo para la Determinación de FNT α

Se utilizó un ELISA comercial (Dupont, EUA). El ensayo consistió en analizar $100 \mu\text{l}$ del suero de los pacientes en los diferentes días de la

aplicación del BCG. Como control se analizaron diferentes diluciones de FNT α recombinante (0 a 1000 pg/ml). Las muestras y controles se incubaron por 18 hrs a 4°C. Posteriormente se añadieron el anticuerpo y el conjugado incubándose 1 hr a temperatura ambiente, la reacción fue detenida con una solución "stop" provista por el juego de reactivos y leída a 490nm. Las diluciones del FNT α se utilizaron para elaborar una curva en la se extrapolaron las lecturas de las diferentes muestras para calcular la concentración en pg/ml.

6. Cultivos Celulares

Las líneas celulares tumorales se propagaron *in vitro* en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ y a 37°C en medio de cultivo RPMI1640 (Gibco/BRL) suplementado. La viabilidad celular se determinó por exclusión del colorante azul tripano.

7. Líneas Celulares

Las características generales se describen en las tablas 4a y 4b^{256,257,308,309}.

Tabla 4a. Líneas Celulares Humanas

Línea	No. ATCC	Tipo celular	Origen
K562	CCL 243	LMC	DP
SK-MEL-3	HTB 69	Melanoma	MetGL
A-375	CRI	Melanoma	PCut
BP-1*	-	Melanoma	PCut

Tabla 4b. Líneas Celulares Murinas

Línea	Haplotipo	Cepa	Origen	Estirpe
L5178Y	H-2 ^d	DBA/2	MC	T
LR.4	H-2 ^c	DBA/2	MC	T
EL4.4	H-2 ^b	C57BL/6J	DMB	T
Yac-1	H-2 ^a	A/Sn	MMLV	T
L929	H-2 ^k	AKR	ER	F
745	H-2 ^d	DBA/2	VF	T
5ab.1	H-2 ^b	C57BL/6J		MEL

8. Muestras de Tejidos Humanos

La obtención de líneas celulares autólogas de los pacientes fue difícil. Algunas de las razones fueron: (a) dificultad para obtener muestras estériles ya que los tumores se encontraban frecuentemente ulcerados, (b) dificultad para mantener los cultivos viables y (c) falta de muestra.

Las muestras de melanoma, fueron disgregadas mecánicamente, lavadas y digeridas de 2 a 4 hrs con una solución de DNasa (1mg/ml) y colagenasa (1mg/ml). Las células obtenidas mediante este método fueron cultivadas y utilizadas cuando fue posible en ensayos de citotoxicidad como células blanco.

Se obtuvieron 3 líneas celulares las cuales se denominaron: BP-1, M-muc (obtenido de melanoma de mucosas, paciente 4) y M-Bra (obtenido de la metástasis cerebral del paciente 5). Debido a las características de los cultivos la única línea de crecimiento rápido fue BP-1, por lo que solamente estas células se utilizaron como blanco para los ensayos de citotoxicidad por célula AN.

El análisis de esta línea mostró el siguiente haplotipo del HLA: A28-A19, B22-B35, Cw4-Cw6, DR8-DR5, DQw4-DQ7, DRw52.

Así como un cariotipo: 46, XX,17q-

9. Separación de Células Mononucleares

9.1. Separación de células circulantes humanas

Se diluyó la sangre heparinizada en dos volúmenes de PBS, y posteriormente 35 ml se colocaron sobre 15 ml de F/R. El gradiente se centrifugó durante 30 minutos a 1200K, después de lo cual se separó la capa de células mononucleares y se lavaron 3 veces con PBS para posteriormente determinar la viabilidad y número³¹⁰.

9.2. Separación a partir de bazo murinos

Los bazo de los diferentes ratones utilizados fueron disgregados y las células mononucleares se obtuvieron mediante gradiente de F/R o bien, lisando los eritrocitos con amortiguador de ACK³¹¹.

10. Tratamiento con Mitomicina C

El tratamiento consistió en incubar 4×10^6 células durante 1 hr con $25 \mu\text{g/ml}$ de MMC (Sigma) protegidas de la luz. Las células fueron lavadas 3 veces, determinada la viabilidad y ajustando el número celular a 5×10^5 células/ml para ser utilizadas en el cultivo mixto de linfocitos o bien 1×10^6 para los protocolos de inmunización³¹².

11. Cultivo Mixto de Linfocitos

Se indujeron linfocitos T citotóxicos mediante el co-cultivo de células mononucleares del bazo de ratones C57BL/6J con las células estimuladoras apropiadas, previamente tratadas con MC, en una proporción de 2:1. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C durante 5 días²⁵⁷.

12. Marcaje de Células Blanco con Cr⁵¹

Para los ensayos de citotoxicidad se incubaron 1×10^6 células blanco con $300 \mu\text{Ci}$ de Cr⁵¹ en $700 \mu\text{l}$ de SBF durante 1 hr a 37°C . El isótopo no incorporado fue lavado y el número de celular se ajustó a 1×10^5 células ml²⁵⁷.

13. Evaluación de Células Citotóxicas

13.1. Actividad Lítica de Linfocitos T Citotóxicos

Cien microlitros de las diferentes proporciones de células efectoras (10×10^6 , 5×10^6 y 2×10^6 células/ml) fueron incubadas con $100 \mu\text{l}$ de las células blanco marcadas con Cr^{51} e incubadas durante 4 hrs a 37°C . Las condiciones de liberación máxima y espontánea se obtuvieron al incubar las células blanco con $100 \mu\text{l}$ de solución al 20% de tritón X100 o con medio de cultivo³¹³.

La radiactividad del sobrenadante (en $100 \mu\text{l}$) de la muestra se midió en un contador Auto Gama (Packard 5650).

Los resultados se expresaron de acuerdo a la ecuación:

$$\% \text{ Liberación de } \text{Cr}^{51} = (\text{LM}-\text{LE}/\text{LT}-\text{LE})/100$$

En donde: LE = liberación espontánea, LM = liberación de la muestra y LT = Liberación total.

Para investigar la presencia de antígenos asociados a tumores en las líneas celulares L5178Y y LR.4 se utilizaron los siguientes grupos de animales C57BL/6J para inducir LTC: a) ratones vírgenes; b) ratones creciendo LR.4 en la cavidad peritoneal (día 20); c) ratones que habían rechazado el tumor (día 40); d) animales inmunizados con LR.4 tratada con MMC y e) ratones inmunizados con L5178Y. Los bazo de cada grupo fueron estimulados con L5178Y o con LR.4 tratadas con MMC y se ensayaron contra las mismas líneas tumorales en experimentos paralelos.

Linfocitos T citotóxicos alogénicos se utilizaron como controles. Estas células efectoras se indujeron utilizando combinaciones apropiadas de células mononucleares de bazo: C57BL/6J vs BALB/c (anti-H-2^d). La posibilidad de que el rechazo se llevara a cabo a través de antígenos menores se exploró utilizando como células estimuladoras bazo de ratones BALB.b. La línea celular L5178Y fue usada como blanco control de los LTC anti-H-2^d. Otro grupo de animales estuvo constituido por ratonas sanas de 87 semanas.

De cada grupo de animales se realizaron tres o más ensayos. Los resultados representan el promedio de estos.

13.2. Citotoxicidad por Células Asesinas Naturales

13.2.1. En humanos

Las células mononucleares se ajustaron a las concentraciones antes descritas y se co-cultivaron durante 4 hrs con las líneas tumorales K562, SKMEL-3, A-375 y BP-1; el procedimiento para obtener el porcentaje de lisis fue el mismo que el utilizado para LTC³¹⁴.

13.2.2. En ratón

Se utilizaron células mononucleares de bazo de los siguientes grupos de animales: a) los niveles basales de actividad por AN se determinó con ratones C57BL/6J no inmunes; b) ratones que crecieron y rechazaron LR.4; c) animales inmunizados con células de LR.4 tratados con MMC y d) ratones tratados con 100µg de poli(I:C) (Sigma) 24 hrs previas al ensayo.

Las células mononucleares se cultivaron en las proporciones descritas anteriormente con Yac-1 y LR.4 marcadas con Cr⁵¹ y el porcentaje de lisis se calculó de la manera antes descrita.

Otro grupo de animales estuvo constituido por ratonas sanas de 87 semanas.

De cada grupo de animales se realizaron tres o más ensayos. Los resultados representan el promedio de estos.

13.3. Inducción de Células CAAC

El protocolo utilizado en estos experimentos fue una modificación del descrito por Mulé y Rosenberg³¹⁵. Un millón de células mononucleares de bazo de ratones C57BL/6J jóvenes se incubaron en medio RPMI que contenía 250 U de IL-2r (Boehringer Mannheim Biochemica, Alemania) y fueron incubadas durante 3 días. Antes de utilizarlas en ensayos de citotoxicidad, las células fueron lavadas, la concentración celular ajustada a 1×10^5 y se ensayaron contra Yac-1, LR.4 y L5178Y.

Otro grupo de animales estuvo constituido por ratonas sanas de 87 semanas.

De cada grupo de animales se realizaron tres o más

ensayos. Los resultados representan el promedio de estos.

13.4. Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos

Las células blanco marcadas con Cr⁵¹ se incubaron durante 1 hr. con 100µl de la dilución apropiada del anticuerpo anti LR.4 o bien anti H-2^d (1:10)(modificado de Alfaro et al. 1992²⁵⁷).

Las células efectoras fueron obtenidas de bazos de C57BL/6J +/- 200µg de poli I:C i.p (Sigma Chemiclas, EUA).El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito previamente.

**De cada grupo de animales se realizaron dos ensayos.
Los resultados representan el promedio de estos.**

RESULTADOS Y DISCUSION

Mecanismos de rechazo de la línea tumoral LR.4 por ratones C57BL/6J

Las moléculas clase I del CPH tienen un importante papel en la presentación de antígenos a LTC, los cuales representan el mecanismo principal del rechazo a tumores²⁰. La ausencia de moléculas del CPH en la superficie celular constituye, por lo tanto, una de las estrategias utilizadas por las células tumorales para evadir la vigilancia inmunológica²⁵⁷, hecho que posiblemente es responsable del crecimiento de LR.4 a través de barreras alógenas, ocasionando eventualmente la muerte de los animales que expresan uno de los distintos haplotipos estudiados hasta la fecha²⁵⁷.

Sin embargo, como ya se ha mencionado, el tumor crece en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6J pero es rechazado en >95% de los animales. Parte del trabajo que se presenta en esta tesis está orientado a estudiar el o los mecanismos inmunológicos responsables del rechazo de LR.4 por esta estirpe de ratones.

Es importante mencionar que aún cuando es posible inducir anticuerpos circulantes mediante la inmunización de ratones C57BL/6J con células LR.4 tratadas con MMC, los títulos son por lo general, bajos²⁵⁷.

La estrategia experimental para la evaluación de los mecanismos involucrados en el rechazo de la línea LR.4 por ratones C57BL/6J consistió en explorar la participación de diferentes células citotóxicas: (a) los linfocitos T citotóxicos estimulados con LR.4, la línea parental L5178Y, antígenos mayores (anti H-2^d) y antígenos menores; (b) debido a la ausencia de moléculas clase I y clase II, también se decidió estudiar la participación de células AN en condiciones basales o de estimulación *in vivo* o *in vitro* (células CAAC) y (c) se estudió la participación de inmunoglobulinas en el reconocimiento de LR.4 y su capacidad para inducir CCDA.

I. Actividad de linfocitos T citotóxicos en ratones C57BL/6J

1. LTC anti LR.4

En esta serie de experimentos se exploró la posibilidad de que células mononucleares de bazo de diferentes grupos de animales, estimuladas con LR.4 en cultivo o crecidas *in vivo*, pudieran tener actividad lítica contra ella, y contra de la línea parental L5178Y. La Figura 12 muestra los resultados promedio de los diferentes ensayos. La actividad de LTC en contra de L5178Y es mínima y no existe en contra de LR.4. La interpretación de estos hallazgos es sencilla, LR.4 es H-2- y por lo tanto no presenta antígenos siendo LTC resistente. Existen otros ejemplos en la literatura en donde defectos en la presentación de péptidos por alteraciones en el ensamble de moléculas del CPH o en los transportadores de péptidos ocasionan la ausencia de reconocimiento por LTC 16,17,109,110,257,318.

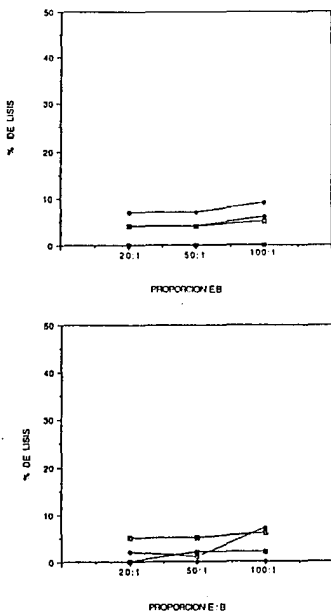


Fig. 12. Citotoxicidad por LTC inducidos *in vitro* vs LR.4. Las células efectoras fueron obtenidas del bazo de ratones C57BL/6J y posteriormente estimuladas con la línea celular LR.4 tratada con MMC. Las células blanco fueron: (a) L5178Y. (□) B6 vírgenes, (◆) B6 inmunizados con LR.4 MMC, (■) B6 con tumor, (◇) B6 40 días post-rechazo y (b) LR.4, (□) B6 vírgenes, (◆) B6 inmunizados con LR.4 MMC, (■) B6 con tumor, (◇) B6 40 días post-rechazo.

2. LTC anti L5178Y

La observación *in vitro* de un incremento en la lisis en contra de la línea parental L5178Y en ratones inmunizados con LR.4 sugirió la presencia de péptidos compartidos por ambos tipos celulares. En el siguiente grupo de experimentos se planeó utilizar L5178Y como célula estimuladora en los CML con el propósito de inducir LTC específicos como ha sido descrito por otros grupos^{319, 320}.

Como se observa en la Figura 13, la actividad lítica inducida por L5178Y en ratones vírgenes fue discreta, sin embargo, células de bazo de ratones inmunes contra L5178Y o LR.4 mostraron un incremento notable. Un hallazgo importante fue que la presencia de tumor *i.p.* indujo un estado de inmunosupresión transitorio, ya que en animales que habían rechazado LR.4 se restableció en parte la función lítica³²¹.

Los resultados obtenidos en ratones inmunes sugieren que LR.4 y L5178Y probablemente expresen determinantes antigénicos equivalentes que no son expresados por LR.4. Estos antígenos serían responsables de la activación de LTC *in vivo* a través de otras células presentadoras de antígenos.

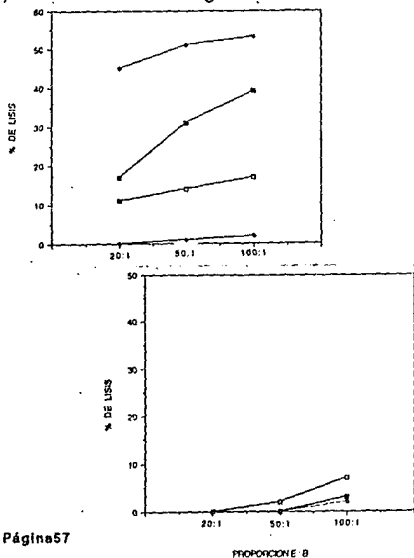


Fig. 13. Citotoxicidad por LTC inducidos *in vitro* con L5178Y. El método experimental fue similar al descrito en la Figura 12. Las células estimuladoras fueron L5178Y y las células blanco fueron: (a) L5178Y, (□) B6 virgines, (◆) B6 inmunizados con LR.4 MMC, (■) B6 inmunizados con L5178Y MMC, (◇) B6 TIP; y (b) LR.4, (□) B6 virgines, (◆) B6 inmunizados con LR.4 MMC, (■) B6 inmunizados con L5178Y MMC, (◇) B6 TIP

3. LTC anti antígenos menores y antígenos mayores

La posibilidad de que algunas de las células LR.4 expresaran productos del CPH y determinantes antigénicos no relacionados con moléculas de clase I o clase II (antígenos menores) fue estudiada en ensayos de citotoxicidad similares a los descritos en las secciones anteriores. Linfocitos T citotóxicos específicos contra el haplotipo H-2^d o contra antígenos menores fueron inducidos en cocultivos de células de bazo de ratones C57BL/6J con células de bazo de ratones BALB/c (H-2^d) o con células T del timo de ratones BALB.b (H-2^b) tratadas con MMC.

Las Figuras 14a y b muestran que los LTC inducidos de acuerdo a estos protocolos no tenían actividad lítica contra LR.4 y sí contra la línea parental L5178Y. Una vez más se detectó un periodo de inmunosupresión transitoria en ratones con LR.4 i.p. (Figura 14b).

Es importante mencionar, sin embargo, que la inmunización de ratones C57BL/6J con timos de BALB.b protegió a los ratones, evitando el crecimiento de células LR.4 (datos no mostrados). Las diferencias de los hallazgos obtenidos *in vivo* o *in vitro* podría sugerir que el o los antígenos no corresponden a antígenos menores, ya que estos son presentados por moléculas clase II del MHC^{323,324}. Es posible que se trate de antígenos de superficie compartidos entre LR.4 y células T presentes en el timo de animales BALB.b.

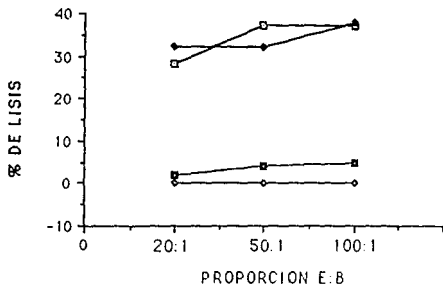
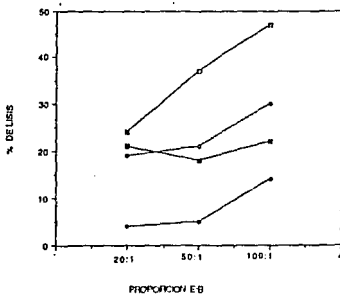
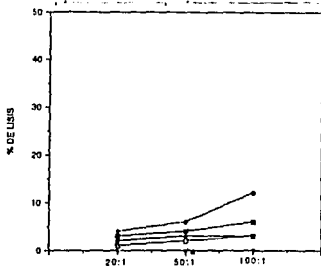


Fig. 14 (a) Citotoxicidad por LTC inducidos in vitro en células B6 con antígenos menores. Las gráficas muestran la susceptibilidad de las líneas LR.4 y L5178Y a ser lisadas por LTC inducidos en diferentes grupos de ratones C57BL/6J con células de bazo de ratones BALB.b. (□) B6 virgines vs. L5178Y, (◆) B6 inmunizados con células T del timo de ratones BALB.b vs L5178Y, (◇) B6 virgines vs LR.4 y (■) B6 Inmunizados con células T del timo de ratones BALB.b vs LR.4.



(b) Citotoxicidad por LTC anti H-2^d. Las gráficas muestran la susceptibilidad de las líneas L5178Y y LR.4 a ser lisadas por LTC inducidos en diferentes grupos de C57BL/6J en CML contra células del bazo de ratones BALB/c. L5178Y: (□) B6 virgines, (■) B6 crónicos, (◇) B6 40 días post rechazo de LR.4, (◆) B6 con tumor i.p. LR.4: (□) B6 virgines, (◇) B6 crónicos, (■) B6 con tumor i.p.



4. Actividad citotóxica por células AN y CAAC.

Los LTC son las células primordialmente involucradas en el rechazo de tumores²⁰; sin embargo, otros tipos celulares pudieran intervenir en el reconocimiento y destrucción de LR.4^{10,22,23}. El papel que las células AN tienen en la inmunología tumoral es controvertido¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Existe evidencia en ciertos modelos animales de la importancia de estas células en el rechazo a tumores¹⁶⁶⁻¹⁶⁸, principalmente en células que no expresan moléculas de CPH²⁷.

Dado que las células LR.4 no expresan moléculas clase I o clase II, se investigó la posibilidad de que las células AN mediaran el rechazo de LR.4. La Figura 15 muestra los resultados de estos ensayos en diferentes condiciones *in vitro* e *in vivo*. La actividad de células AN basal en ratones C57BL/6J en contra de la línea Yac-1 es menor al 20%. Existe, sin embargo, un incremento discreto contra el blanco convencional al inmunizar a los animales y uno significativo al administrar poli (I:C) *i.p* 18 hrs. antes del ensayo. En ninguno de los casos se detectó actividad lítica por parte de células AN en los diferentes grupos de animales analizados en contra de LR.4. Es importante mencionar que la línea LR.4 es resistente también a la actividad lítica por células CAAC (datos no mostrados).

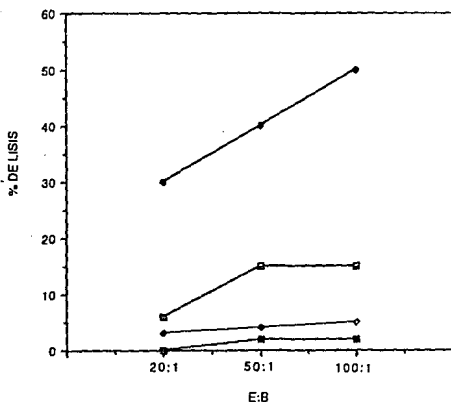


Fig. 15. Susceptibilidad de las líneas celulares Yac-1 y LR.4 a la lisis por células AN. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando células mononucleares obtenidas de diferentes grupos de C57BL/6J (ver texto). La gráfica muestra los resultados de la lisis vs Yac-1: (□) B6 vírgenes, (◆) B6 + poli(I:C); vs. LR.4 (■) B6 vírgenes, (◇) B6 + poli (I:C)

II. Respuesta humoral de ratones C57BL/6J contra la línea celular LR.4

Análisis de la especificidad de los antisueros anti H-2^d y anti LR.4 inducidos en ratones C57BL/6J.

Experimentos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que los ratones C57BL/6J eran capaces de producir anticuerpos específicos en contra de las células LR.4²⁵⁷. Como una extensión de ese trabajo se decidió profundizar en el estudio del papel que desempeñan en el reconocimiento y control del tumor.

Los antisueros anti H-2^d y anti LR.4 fueron inducidos en ratones C57BL/6J con células tratadas con MMC de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. En todos los casos se usó suero normal de ratones C57BL/6J como control. La especificidad de los reactivos fue determinada con una colección de células pertenecientes a distintas vías de diferenciación.

En las Figuras 16a-c se muestran los resultados de los análisis hechos por citometría de flujo de antisueros anti H-2^d en contra de las líneas celulares LR.4 y L5178Y, y de antisueros anti LR.4 en contra de una colección de líneas celulares.

En la Figura 16a panel (a) se muestra la reactividad de anticuerpos anti H-2^d en contra de las células L5178Y y en el panel (b) se corrobora la falta de expresión de moléculas clase I por parte de la línea celular LR.4²⁵⁷. Es importante mencionar que esta variante tampoco expresó moléculas CD4, CD8 o CD25 (datos no mostrados).

Los antisueros anti LR.4 obtenidos mediante inmunización pasiva o de animales que habían rechazado el tumor reaccionaron con la línea celular en estudio Figura 16b (panel a). La especificidad del antisuero se ilustra en las Figuras 16b y 16c; en L5178Y, EL4.4 (Figura 16b, panel b y panel c), Yac-1 y 745 (Figura 16c panel a y panel b), el porcentaje de células positivas y la intensidad de la fluorescencia fue considerablemente menor que la obtenida para la línea celular LR.4, al igual que las líneas no linfoides L929 (fibroblastos) y 5ab.1 (melanoma) (Figura 16c, panel c y panel d).

Estos resultados pudieran interpretarse como la consecuencia de una reactividad cruzada entre diferentes antígenos o como evidencia de la existencia de un(os) antígeno(s) compartido(s).

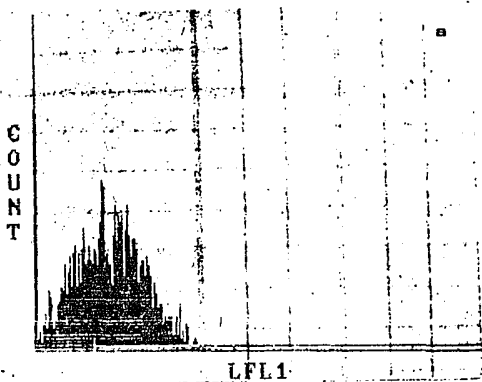
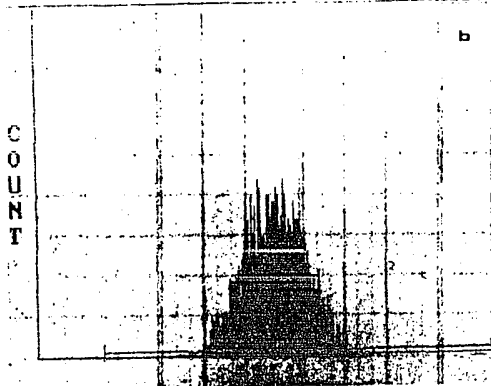
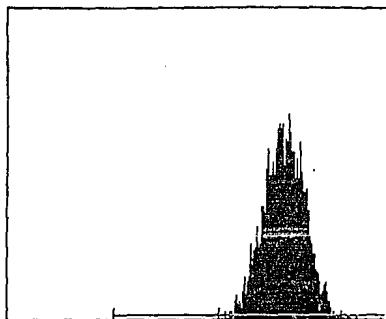
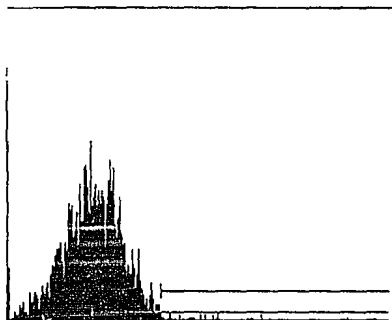


Fig 16a. Especificidad de los antisueros anti H-2^d
(a) LR.4, (b) L5178Y.

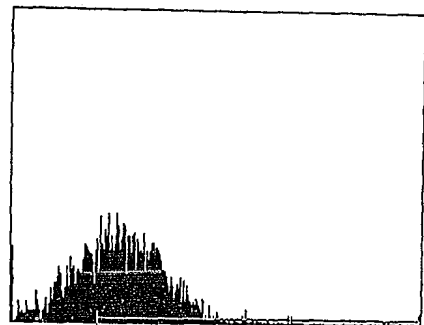




a



b



c

Fig16b. Especificidad de los antisueros anti LR.4 en contra de diferentes líneas celulares. (a) LR.4, (b) L5178Y y (c) EL4.4.

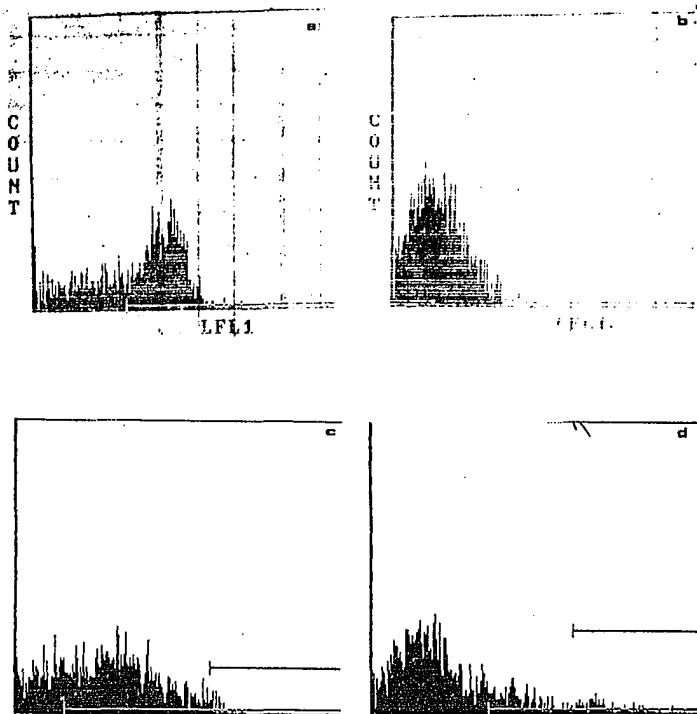


Fig 16 c. Especificidad de los antisueros anti LR.4 en contra de diferentes líneas celulares. (a) Yac-1, (b) 745 (c) L929 y (d) 5ab.1.

III. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)

Los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad sugirieron que las variedades de células efectoras estudiadas no son responsables del rechazo de LR.4.

Una alternativa podría estar determinada por anticuerpos y complemento como fue demostrado *in vitro* en experimentos hechos por Nava y cols²⁵⁷ o por la acción combinada de anticuerpos y células del sistema inmune (este estudio). Con estos antecedentes el siguiente grupo de experimentos consistió en ensayar la actividad de CCDA mediada por células AN.

Debido a que la actividad lítica basal de las células AN fue mínima, la estrategia experimental incluyó dos grupos de animales: ratones C57BL/6J vírgenes o tratados con poli (1:C) *i.p.* La Figura 17 muestra los resultados de estos experimentos. Se encontró actividad de CCDA en contra de Yac y LR.4, la cual fue proporcional al porcentaje de positividad con el antisuero (ver arriba). La adición de poli (1:C), resultó en un aumento en la lisis en contra de LR.4 y no modificó la susceptibilidad de LR.4.

Los resultados de estos experimentos explican, en parte, el hecho de que títulos bajos de anticuerpo participen en respuestas tan efectivas en el rechazo del tumor; sin embargo, no descartan otras posibilidades no exploradas en este trabajo, tales como aquellas mediadas por factores solubles (FNT α o β , IFNs o IL-2).

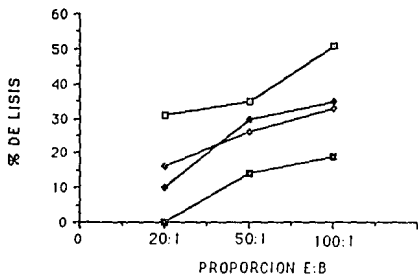


Fig. 17. Susceptibilidad de las líneas celulares Yac-1 y LR.4 a la lisis mediante CCDA. Los ensayos se realizaron utilizando células mononucleares de C57BL/6J +/- poli(I:C) vs las líneas celulares Yac-1 y LR.4 incubadas con antisuero anti LR.4. (■) B6 - poli(I:C) vs Yac-1, (□) B6 + poli(I:C) vs Yac-1, (◆) B6 - poli(I:C) vs LR.4, (◇) B6 + poli(I:C) vs LR.4.

IV. Evaluación de la respuesta inmune en ratonas C57BL/6J viejas.

Estudios en humanos y animales han mostrado alteraciones en inmunidad celular y humoral relacionadas con la senectud³²⁵⁻³²⁸. Este deterioro del sistema inmune se caracteriza por un incremento en la frecuencia de neoplasias, en la susceptibilidad a infecciones y en un aumento en las respuestas autoinmunes^{328,329,333}.

Los mecanismos responsables de las disfunciones inmunes no están relacionadas con el número total de linfocitos o con las proporciones de células CD4+/CD8+. Las alteraciones pudieran ser de tipo funcional a nivel de LTC^{325,335}, células AN^{331,332} o en la producción de citocinas³³⁶.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación habían demostrado una incapacidad de ratonas C57BL/6J viejas para rechazar a la línea celular LR.4 lo que se tradujo en una mortalidad del 100% de los animales estudiados en un tiempo menor que el detectado en cepas sensibles al tumor^{258,334}.

Debido a estas diferencias en la capacidad de rechazar LR.4, se decidió estudiar la proficiencia del sistema inmune en ratonas C57BL/6J de 87 semanas; como controles se usaron ratonas jóvenes.

1. Fenotipo de Linfocitos esplénicos

El primer experimento consistió en determinar si en las ratonas viejas, la proporción de linfocitos CD4+/CD8+ no estaba alterada con respecto a las ratonas jóvenes.

Las figuras 18 a-d muestran un ejemplo del análisis de estas poblaciones celulares.

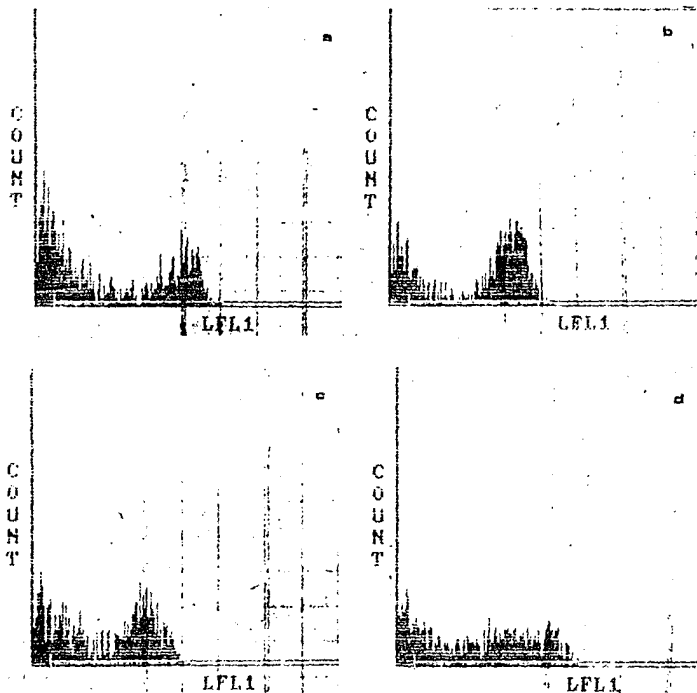


Figura 18. Inmunofenotipo de células mononucleares de bazo obtenidas de ratones de 8 y 87 semanas. (a) CD4⁺ en ratones de 8 semanas, (b) CD8⁺ en ratones de 8 semanas, (c) CD4⁺ en ratones de 87 semanas y (d) CD8⁺ En ratones de 87 semanas.

La tabla 5 muestra el promedio de cinco ensayos en los que se evaluaron las proporciones de linfocitos T CD4+/CD8+ y se observa que no existen diferencias significativas en los porcentajes de células positivas entre los dos grupos de animales analizados, lo cual confirma los datos publicados por otros autores³³⁵.

Tabla 5. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en ratonas de 8 y 87 semanas.

	CD4+(%)	CD8+(%)
Ratonas de 8 semanas	43	40
Ratonas de 87 semanas	41	41

2. Evaluación de la función citotóxica

El análisis actividad lítica de determinada por células del bazo obtenidas de animales viejos y controles jóvenes fue evaluada mediante: (a) LTC en contra de moléculas clase I del CPH (respuesta alogénica), (b) análisis de la actividad de células AN, y (c) por capacidad de inducir células CAAC.

2.1. Citotoxicidad por LTC

Se estudiaron respuestas alogénicas (anti H-2^d) en ratonas C57BL/6J de 87 semanas y en animales C57BL/6J jóvenes; el protocolo para el CML fue descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados de estos experimentos mostraron que las ratonas viejas tenían una actividad lítica menor que la detectada con células linfoides de animales jóvenes en contra de la línea celular L5178Y (Figura 19 a).

Al no existir disminución en el porcentaje de células CD8+, es posible que las diferencias entre estos grupos de animales pudieran estar determinadas a nivel funcional, posiblemente en la transducción de señales, tal y como ha sido demostrado en otros modelos experimentales^{325,331,332,335}.

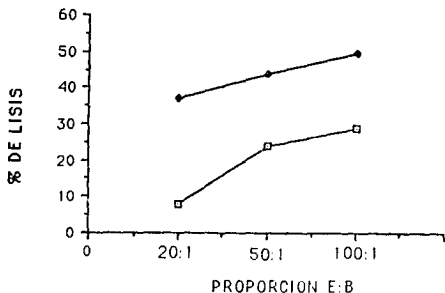


Figura 19 a. Evaluación comparativa de la función inmune citotóxica mediada por células en ratonas C57BL/6J de 8 y 87 semanas. Citotoxicidad por LTC anti H-2^d inducidos in vitro contra la línea celular L5178Y: (•) B6 de 8 semanas, (◻) B6 de 87 semanas.

2.2. Citotoxicidad por Células AN

Como ya se ha mencionado, la actividad lítica de células AN es baja en condiciones basales, en animales C57BL/6J jóvenes; sin embargo, en animales viejos se detectó una actividad aún menor en contra del blanco convencional, Yac-1, Figura 19 b. En estos experimentos no se determinó con anticuerpos específicos si existía una disminución en el número de células AN, pero los resultados coinciden con las observaciones hechas por otros grupos de trabajo que han demostrado alteraciones posteriores a la unión con sus blancos^{331,332}.

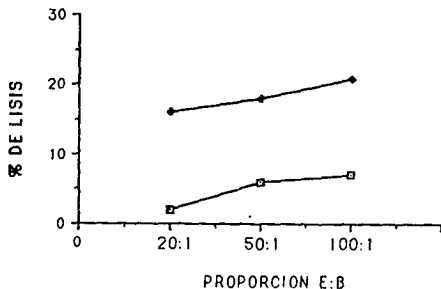


Figura 19 b. Evaluación comparativa de la función inmune citotóxica mediada por células en ratonas C57BL/6J de 8 y 87 semanas. Susceptibilidad de la línea celular Yac-1 a la lisis por células AN. Los ensayos se realizaron utilizando (•) B6 de 8 semanas y (◻) B6 de 87 semanas.

2.3. Citotoxicidad por Células CAAC

La incubación de células del bazo con IL-2 por tres días reveló al microscopio una mayor cantidad de blastos en las muestras obtenidas de ratonas viejas (resultados no presentados).

Es importante mencionar que la proporción de células CD4+/CD8+ se mantuvo constante y que no hubo cambios en la expresión de CD25 en los dos grupos de animales estudiados. Finalmente, no hubo diferencia en la actividad mediada por células CAAC en animales viejos vs jóvenes (Figura 19 c). Estos datos están de acuerdo con los publicados por otros grupos de trabajo^{325,337}.

Debe enfatizarse que el estadio de inmunosupresión que caracterizó a este grupo de animales viejos se asoció con una mayor frecuencia de infecciones, principalmente cutáneas y en algunos casos con la aparición de linfomas.

Las alteraciones detectadas en este grupo de experimentos no explican satisfactoriamente la incapacidad de los animales viejos para rechazar a las células LR.4, ya que los resultados obtenidos en otros experimentos demostraron que los LTC y las células AN no tienen un papel importante en la lisis de LR.4 *in vitro* en animales jóvenes.

Una explicación posible sería que los linfocitos T pudieran ser "ineficientes" en la secreción de factores solubles, tales como IL-4, IL-5 o IL-6 que son necesarios para la producción y cambio de clase de Ig³³⁶, y cuya importancia en la lisis de este tumor ha sido demostrada anteriormente en animales jóvenes. Experimentos equivalentes con animales viejos no fueron llevados debido a limitaciones en el número de animales.

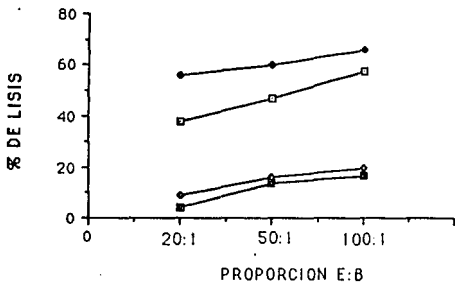


Figura 19 c. Evaluación comparativa de la función inmune citotóxica mediada por células en ratonas C57BL/6J de 8 y 87 semanas. Susceptibilidad de las líneas Yac-1 y L5178Y a la lisis por células LAK. (●) B6 de 8 semanas vs Yac-1, (○) B6 de 8 semanas vs L5178Y, (◐) B6 de 87 semanas vs Yac-1 y (◑) B6 de 87 semanas vs. L5178Y.

Efecto del BCG en la respuesta inmune de enfermos con melanoma.

*Perpetuar las cosas produce siempre menos dolor que querer cambiarlos.
Gisèle Halimi... La causa de las mujeres*

Las limitaciones propias de la cirugía, de la radioterapia y de la quimioterapia para el tratamiento de los tumores malignos en el hombre ha motivado la búsqueda de modalidades terapéuticas alternativas. La inmunoterapia constituye una de estas modalidades, en la cual el sistema inmunológico del paciente es manipulado con la finalidad de provocar una reacción contra el tumor. Para lograr este objetivo es inherente asumir la existencia de diferencias entre el tumor y los tejidos normales, susceptibles de ser reconocidas por parte del sistema inmune.

Los estudios en inmunología tumoral han intentado mostrar la producción espontánea de reacciones inmunológicas específicas dirigidas contra tumores autólogos tanto en modelos animales como humanos, para seguidamente amplificar este tipo de reacciones con el propósito de obtener un beneficio terapéutico.

El análisis de los mecanismos inmunes involucrados en la destrucción de tumores ha resultado altamente complejo y los resultados difíciles de interpretar en ocasiones. Como es el caso del uso de inmunomoduladores complejos, tales como el BCG.

El BCG fue una de las primeras terapias inmunes utilizadas; sin embargo, hasta la fecha se desconocen los mecanismos precisos que son responsables de la respuesta contra tumores³³⁹. Los posibles mecanismos involucrados en la actividad tumoral del BCG se proponen: (1) la inducción de mecanismos citotóxicos mediados por anticuerpos, y (2) la secreción de algunas citocinas por macrófagos, probablemente $\text{FNT}\alpha$ ^{213,219,229,231}.

1. Determinación de niveles séricos de Factor de Necrosis Tumoral

La actividad antitumoral del $\text{FNT}\alpha$ ha sido documentada por diferentes investigadores^{213,219,229,231}, sin embargo, en pacientes con cáncer, el $\text{FNT}\alpha$ también puede ser secretado por las células tumorales^{220,224,226}. En este estudio la presencia de niveles elevados de

FNT α en individuos con tumor fue una dato casi constante, al compararlo con individuos sin tumor (Tabla 6) o individuos sanos (datos no mostrados).

En la Tabla 6 se puede observar que 9 de los 10 casos de individuos con tumor (Grupo I) presentan elevación de FNT α . Debe enfatizarse que no existió una correlación entre el nivel de la citocina y el tamaño o la extensión del tumor; tampoco la sobrevida se vió afectada por la elevación inicial de esta citocina. Cabe mencionar que en el Instituto Nacional de Cancerología la mayor parte de los pacientes se presentan por primera vez a la consulta con lesiones grandes, ulceradas y en ocasiones infectadas, por lo que no es posible precisar si la elevación de la citocina es consecuencia del tumor, de la necrosis y ulceración concomitante en la lesión o de una combinación de estos factores.

A diferencia de los pacientes con tumor, los niveles de FNT α en individuos con melanoma tratados quirúrgicamente, sin datos clínicos de actividad tumoral (AT) (grupo II), fueron generalmente bajos. En uno de los casos (paciente 4), aún sin evidencia tumor, el nivel de FNT α fue equivalente al detectado en los enfermos del grupo I, lo que se debió a la presencia de tumor no detectable clínicamente, como se discute más adelante.

La administración del BCG modifica los niveles séricos del FNT α en la mayor parte de los pacientes. En respuesta al BCG se observaron dos patrones de secreción de FNT α , como se muestra en la Figura 20. El primer patrón se muestra en las figuras 20a b, las cuales muestran los niveles séricos en los pacientes 1, 2, 5, 7, 8 y 10; en ellos se observó un incremento en los niveles sanguíneos de la citocina quince días después de la administración del BCG; el nivel máximo del FNT α circulante se alcanzó el día 30 (posterior a la segunda aplicación) y se mantuvo elevada a lo largo del tratamiento.

Tabla 6. Niveles séricos de FNT α en pacientes con Melanoma Maligno

Grupo I	Grupo II
575	15
0	15
160	35
125	210
45	5
40	0
105	8
32	6
590	13
25	2

Valores séricos de FNT α expresados en pg/ml. Grupo I: individuos con tumor al momento de obtener la muestra. Grupo II: individuos post tratamiento quirúrgico, sin tumor clínicamente detectable.

Los pacientes 3, 6 y 8, presentaron el segundo patrón de respuesta. Ese grupo de pacientes, a diferencia de los pacientes antes descritos, no presentaron una elevación importante en el nivel del FNT α (Figura 20 c). Clínicamente los pacientes 3 y 8 correspondieron al grupo de individuos que no presentan ningún tipo de reacción posterior a la aplicación del BCG; sin embargo, el paciente 6 tuvo una respuesta adecuada a la aplicación del BCG.

La dificultad para evaluar estas respuestas a la administración de BCG se ejemplifica en los pacientes 5 y 7 (Figura 20 a) en quienes existió la elevación más marcada del nivel circulante del FNT α el cual se mantuvo elevado a lo largo del seguimiento. En el paciente 5, después del 60º día, en donde el nivel de FNT α era de 515 pg/ml se documentó la presencia de metástasis cerebrales. El paciente 7 por el contrario, se encontraba libre de enfermedad 3 años después de la cirugía, momento en que se redactó este escrito.

Finalmente es importante mencionar que el paciente 4, quien presentó un nivel basal de FNT α elevado, no presentó respuesta clínica al BCG y sin embargo el nivel circulante de FNT α se mantuvo elevado. Durante el tratamiento con BCG (tres meses) no fue posible detectar AT, sin embargo a 6 meses de haber concluido el tratamiento con BCG acudió a este Instituto con enfermedad sistémica, la cual probablemente fue la responsable de la elevación persistente del nivel

sérico del FNT α .

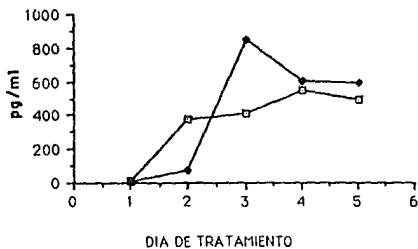
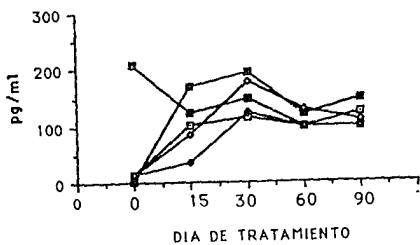


Fig 20. Determinación de los niveles séricos de FNT α . Las muestras de sangre fueron obtenidas de los pacientes los días 0, 15, 30, 60 y 90 del tratamiento con BCG. (a) pacientes: (◆) 5 y (◻) 7. (b) pacientes: (■) 1, (○) 2, (◻) 4, (◆) 9 y (◻) 10.



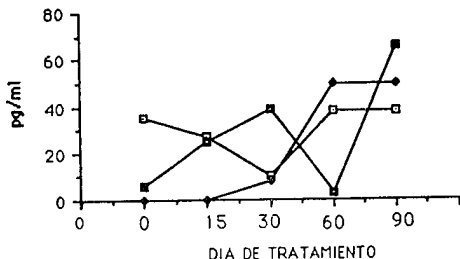


Fig 20 c. Determinación de los niveles séricos de FNT α
 Pacientes: (□) 3, (■) 6 y (◆) 8..

Es importante señalar que el incremento en los niveles de esta citocina correlacionó en forma significativa con un aumento en el porcentaje de monocitos circulantes, Figura 21. Este dato pudiera ser consecuencia de la estimulación de macrófagos, los cuales pueden inducir directa o indirectamente la producción de otras citocinas tales como el GM-CSF.

El FNT y otras citocinas (IL-1, IFNs, etc), además de su actividad citotóxica directa contra algunas células tumorales son cofactores importantes en la activación de linfocitos y otras células del sistema inmune²²³. En respuesta a esta activación las células son capaces de producir otros tipos de citocinas (IL-2, IL-4, IFN γ , etc) o bien ejercer funciones características de células efectoras, tales como la citotoxicidad²²³.

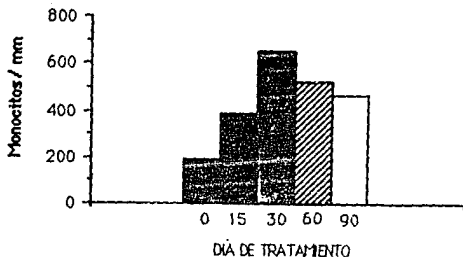


Fig 21. Determinación de monocitos circulantes. Se realizaron biometrías hemáticas los días 0, 15, 30, 60 y 90 del tratamiento con BCG. La gráfica muestra el promedio de monocitos circulantes.

2. Determinación de la función citotóxica por Células Asesinas Naturales

Se ha discutido ampliamente la importancia de las diferentes células citotóxicas en la inmunidad contra tumores y por esta razón se decidió analizar si la administración de BCG modifica la capacidad lítica de las células AN en contra de algunas líneas tumorales mantenidas en cultivo.

Las células AN tienen un papel relevante en la destrucción de células transformadas¹⁶⁶. Algunos estudios han mostrado alteraciones en la capacidad citotóxica de estas células en pacientes con diferentes tipos de neoplasias^{166,167,168}. La actividad lítica normal es variable, por lo que es importante estandarizar en cada laboratorio la actividad lítica contra el blanco convencional, la eritroleucemia K562¹⁶⁶. En nuestro laboratorio, en individuos sanos el porcentaje promedio de lisis fue de 50% utilizando una proporción de 50 células efectoras contra 1 célula blanco. Al analizar la actividad lítica de células AN contra líneas celulares de melanoma maligno en este grupo de individuos no se detectó actividad citotóxica Tabla 7.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

En 30 individuos con tumor analizados, existió una disminución importante en la capacidad de lisis a la línea K562s con respecto a los controles sin cáncer, Tabla 7. Estos pacientes se dividieron en 3 grupos; (a) mujeres con cáncer de mama en diferentes etapa clínicas, sin tratamiento previo, (b) pacientes con melanoma maligno EC II vírgenes a tratamiento los cuales conformaron el grupo control y (c) pacientes con melanoma maligno EC II vírgenes a tratamiento, pero seleccionados mediante sorteo a recibir BCG después del tratamiento quirúrgico.

Estas diferencias han sido reportadas en individuos con diferentes tipos de neoplasias y en algunos estudios se ha mostrado correlación entre el nivel de lisis por células AN y la sobrevida y período libre de enfermedad^{166,168,169}.

Llama la atención que 20 de los pacientes analizados tenían diagnóstico de melanoma maligno y sin embargo no existió lisis en contra líneas celulares establecidas en cultivo derivadas de melanomas malignos. La interpretación de estos resultados se analizará con detalle más adelante.

Tabla 6. Niveles promedios de lisis por células AN

	% de Lisis			
	K562	A-375	BP-1	SK-MEL 3
Individuos sanos	50	1	2	3
Individuos* con cáncer	31	9	6	2
Individuos* con melanoma	29	1	1	0
Individuos* con melanoma	24	1	0	0

Actividad promedio de células AN contra la líneas celulares: K562, A-375, BP-1, SK-MEL3. Se analizaron 10 individuos en cada grupo. (*) pacientes con cáncer de la mama, (•) pacientes con melanoma - BCG, (•) pacientes con melanoma + BCG día 0.

La administración de BCG modificó de alguna manera, no uniforme, la actividad lítica de las células AN contra K562 y otras líneas tumorales. Como se muestra en las Figuras 22 (a,b,c), se identificaron en estos pacientes tres patrones de respuesta:

a) Pacientes con actividad lítica inicial cercana al 50 %, en quienes existió además un incremento alrededor de los días 30 a 60, que fue mayor a los niveles de lisis detectados en individuos sin cáncer (Pacientes 1, 6, 7).

b) En otro grupo de pacientes la actividad de lisis por células AN fue inicialmente baja, pero en los días 30 y 60 se detectó un incremento considerable en la lisis contra K562 (pacientes 2, 3, 5 y 9).

c) Individuos en quienes no se presentaron modificaciones en la capacidad de lisis contra K562 (Pacientes 4, 8 y 10) a pesar de la administración repetida del BCG, Figuras 21, a, b, c.

En algunos de los pacientes que mostraron un incremento inicial en la actividad lítica de las células AN secundaria la administración del BCG, se detectó una disminución significativa durante el tratamiento (pacientes 3 y 5) la cual se asoció a la presencia de metástasis.

En los pacientes 1, 2, 5, 7, 9 y 10 este incremento se correlacionó con el aumento en el nivel circulante de FNT α en el día 30 de tratamiento; debe enfatizarse, sin embargo, que los niveles elevados de esta citocina, en algunos pacientes, coincidieron con baja actividad lítica como se puede observar en los pacientes 4, 5 (día 90) y 10 (día 60). La diversidad de cambios en la respuesta mediada por células AN no permitió llegar a una interpretación satisfactoria sobre el papel que pudiera jugar el FNT α (Figuras 22 a y b).

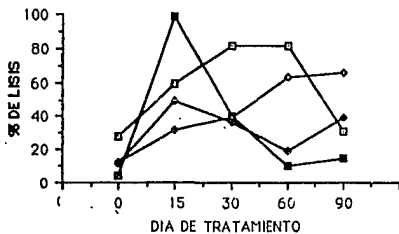
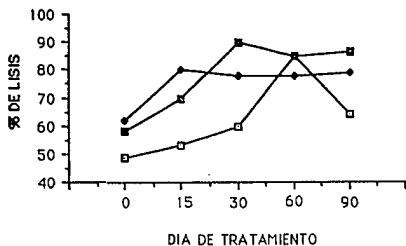


Fig 22. Susceptibilidad de la línea K562 a la lisis por células AN. Las células mononucleares fueron obtenidas de acuerdo al protocolo descrito en Material y Métodos en los días 0, 15, 30, 60 y 90 del tratamiento con BCG. Las gráficas muestran la lisis de la línea celular K562 por células AN circulantes en una proporción de 50 células efectoras por cada célula blanco. (a) pacientes: (□) 1, (■) 6 y (◆) 7. (b) pacientes: (□) 2, (◆) 3, (■) 5 y (◇) 9.

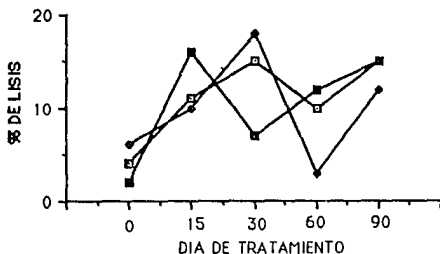


Fig 22c. Susceptibilidad de la línea K562 a la lisis por células AN. Pacientes (■) 4, (□) 8 y (◆) 10.

Además de K562, también se utilizaron diferentes líneas celulares de melanoma como blanco (Tabla 8) muestra los resultados promedios de estos ensayos. Claramente se observa que en casi todos los pacientes no existe actividad lítica en contra de todas las líneas utilizadas, a pesar de que utilizando el blanco tradicional K562 hubiera existido incremento en la lisis durante el tratamiento con BCG.

Tabla 8. Actividad de células AN contra líneas tumorales

Paciente	% de Lisis				
	DIA 0	DIA 15	DIA 30	DIA 60	DIA 90
1	0	0	0	0	4 ^a
2	0	0	0	0	2 ^a
3	7 ^s	20 ^{s,a,b}	20 ^a	18 ^b	5 ^{a,b}
4	1 ^a	0	0	0	0
5	0	0	0	0	39 ^a
6	0	0	0	0	5 ^a
7	0	0	0	0	0
8	4 ^b	0	0	0	0
9	4 ^a	0	10 ^a	10 ^b	19 ^a
10	0	0	18 ^a	0	7 ^{a, 5^b}

Actividad lítica por células AN contra líneas celulares de melanoma maligno; a, A-375, b, BP-1, s, SK-MEL 3, en pacientes con melanoma tratados con BCG. La tabla muestra los resultados en una proporción de 50:1 (efectora:blanco).

El o los mecanismos responsables de la resistencia o susceptibilidad a la actividad de células AN parecerían no ser los mismos en todos los enfermos. Por ejemplo, algunos de los pacientes, principalmente aquellos con enfermedad sistémica, presentaron actividad lítica por células AN contra las líneas de melanoma, aún cuando la lisis contra K562 hubiera disminuido y nunca antes hubiera habido lisis contra líneas de melanoma (paciente 5). Estos hallazgos se encontraron así mismo en el paciente 1, 9 y algunos controles sin BCG en presencia de actividad tumoral diseminada (datos no mostrados).

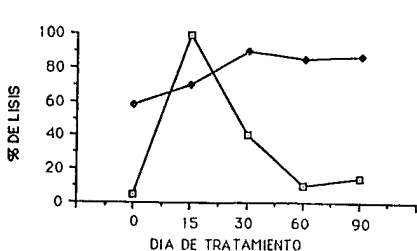
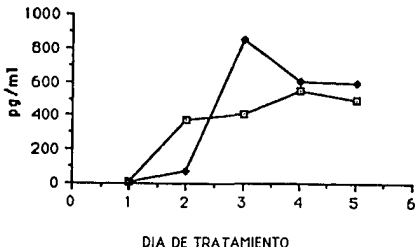


Fig 23. Análisis comparativo en los pacientes 5 y 7 del nivel sérico de FNTn y la actividad lítica por células AN. (a) Citotoxicidad por células AN: (□) paciente 5 y (◆) paciente 7. (b) Niveles séricos de FNTn : (□) paciente 5 y (◆) paciente 7.



Al analizar mediante inmunofluorescencia el fenotipo de las células mononucleares de los pacientes estudiados se encontró una proporción normal de linfocitos CD4+, CD8+ y CD19+ (datos no mostrados); el porcentaje promedio de células CD16+ fue normal (12 +/- 6) en los 30 pacientes analizados con cáncer, lo que reveló que no había diferencias significativas con respecto a los individuos sanos.

La falta de una correlación entre el porcentaje de células CD56+ y el incremento de la función citotóxica pudiera deberse a que las células AN se definen operacionalmente, mas que en base a un inmunofenotipo definido. Es importante señalar que existen anticuerpos que reaccionan con esta población de células del sistema inmune pero no estuvieron accesibles en este estudio ³⁴.

CONCLUSIONES

1. Modelo Experimental

A lo largo de este trabajo se ha insistido en el papel que desempeñan los LTC como parte de los mecanismos de vigilancia inmunológica en la identificación, limitación de la diseminación y lisis de células neoplásicas. La actividad antineoplásica de esta variedad de células linfoides ha sido documentada *in vitro* e *in vivo*, tanto en humanos como en modelos experimentales, principalmente de origen murino.

El reconocimiento de antígenos expresados por células neoplásicas depende de la integridad del complejo RCT/CD3 en la superficie de los LTC y de la presentación de antígenos por moléculas del CPH, en la mayoría de los casos de tipo I. Defectos en cualquiera de estos complejos sistemas de comunicación podrían ser la causa de que algunos tumores escapen de los sistemas de vigilancia inmunológica.

La variante celular H-2,LR.4, fue seleccionada en nuestro laboratorio por su capacidad para crecer en ratones endogámicos que expresaban uno de diferentes haplotipos. Con excepción de la cepa C57BL/6J, todos los animales investigados murieron a consecuencia de trasplantes ip de esta línea celular. Algunos de los defectos genéticos que contribuyeron a esta característica fueron deleciones en los genes que codifican para B2m e IAa, la falta de expresión de IEa e IEb, y niveles elevados de metilación en aquellos que codifican para moléculas de clase I. La posibilidad de que la línea celular LR.4 secretara factores solubles con actividad inmunosupresora fue descartada por otros miembros del grupo en base a los resultados obtenidos en otras estirpes de ratón (BALB.b [H-2b], BALB/c, BALB.k, C3H o CD1 [no endogámica]).

Desde el punto de vista experimental, los distintos defectos genéticos de las células LR.4 permitieron demostrar con claridad que el rechazo por parte de ratones C57BL/6J está mediado, al menos en parte, por anticuerpos específicos. Otros tipos celulares, tales como las células AN, no tuvieron un efecto sobre la línea celular en estudio.

Parte de la relevancia de este trabajo reside en la caracterización inmunológica de las células LR.4 y en la definición, cada vez mas precisa, de un modelo experimental que permite estudiar la interacción de una célula neoplásica con el sistema inmune del animal. Otros grupos han demostrado que tumores con defectos en la expresión de productos

del CPH, secundarios o no a lesiones en el gen de la B2m, pueden determinar cambios en la antigenicidad del tumor (i.e. capacidad metastásica), en sus rangos de crecimiento entre distintas estirpes de ratón o en la susceptibilidad a células AN. Sin embargo, en este caso particular, varias de las características descritas en otros tumores se encuentran representadas en la misma célula. En relación al animal de experimentación, la capacidad de responder inmunológicamente ante una línea celular muy poco antigénica nos ha permitido iniciar experimentos orientados a explorar algunas propiedades del sistema inmune de esta estirpe y su expresión en animales B6C_{F1} (C57BL/6J X BALB/c).

2. Enfermos con Melanoma Maligno

Los experimentos realizados con ratones endogámicos pueden ser considerados como un indicador de la dificultad que representa el análisis de la interacción entre el sistema inmune y un tumor maligno. La diversidad de tumores malignos y la complejidad de los tipos celulares que componen a cada uno de ellos son solo algunos de los factores que deben ser tomados en consideración. Por parte del sistema inmune, las poblaciones celulares y los productos que secretan algunas de ellas obligan a restringir el análisis, al menos en fases iniciales, a aspectos parciales del problema.

En humanos, por limitaciones obvias, con frecuencia es recomendable intentar establecer una correlación entre algunas estrategias usadas con fines terapéuticos y las consecuencias que pudieran tener sobre el sistema inmune. Con esta idea se decidió evaluar algunos parámetros inmunológicos en pacientes con melanoma maligno tratados o no con BCG. Es importante mencionar que el BCG ha sido usado en nuestro país como terapia adyuvante en enfermos con melanoma maligno o con cáncer de vejiga. Los resultados no han sido sistematizados hasta la fecha pero puede decirse que el efecto es favorable en el cáncer de vejiga y no tan claro en la otra variedad de neoplasia.

La complejidad molecular y efectos biológicos del BCG no han sido aclarados con precisión. Parte de esta limitación se debe al desconocimiento que aun existe sobre los mecanismos básicos del sistema inmune. Con el propósito de verificar si el BCG tenía un papel importante en la inmunidad celular mediada por células AN y los niveles circulantes de FNT α en pacientes con melanoma se diseñaron algunos

experimentos apropiados.

Los resultados de este análisis revelaron que la actividad lítica mediada por células AN en contra del blanco convencional fue baja, en general, en el grupo control. Los enfermos tratados con BCG mostraron un incremento, en ocasiones asociado con una elevación en los niveles de FNT α . Es importante mencionar que las variaciones giraron en torno del blanco convencional y en términos generales no hubo actividad contra células derivadas de melanoma. La resistencia de las células neoplásicas a la actividad lítica de las células AN pudiera tener distintas explicaciones, algunas de las cuales son: los niveles de expresión de moléculas clase I del CPH, la falta de expresión de moléculas de superficie que permitan el establecimiento de contactos con las células efectoras o bien, la inducción de señales inhibitorias sobre las células efectoras. De estos experimentos es posible concluir que las células AN no son un factor importante en contra de las células de melanoma; su actividad posiblemente este restringida a células con niveles bajos de moléculas clase I o sea más eficiente sobre otras estirpes celulares.

Un hallazgo importante fue la variabilidad de los niveles de FNT α detectados antes y después de administración de BCG o bien secundarios a la carga tumoral. En el caso particular del BCG, el incremento en los niveles de BCG correlacionó con la concentración sanguínea de monocitos. Sin embargo, independientemente de la concentración de esta citocina, no se detectó ningún efecto claro sobre los melanomas. Posibles explicaciones podrían ser: que existan algunos factores solubles que interfieran sobre la actividad antitumoral del FNT α o bien que las células sean resistentes a esta citocina. Tampoco fue posible establecer una correlación entre la actividad lítica de células AN y los niveles de FNT α .

Es importante mencionar que si bien la administración de BCG mejoró algunos parámetros inmunológicos *in vitro*, no hubo una mejoría en el periodo libre de enfermedad. Tanto el grupo en estudio como el grupo control tuvieron una sobrevida similar (Tabla 8).

Tabla 8. Período Libre de Enfermedad y Sitios de Metástasis

	Pacientes (+) BCG	Pacientes (-)BCG
Período Libre de Enfermedad	12m	11m
Sobrevida a 24m(%)	30	20
Sitio de recurrencia (%)		
Piel	60	60
Ganglios	70	60
SNC	30	20
Hígado	10	20
Hueso	10	20
Pulmón	40	10
T digestivo	10	20

Los datos obtenidos en este trabajo demostraron que existe una gran dificultad para evaluar la repercusión que pudieran tener sobre el sistema inmune inmunomoduladores complejos. También se demostró que la mejoría relativa de algunos parámetros inmunológicos no tienen necesariamente una correlación con el pronóstico de los pacientes. Aún cuando el número de enfermos estudiados fue pequeño, no existió una diferencia entre los grupos que recibieron o no BCG.

Finalmente, es posible recomendar que el uso de compuestos con actividad local o general sobre el sistema inmune debe ser ponderado cuidadosamente. Solo en aquellos casos en que la evidencia científica sea suficiente y favorable deberá recomendarse su uso, teniendo en cuenta los riesgos que pudieran tener para el enfermo.

Apéndice A

1. Anticuerpos:

a. Humanos

Anti CD4 (Coulter, EUA)

Anti CD8 (Coulter)

Anti CD16 (Coulter)

b. Ratón

Antisueros: Anti H-2d, Anti LR.4, Anti timos de Balb.b

Anti CD4 (Boehring Mannheim)

Anti CD8 (Boehring Mannheim)

Anti CD25(Boehring Mannheim)

2. Segundo anticuerpo (Fluoresceinado)

a. Humanos

GammFit (Coulter)

b. Ratón

Cabra anti ratón GAM (InmunoSelect, GIBCO, EUA)

Rata anti ratón (Boehring Mannheim)

3. Citocinas

IL-2r murina (Boehring Mannheim)

4. Activadores de función AN murinas

Poli I:C (Sigma, EUA)

5. Ensayo para FNT

ELISA (Dupont ELISA kit NEK-066, EUA).

6. Medio de cultivo

RPMI (GIBCO/BRL)

Aminoácidos no esenciales (Sigma)

Piruvato de sodio (Sigma)

Dextrosa (JT Baxter, México)

Anfotericina B (GIBCO/BRL)
Sulfato de estreptomocina (Sigma)
Suero Bovino Fetal (GIBCO/BRL)

7. Reactivos diversos

Ficoll (Sigma)
Radilar (Senoslan, México)
Azul Tripán (GIBCO/BRL)
Mitomocina C (Sigma)
2mVci/mlCr⁵¹ Na₂⁵¹CrO₄ (Amersham, Inglaterra)
ASB (Sigma)
PHA (Boehring Mannheim)
Colagenasa (Sigma)
DNasa (Sigma)
Tritón X100 (Sigma)
Paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, EUA)

Apéndice B.

Amortiguadores

Amortiguador de Fosfatos (PBS) (1L)

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

PBS-ASB (100 ml)

PBS	100	ml
ASB	3	g
NaN ₃	0.05	g
pH 7.4		

Buffer de Hlis (ACK) (1 L)

NH ₄ Cl	8.9	g
Na EDTA3	7.2	mg
KHCO ₃	1.0	g
pH 7.2 - 7.4		

Medio de cultivo y suplementos:

Medio RPMI (1 L)

RPMI-1640	10.0	g
Dextro	2.5	g
NaHCO ₃	2.0	g
pH 7.4		

Suplementos

Suero fetal bovino	10	%
L-Glutamina	2	mM
Piruvato de sodio	1	mM
amino-ácidos no-escenciales (0.1 mM)		
Anfotericina-B	50	µg/ml
Sulfato de estreptomina	100	µg/ml

Gradiente Ficoll/Radialar

Ficoll	64	g
Radialar	20	ml
DENSIDAD 1.077 g/l		

Almacenado a 4 a 25°C, protegida de la luz.

Mitomicina C

Mitomicina C	2	mg
--------------	---	----

Agua bidestilada	4	ml
------------------	---	----

Almacenado a 4°C protegida de la luz

BIBLIOGRAFIA

1. Burnet FM. **The clonal selection theory of acquired immunity.** Cambridge University Press. London. 1959
2. Thiele, DL., and PE. Lipsky. The role of cell surface recognition structure in the initiation of MHC-unrestricted "promiscuous" killing by T cells. *Immunol Today* 1989;10: 375-381.
3. Sponaas, A.-M. B. Loveland, and E. Simpson. MHC- unrestricted T-cell cytotoxicity against tumour cells. *Immunol* 1988;63:233-239.
4. Blackwell TK y Alt FW. Mechanism and developmental program of immunoglobulin rearrangement in mammals. *Ann. Rev. Genet.* 1989;23:605-636
5. Glas, R., L. Franksson, C. Ohlén, P. Höglund et al. Major histocompatibility complex class I-specific and -restricted killing of $\beta 2$ -microglobulin-deficient cells by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89: 11381-11385.
6. Maziarz, RT., V. Groh, M. Pren et al. Non-MHC-restricted target-cell lysis by a CD4-CD8- TCR $\alpha\beta$ T-cell line, as well as by TCR $\gamma\delta$ T-cell lines, results from lymphokine-activated killing. *Int J Cancer.* 1991; 48:142-147.
7. Sarcarz EE et al. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 729-766.
8. Nakamura M et al. Cytolytic activity of antigen-specific T cells with helper phenotype. *J. Immunol.* 1986;136: 44-47.
9. Hass W, Pereira P y Tonegawa S. Gamma/Delta cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1993;11: 637-685.
10. Allison JP. n n T-cell development. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5:241-246.
11. Brodsky FM y Guagliardi LE. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 1991;9: 707-744.
12. Neefjes JN y Momburg F. Cell biology of antigen presentation. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5: 27-34.
13. Neefjes JN, Schumacher TNM y Ploegh HL. Assembly and intracellular transport of major histocompatibility complex molecules. *Curr. Op. Immunol.* 1991; 3: 601-609.7
14. Biljmakers M-J y Ploegh HL. Putting together and MHC class I molecule. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5: 21-26.

15. Natheson SG et al. Murine major histocompatibility complex class-I mutants: Molecular analysis and structure-function implications. **Annu. Rev. Immunol.** 1986;4: 471-502.
16. Cerundolo A, Alexander J, Anderson K et al. Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex. **Nature** 1990;345:449-52
17. Townsend A, Elliot T Cerundolo V et al. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. **Cell.** 1990;62:285-295
18. Boon, T. Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens. **Adv. Cancer Res.** 1992;58: 177-209.
19. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraovi B et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition region of a class I histocompatibility antigen. **Nature.** 1987;329:512-518
20. Townsend, A., and H. Bodmer. Antigen recognition by class I- restricted T lymphocytes. **Annu Rev Immunol** 7: 601-624, 1989
21. Lunggren HG, Stam NJ, Ölen C. et al . Empty Class I molecules come out of the cold. **Nature** 1990;346:376-480
22. Trinchieri G, Perussia B. Human Natural Killer Cells: Biology and pathologic aspects. **Lab Inves** 1984;50:489-513
23. Trichineri G . Biology of natural killer cells. **Adv Immunol** 1989;47:187-376.
24. Yokoyama, WM. Recognition structures on natural killer cells. **Curr. Op. Immunol.** 5: 67-73, 1993
25. Versteeg, R. NK cells and T cells: Mirror images? **Immunol. Today** 13: 244-247, 1992
26. Fitzgerald-Bocarsly P, Heberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. **Immunol Today** 1988;9:292
27. Karre K. Ljunggren HG, Pinoteck G. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggest alternative immune defence strategy. **Nature** 1986;319:675-678.
28. Heberman R B, Nunn ME, Holden HT, Laurin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogenic tumors II. Characterization of effector cells. **Int J Cancer** 1975;16:230-39.
29. Heberman RB, Ortaldo JR. Natural killer cells. Their role in defense against disease. **Science** 1981;214:24

30. Kaufman, DS., RA. Schoon, and PJ Leibson. MHC class I expression on tumor targets inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition. *J. Immunol.* **150: 1429-1436, 1993**
31. Moretta, L., E. Ciccone, A. Moretta, P. Höglund, C. Ohlén and K. Kärre. Alloreognition by NK cells: nonself or no self?. *Immunol. Today* **13: 300-306, 1992.**
32. Chan, SH., M. Kobayashi, D. Santoli, et al. Mechanisms of IFN- τ induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). *J. Immunol.* **148: 92-98, 1992**
33. Currie GA. Eighty years of immunotherapy. *Br J Cancer* **1972;26:141**
34. Boon T, DePlaen E, Van den Eynde B et al. Identification of tumor rejection antigens recognized by T lymphocytes. *In Cancer Surveys: A new look in tumor Immunology* **1992;13:23-38**
35. Gorer PA. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. *J Pathol Bact* **1937;44:691**
36. Gross L. Intradermal immunization of C3H mice against sarcoma originated in an animal of the same line. *Cancer Res* **1943;3:326**
37. Schreiber, H., P.L. Ward, D.A. Rowley, and H.J. Stauss. Unique tumor specific antigens. *Annu. Rev. Immunol.* **1988;6: 465-483.**
38. Urban, J.L. and H. Schreider. Tumor antigens. *Annu. Rev. Immunol.* **1992;10: 617-644.**
39. Klein G, Sjogren H, Klein E, Hellstrom K. Demonstration of resistance against methylcholantrene induced sarcomas in the autochthonous host. *Cancer Res* **1960;20:1561-72**
40. Krippl ML. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst* **1974;53:1333-36**
41. Klein E, Klein G. Antigenic properties of lymphomas induced by Molony agent. *J Natl Cancer Inst* **1964;32:547-68**
42. Khera KS, Ashkenasi A, Rapp F, Melnick JL. Immunity in hamster to cell transformed in vitro among the papovavirus. *J Immunol* **1963;91:604-13**
43. Klein G. Immunovirology of transforming viruses. *Curr. Op. Immunol.* **1991; 3: 665-673.**
44. Palladino, MA., PK. Srivastava, HF. Oettgen, and AB. DeLeo. Expression of a shared tumor-specific antigen by two chemically induced BALB/c sarcomas. *Cancer Res.* **1987;47: 5074-5079.**

45. Srivastava, PK., Y-T. Chen, and LJ. Old. 5'-Structural analysis of genes encoding polymorphic antigens of chemical induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84: 3807-3811.
46. Burrows SR et al. An Epstein-Barr virus specific cytotoxic T-cell epitope in EBV nuclear antigen 3 (EBNA 3). *J. Exp. Med.* 1990;171:345-349
47. Jelinek, T., and FL. Graham. Recombinant human adenoviruses containing hybrid adenovirus type 5 (Ad5)/Ad12 E1A genes: Characterization of hybrid W1A protein and analysis of transforming activity and host range. *J. Virol.* 1992;66: 4117-4125.
48. Melief CJM y Kast WM. Potential immunogenicity of oncogene and tumor suppressor gene products. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5:709-713.
49. Winter SF et al. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Res.* 1991; 4168-4174.
50. Chen W et al. T cell immunity to the joining region of p210^{bcr-abl} protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89: 1468--1472.
51. Sibille, C., P. Chomez, C. Wildmann, A. et al. Structure of the gene of tumor-transplantation antigen P198: A point mutation generates a new antigenic peptide. *J. Exp. Med.* 1990;172: 35-45.
52. Szikora, J-P., A. Van Pel, V. Bricha et al. Structure of the gene of tumor-transplantation antigen P35B: presence of a point mutation in the antigenic allele. *EMBO* 1990;9: 1041-1050.
53. Herlyn, M. and H. Koprowski. Melanoma antigens: Immunological and biological characterization and clinical significance. *Annu. Rev. Immunol.* 1988;6: 283-308.
54. Hakomori S. Possible function of tumor-associated carbohydrate antigens. *Curr. Op. Immunol.* 1991;3: 646-653.
55. Fanning, E. Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Ann. Rev. Biochem.* 1992;61: 55-85.
56. Hakomori, S-I. Possible functions of tumor-associated carbohydrate antigens. *Current Op. Immunol.* 1991; 3: 646-653.
57. Barnd, DL., MS. Lan, RS. Metzgar, and O. Finn. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 7159-7163.
58. Finn OJ. Tumor-rejection antigens recognized by T lymphocytes. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5: 701-708.

59. Jerome, KR., DL. Bamd, KM. et al. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.* 1991;51:2908-2916.
60. Peace et al. T cell recognition of transforming proteins encoded by mutated ras proto-oncogenes. *J. Immunol.* 1991;146: 2059-2065.
61. Zur Hausen H, Gissman L, Schlegel JR. Virus in the etiology of human genital cancer. *Prog Med Vir* 1984;30:170-86
62. Bennett RP, Lancaster WD. Association of human papillomavirus with benign, premalignant and malignant anogenital lesions. In: *P Fister (Ed) Papilloma virus and human cancer 1990:11-43. Press Boca Raton Fla.*
63. Marx, J. New tumor suppressor may rival p53. *Science* 1994;264:344-345.
64. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus Q. et al. A Cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-440
65. van der Bruggen P y van den Eynde B. Molecular definition of tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Curr. Op. Immunol.* 1992;4: 608-612.
66. van der Bruggen P, Traversari C, Boon T, et al. Gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on human melanoma. *Science* 1991; 254:1643-47.
67. Van den Eynde, B., B. Lethé, A. Van Pel, E. De Plaen, and T. Boon. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J. Exp. Med.* 1991;173: 1373-1384.
68. Wölfel, T., A. Van Pel, E. De Plaen, et al. Immunogenic (tum-) variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. VIII. Detection of stable transfectants expressing a tum- antigen with a cytolytic T cell stimulation assay. *Immunogen.* 1987; 26:178-187.
69. De Plaen, E., C. Lurquin, A. Van Pel, et al. Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: Cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 2274-2278.
70. Van den Eynde B, Hainaut P, Herin M et al. Presence on a human melanoma of a multiple antigens recognized by autologous CTL. *Intl J Cancer* 1989;44:634-640
71. Storkus WJ et al. Isolation of human melanoma peptides by class I restricted tumor infiltrating T lymphocytes. *J Immunol.* 1993;151:1423-26

72. Rettig, WJ. Immunogenetics of cell surface antigens of human cancer. *Curr. Op. Immunol.* 1992; 4: 630-640.
73. Yasumura S, Hirabayashi H, Scharz DR, et al. Human cytotoxic T-cell lines with restricted specificity for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1993;53:1461-1468
74. Paul WE. *Fundamental Immunology*. Third Edition. Raven Press New York 1993
75. Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD. Map of human MHC *Immunol Today* 1991;12:443-446
76. Abbas AK, Lichtman AH Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. Second Edition. WB Saunders Co. 1993
77. Monaco, JJ. Structure and function of genes in the MHC class II region. *Current Op. Biol.* 5: 17-20, 1993
78. Pease, LR., RM. Horton, JK. Pullen, and Z. Cai. Structure and diversity of class I antigen presenting molecules in the mouse. *Critical Review Immunol.* 11: 1-32, 1991
79. Dorf, ME., and B. Benacerraf. Complementation of H-2 linked Ir genes in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3671-3675, 1975
80. Snell GO, Higgins GF, Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. *Genetics* 1951;36:301
81. Matis LA. The molecular basis of T cell specificity. *Annu Rev Immunol* 1990;8:65-82
82. Geraghty, DE. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Current Op. Biol.* 5: 3-7, 1993
83. Monaco JJ. A molecular model of MHC class I restricted antigen processing. *Imm Today* 1992;13:173-179
84. Barinaga M. Getting some "backbone" how MHC bind peptides. *Science* 1992;257:880-81
85. Fremont DH, Matsumura M, Stura E et al. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2k. *Science* 1992;257:919-27
86. Matsumura M, Fremont D, Peterson P, Wilson I. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 1992;257:927-34

87. Otten GR, Bikoff E, Ribaldo RK. et al. Peptide and β 2-microglobulin regulation of surface MHC class I conformation and expression. *J Immunol* 1992;148:3723-32
88. Spies T, Crundolo V, Colonna M, et al. Presentation of viral antigens by MHC class I molecules is dependant on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 1992;355:644-646
89. Sherman, LA., and AM. Lara. Unrestricted recognition of a nonpeptide antigen by CD8+ cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* 143: 3444-3447, 1989
90. Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK et al. A binding site for the T cell co receptor CD8 on the α 3 domain of HLA-A2. *Nature* 1990;345:41-46
91. Glimcher LH y Kara CJ. Sequences and factors: A guide to MHC class-II transcription. *Ann. Rev. Immunol.* 10: 13-49, 1992.
92. Moss PAH. Rosemberg WMC. Bell JI. The human T cell receptor in health and disease. *Annu Rev Immunol* 1992;10:71-96
93. Latron F, Pazmany L, Morrison J et al. A critical role for conserved residues in the cleft of HLA-A2 in presentation of a nonapeptide to T cells. *Science* 1992;257:964-67
94. Jackson, MR., MF. Cohen-Doyle, PA. Peterson, and DB. Williams. Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science* 263: 384-390, 1994
95. Rivett A. The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch Bioch Bioph* 1989;268:1-8
96. Orlowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 1990;45:10289-10297
97. De Mars R, Spies T. New genes in the MHC that encode proteins for antigen processing. *Trends in Cell Biol* 1992;2:81-86
98. Martinez CK, Monaco JJ. Homology of proteasoma subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature.* 1991:664-667
99. Golber AL, Roce KL. Proteolysis proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992;57:375-378
100. Parham P. Transport of delight. *Nature* 1990:348:674-75
101. Goldberg, AL., and KL. Rock. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature (London)* 357: 375-379, 1992

102. Neeffjes JJ, Ploegh H. Intacellular transport of MCH class I molecules. *Imm Today* 1992;13:179-184
103. DeNagel CD, Pierce S. A dase for chaperones in antigen processing. *Imm Today* 1992;13:86-89
104. Degen E, Cohen-Doyle MF, Williams DB. Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both 2- microglobulin and peptide. *J Exp Med* 1992;175:1653-61
105. Higgin CF. ABC transporters: from microorganism to man. *Ann Rev Cell Biol.* 1992;8:67-113
106. Steinmetz M, Stephen D, Lindahl KF. Gene organization and recombinational hot spots in the murine major histocompatibility complex. *Cell.* 1986;44:895-904
107. Monaco J.J. Cho S, Attaya M, Transport protein genes in the murine MHC: Possible implications for antigen processing. *Science* 1990;250:1723-26
108. Trowsdale J, Hanson I, Mockridge J. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the ABC superfamily transporters. *Nature* 1990;348:741-47
109. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y et al. Identification of human cancer deficient in antigen processing. *J Exp Med* 1993;177:265-272
110. Cromme FV, Airey J, Heemels MT. et al. Loss of transporter protein, encoded by TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinoma. *J Exp Med* 1994;179:335-40
111. Morris, P., J. Sharman, M. Attaya, et al. An Essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature (London)* 368: 551-558, 1994
112. Leiden JM. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. *Ann Rev Immunol* 1993;11:539-70
113. Winoto A, Ballinor D. Separate lineage of T cells expressing the alfa beta, gamma delta receptor. *Nature* 1989;338:430-32
114. McMichael A. Cytotoxic T lymphocytes and immune surveillance. In *Cancer Surveys: A new look in tumor Immunology* 1992;13:5-22
115. Podack, ER., T-cell effector functions: mechanisms for delivery of cytotoxicity and help. *Ann Rev Cell Biol* 7: 479-504, 1991

116. Doymaz MZ, Foster CM, Destephano D, Rouse BT, MHC II.restricted, CD4+ cytotoxic T lymphocytes specific for herpes simplex virus -1: Implication for development of herpetic stromal keratitis in mice. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;61:398-409
117. Jorgensen JL et al. Molecular components of T-cell recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 1992;10: 835-873.
118. Kronberg GM, Sio G, Hood LE et al. The molecular genetic of the T cell antigen recognition. *Ann Rev Immunol* 1986;4:529-91
119. Strominger JL. Developmental biology of T Cell receptor. *Science* 1989;244:943-50
120. Davis MM, Bjorkman PJ. T cell antigen receptor genes and the T recognition. *Nature* 1988;334:395-402
121. Marrak P, Kappler J. The T cell receptor. *Science* 1987;238;1073-79
122. Strominger JL. The gamma delta T cell receptor and class I MHC related proteins: Enigmatic molecule of immune recognition. *Cell* 1989;57:895-88
123. Ashwell JD, Klausner RD. Genetic and mutational analysis of the T cell antigen receptor. *Ann Rev Immunol* 1990;8:139-67
124. Samelson LE, Hartford JB, Klausner RD. Identification of the murine T cell antigen receptor complex . *Cell* 1985; 43:223-3
125. Minami Y, Weissman AM, Samelson LE et al. Building a multichain receptor: Synthesis degradation and assembly of T cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;141:42-49
126. Jorgensen, JL., PA. Reay, EW. Ehrlich, and MM. Davis. Molecular components of T-cell recognition. *Ann Rev Immunol* 10: 835-873, 1992
127. Weiss, A. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Ann Rev Genet* 25: 487-510, 1991
128. Rajasekar, R., G-K. Sim, and A. Augustin. Self heat shock and $\tau\delta$ T-cell reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1767-1771, 1990
129. Wegener AMK, Letourneur F, Hoveler A et al. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 1992;68:83-95
130. Borst J Alexander S Edler J et al. The T3 complex on human T lymphocytes involves four structurally distinct glycoproteins. *J Biol Chem* 1983;258:5131-41

131. Alarcon, B., J. De Vries, C. Pettey, et al. The T-cell receptor τ chain-CD3 complex: Implication in the cytotoxic activity of a CD3+ CD4-CD8- human natural killer clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3861-3865, 1987

132. Ullman, KS., JP. Northrop, CL. Verweij, and GR. Crabtree. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: The missing link. *Ann Rev Immunol* 8: 421-452, 1990

133. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34

134. Spriger TA, Dustin ML, Kishimoto TK. The lymphocyte function- associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: Cell adhesion receptors of the immune system. *Ann Rev Immunol* 1983; 5:223-52

135. Bierer B, Sleckmann BP, Ratnofsky SE. The Biology roles CD2, CD4, and CD8 in T Cell activation. *Ann Rev Immunol* 1989;7:579-99

136. Harding, FA. and JP. Allison. CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J Exp Med* 177: 1791-1796, 1993

137. Wingren, AG., K. Dahlenborg, M. Mjörklund, G. Monocytes-regulated IFN- τ production in human T cells involves CD2 signaling. *J Immunol* 151: 1328-1336, 1993

138. Raulet DH The structure, function and molecular genetic of the gamma delta T cell receptor. *Ann Rev Immunol* 1989;7:175-207

139. Brenner MB, Mc Lean, J Dialynas et al. Identification of a putative second T cell receptor. *Nature* 1986;322:145-49

140. Brenner MB, Mc Lean J, Scheft Het al. Two forms of T cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1987;325:689-94

141. Brenner MB, Strominger JL. T $\tau\delta$ T cell receptor. *Adv Immunol* 1988;43:133-91

142. Mercep M, Bonifacino JS, Garcia Morales P et al. CD3- heterodimer expression and coupling to phosphoinositol hydrolysis. *Science* 1988;242:571-74

143. Irving BA, Weiss A. The cytoplasmic domain of T cell receptor chain is sufficient to couple to receptor associated signal transduction pathway. *Cell* 1991;64:891-901

144. Perlmutter RM, Lvin SD, Appleby MV. Regulation of lymphocyte function by protein phosphorylation. *Ann Rev Immunol* 1993;11:451-99

145. Cooke MP, Abraham KM, Forsbush KA, et al. Regulation of T receptor signalling by a src famili protein tyrosine kinase (p59 *lyn*). *Cell* 1991;65:281-91
146. Letouneur fF, Klausner RD. Activation of T cells by tyrosine Kinase activation domaina in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ . *Science*. 1992;255:79-82
147. Chan AC, Irving BA, Fraser J. The ζ chain is associated with tyrosine kinase and upon T cell antigen receptor stimulation associates with ZAP70 a 70 kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9166-76
148. Gardner P. Patch clamp studies of lymphocyte activation. *Ann Rev Immunol* 1990. 8;231-52
149. Kupfer A Singer SJ. Cell biology of citotoxic and helper T cell functions. *Ann Rev Immunol* 1989;7: 309
150. Malissen, B., and A-M. Schmitt-Verhulst. Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. *Current Op Immunol*. 5: 324-333, 1993
151. Rubio, G., J. Aramburu, J. Ontanon, et al. A novel functional cell surface dimer (Kp43) serves as accessory molecule for the activation of a subset of human $\alpha\beta$ T cells. *J Immunol* 151: 1312-1321, 1993
152. Damle, NK., K. Flussman, G. Leytze, and PS. Linsley. Proliferation of human T lymphocytes induced with superantigens is not dependent on costimulation by the CD28 counter-receptor B7. *J Immunol* 150: 726-735, 1993
153. Moreta, L., E. Ciccone, MC. Mingari, et al. Human natural killer cells: Origin, Clonality, specificity, and receptors. *Adv. Immunol*. 55: 341-380, 1994
154. Koo GC, Domont FJ, Tutt M, et al, The NK1.1-mouse; a model to study differentiation of murine NK cells. *J Immunol* 1986;137:3742-47
155. Yokoyama WM, Kehn PJ, Cohen DI et al. Chromosomal localization the LY-49 (A1, YE1\48) multigene family. Genetic association with the NK1.1 antigen. *J Immunol* 1990;145:2353-58
156. Karlhofer FM, Yokoyama WM. Stimulation of murine natural killer cells by monoclonal antibody specific for the NK1.1. antigen. IL-2 activated NK cells posses additional specific stimulation pathways. *J Immunol* 1991;146:3662-73
157. Masonl H, Mathieson BJ, Ortaldo JR. Natural killer (NK) cells subsets in the mouse NK1.1+LGL-1+ cells restricted to lysing NK targets whereas NK1.1LGL-1- cells generate lymphokine activated killer cells. *J Immunol* 1990; 145:751-759

158. Perussia B, Tutt M, Qui W et al. Murine natural killer cells express functional Fc gamma receptor II encoded by the Fc gamma alfa gene. *J Exp Med* 1989;170:73-86
159. Kiessling R, Petranyo G, Klein G, Wigzell H. Genetic variation of in vitro cytolytic activity and in vivo rejection potential of non-immunized semisynthetic mice against a mouse lymphoma line. *Int J Cancer* 1975;15:933-40
160. Heberman RB, Reynolds CW, Ortaldo JR. Mechanisms of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Ann Rev Immunol* 1986;4:651-680
161. Carpen O, Virtanen I, Saksela E. Ultrastructure of human natural killer cells: Nature of cytolytic contact in relation of cellular secretion. *J Immunol* 1982;128:2691
162. Toyonaga S. Genes of the T cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Annu Rev Immunol*. 1987;5:585-620
163. Robertson MJ., T.J. Manley, C. Donahue, et al. Costimulatory signals are required for optimal proliferation of human natural killer cells. *J. Immunol.* 150: 1705-1714, 1993
164. Valiante, NM., M. Rengaraju and G. Trinchieri. Role of the production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) in the ability of B cell lines to stimulate T and NK cell proliferation. *Cell. Immunol.* 145: 187-198, 1992
165. Moretta A, Vitale M, Bottino C et al. P58 molecule as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer cells. Anti p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I protected cells in NK clones displaying different specificities *J Exp Med* 1993;178:597-604
166. Whiteside T, Heberman R. Human natural killer cells in health and disease: Biology and therapeutic Potential. *Clin Immunother* 1994;1:56-66
167. Strayer DR, Carter WA, Mayberry SD. et al. Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidence of cancer. *Cancer Res* 1984;44:370-74
168. Schantz SV, Brown BW Lira E et al. Evidence for the role of natural immunity for the control of metastatic spread of head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1987;141-5
169. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells, *Blood* 1990;76:2421-38
170. Hersey P, Edwards A, McCarthy W, et al. Tumor related changes and prognostic significance of natural killer cell activity in melanoma patients. In: *NK and other Natural Killers cells*. Ed. Heberman RB 1982:1167. New York Acad Press.

171. Hersey P, Hobbs A, Edwards A, et al. Relationship between natural killer cell activity in histological features of lymphocyte infiltration and partial regression of the primary tumors in melanoma patients. *Cancer Res* 1982;42:363
172. Hersey P, Edwards A, Honeyman M, et al. Low Natural killer cell activity in familial melanoma patients and their relatives. *Br J Cancer* 1979;40:113
173. Haliotis T, Roder J, Klein M et al. Chediak-Higashi gene in humans I. Impairment of natural killer function. *J Exp Med* 1980;151:1039
174. Ramirez R, Solana R, Carracedo J et al. Mechanisms involved in NK resistance induced by interferon gamma. *Cell Immunol* 1992;140:248-286.
175. Chan WC, Link S, Mawle A et al. Heterogeneity of large granular lymphocyte proliferation. Delineation of two major subtypes. *Blood* 1986;68:1142-45
176. Gerosa, F., M. Tommasi, C. Benati. Differential effects of tyrosine kinase inhibition in CD69 antigen expression and lytic activity induced by rIL-2, rIL-12, and rIFN α in human NK cells. *Cell Immunol.* 150: 382-390, 1993
177. Perussia, B., SH. Chan, A. D'Andrea, et al. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR- $\alpha\beta^+$, TCR- $\gamma\delta^+$ T lymphocytes, and NK cells. *J. Immunol.* 149: 3495-3501, 1992
178. Orlando JE, Mason A, Overton R. Lymphokine activated killer cells: analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med* 1986;164:1193-205
179. Ballas, ZK., and W. Rasmussen. Lymphokine-activated killer cells. VII IL-4 induces and NK1.1+CD8 $\alpha\beta^-$ TCR $\alpha\beta$ B220+ lymphokine-activated killer subset. *J Immunol.* 150: 17-30, 1993
180. Caliguri MA, Murray C, Robertson MJ, et al. Selective modulation of natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* 1993;91:123-32
181. Whiteside, TL., S. Miescher, HR. MacDonald and V. Von Fliedner. Separation of tumor-infiltrating lymphocytes from tumor cells in human solid tumors. A comparison between velocity sedimentation and discontinuous density gradients. *J. Immunol Meth.* 1986; 90: 221-233,.
182. Bennett, WT., F. Pandolfi, BH. Grove, GE. Dominant rearrangements among human tumor-infiltrating lymphocytes. Analysis of T-cells derived from 32 patients with melanoma lung, and renal cell carcinoma. *Cancer* 69: 2379-2384, 1992.
183. Berke, G. Functions and mechanisms of lysis induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Fundamental Immunol.* 2da. Ed. pp. 735-760, 1989

184. Smyth M, Norihisa Y, Ortaldo JR. Multiple cytolytic mechanism displayed by activated human peripheral blood T cell subsets. *J Immunol* 1992;148:55-62
185. Apasov, S., F. Redegeld, and M. Sitkovsky. Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors. *Current Op Immunol* 1993;5: 404-410.
186. Cohen JJ, Duke RC, Fadok V et al. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann Rev Imm* 1992;10:267-294
187. Tschopp J, Nabholz M. Perforin mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1990;8:279-302
188. Podack ER, Konisberg PJ. Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1984;160:695-710
189. Masson D, Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 1987; 49:679-85
190. Jonne DE, Tschopp J. Granzymes: A family of serin proteases in granules of cytolytic T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1988;140:33-47
191. Hudig, D., GR. Ewoldt, and SL. Woodard. Proteases and lymphocyte cytotoxic killing mechanisms. *Current Op Immunol* 1993; 5: 90-96
192. Wyllie AH, Cell death. In *Rev Cytol. Supl* 1987;17:755-85
193. Duval E, Wyllie AH. Death in the cell. *Imm Today* 1986;7:115-119
194. Kägi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature (London)* 369: 31-37, 1994
195. Linanfa S, Nishiok JT, Bradbury M et al. *Science* 1994;262:1143-45
196. Ozdermil M, El-Khatib M, Bastiano I, et al. The cytotoxic process of CD4 th1 clones. *J Immunol* 1992;149:1889-95
197. Davis MM, Rjorkman P. T cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature* 1986;344:395-402
198. Weiss A, Imboden J, Hardy K et al. The role of the T3/antigen receptor complex in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1986;4:593-619.
199. Nakamura, M., DT. Ross, TJ. Briner, and ML. Gefter. Cytolytic activity of antigen-specific T cells with helper phenotype. *J Immunol* 136: 44-47, 1986

200. Snyderman, R., MC. Pike, DG. Fischer, and HS. Koren. Biologic and Biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. *J. Immunol.* 119: 2060-2064, 1977
201. Montovani, A., B. Bottazzi, F. Colotta, et al. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* 13: 265-270, 1992
202. Mills GB. Activation of lymphocytes by lymphokines. en *Curr. Top. Memb. Transp.* 35: 495-535, 1990.
203. Arai K-i et al. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 783-836, 1990.
204. Bazan JF. Structural design & molecular evolution of cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1990;87:350-54
205. Bazan JF, Haematopoietic receptor and helical cytokines. *Immunol Today* 1990;11:350-54
206. Harda N et al. Cytokine receptors and signal transduction. *Ann Rev Immunol* 1992;10:295-331
207. Minami Y, Kono T Miyazaki T et al. The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes *Ann Rev Immunol* 1993;11:245-67
208. Darnell JE, Kerr IM, Star GR. Jak Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins. *Science* 1994;264:1415-1420
209. Saltzman EM, White K, Casneille JE. Stimulation of the antigen and interleukin 2 receptors on T lymphocytes activates distinct tyrosine protein kinase *J Biol Chem* 1990;266:609-14
210. Hirak ID, Gress RE, Lucas P et al. T lymphocyte interleukin 2 dependent tyrosine protein kinase signal transduction involves the activation of p56 lck. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1991;88:1996-2000
211. Del Prete, G., M De Carli, F. Almerigogna, et al. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 150: 353-360, 1993
212. Mosmann Cofman RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989;7: 145-173
213. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF a primary mediator of host response. *Ann Rev Immunol* 1989;7: 625-55

214. Beutler, BA., IW. Milsark, and A. Cerami. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol* **135**: 3972-3977, 1985
215. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure homology and chromosomal localization. *Nucleic Acid Res* **1985**;13:6361-73
216. Smith RA, Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* **1987**;263:12816-19
217. Spies T, Morton CC, Nedospasov SA. et al. Genes for the tumor necrosis factor alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986**;83:8699-702
218. Muller U, Jomgenseel CV, Nedospasov SA, et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in mouse major histocompatibility complex. *Nature* **1987**;325:265-67
219. Kaufmann, Heat shock protein and the immune response. *Immunol Today* **11**: 129-136, 1990
220. Kullberg BJ, Vogels MTE, van der Meer JWM. Immunomodulators in bacterial and fungal infections. *Clin Immunother* **1994**;1:43-55
221. Orme, IM., AD. Roberts, JP. Griffin and JS. Abrams. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.* **151**: 518-525, 1993
222. Mutis, T., EM. Kraakman, YE. Cornelisse et al. Analysis of cytokine production by mycobacterium-reactive T cells. Failure to explain mycobacterium leprae-specific nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. *J. Immunol.* **150**: 4641-4652, 1993
223. Ratner, A., and WR. Clark. Role of TNF- α in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *J Immunol* **150**: 4303-4314, 1993
224. Fishman, M., and M. Larche. TNF receptor involvement in TNF-mediated activities against syngeneic malignant and normal mouse thymocytes. *Cell Immunol* **152**: 510-521, 1993
225. Tracey, KJ., SF. Lowry, TJ. Fahey III, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surgery, Gynecol Obstetrics* **164**: 415-422, 1987
226. F. Balkwill, R. Osborne, F. Burke, et al. Evidence for tumour necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet* **28**:1229-1232, 1987

227. Kindler V, Sappino AP, Grau GE et al. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989;56:3762-6
228. Beutler B, Cerami A. Cachectin Tumor necrosis factor: An endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol Res* 1986;5:281-93
229. Helson L, Green S Carswell E. Effect of tumor necrosis factor on cultured melanoma cells. *Nature* 1975; 258:731-32
230. Kim, M., R. Herberman, and E. Gorelik. Increased sensitivity to TNF-mediated cytotoxicity of BL6 melanoma cells after H-2Kb gene transfection. *J. Immunol.* 151: 3467-3477, 1993
231. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors . *Proc. Natl Acad Sci USA* 1975; 72:3666-70
232. Smith KA. Interleukin 2 . *Annu Rev Immunol* 1984;2:319-33
233. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T. Molecular analysis of the interleukin 2 system. *Immunol Rev* 1986;92:121-23
234. Whittington, R., and D. Faulds. Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. *Drugs* 46: 446-514, 1993
235. Waldmann TA, Goldman CK, Robb RJ et al. Expression of interleukin 2 receptor on activated human human B cells. *J Exp Med* 1984;160:1450-66
236. Sznol, M., and DR. Parkinson. Interleukin-2 in therapy of hematologic malignancies. *Blood* 83: 2020-2022, 1994
237. Rosemberg SA, Lotze MT, Muul LM et al. Experience with the use of high dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patientes. *Ann Surg* 1989; 210:464-85.
238. Rosemberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. A progress report on the treatment of 157 patientes wuth advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987; 316:889-97.
239. Rosemberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Combination therapy with interleukin-2 and alpha-interferon for treatment of patientes with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1863-74.
240. Pockaj, BA., SL. Topalian, SM. Steinberg, et al. Infectious complications associated with interleukin-2 administration: A retrospective review of 935 treatment courses. *J. Clin. Oncol.* 11: 136-147, 1993

242. Pastka S, Langer JA, Zoon KC. Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 1987;56:727-77
243. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2: Different patterns of Lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1991;7:145-70
244. Gaajewski TF, Joyce J, Fitch FW, et al. Antiproliferative effect of IFN gamma in immune regulation III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and IFN gamma. *J Immunol* 1989;143:15-22
245. Borden EC, Fall LA. Interferons; biochemical, cell growth, inhibitory and immunological effects. *Prog Hematol* 1981;350:1-64
246. Wheelock EF. Interferon like virus inhibition induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 1965;149:310-11
247. Naylor SL, Sakaguchi AY, Shones TB, et al. Human immune interferon gene is located on Chromosoma 12. *J Exp Med* 1985;134:977-81
248. Basan TY, Merigan TC. Recombinant interferon-gamma increases HLA DR syntesis and expression. *J Immunol* 1983;130:1492-94
249. Henko K, Bresius J, Fujisawa A et al. Structural relationship of human interferon alfa genes and pseudogenes. *J. Molec Biol* 1985;185:227-60
250. De Grado awf, Wasserman ZR, Chowd HRY. Sequence and structural homologies among type I and type II interferon. *Nature* 1991;300:379-81
251. Trent JM, Olson S, Lown RM. Chromosomal localiation of human leukocyte, fibroblast and immune interferon genes by means of in situ hibridization. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1982;79:7809-13
252. Zoon KC, Miller D, Beckisz J. et al. Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon alpha. *J Biol Chem* 1992;267:15210-16
253. Trichieri G, Perussia B. Immune interferon: A pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 6:131-6
254. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11:571-611
255. King DP, Jones PP. Induction of Ia and H-2 antigen on macrophage cell line by immune interferon. *J Immunol* 1983;131:315-18
256. Alfaro G, Lomeli C Ocadiz R et al. Immunologic and genetic characterization of S180, a cell line of murine origin capable of growing in different inbred strains of mice. *Vet. Immunol. Immunopath.* 30: 385-398, 1992.

257. Nava G, Ocadiz R, Ortega V, Alfaro G.. Damage in B2m genes and DNA methylation of H-2 genes are involved in the loss of expression of class I MHC products on the membrane of LR.4, a cell line derivative of the T-cell lymphoma L5178Y. *Eur. J. Immunogenet.* 1992; 19: 141-158,
258. Alfaro G, Nava G, Verastegui E. Specific recognition and rejection of the H-2 deficient cell line LR.4 by C57BL/6J mice. *J Cell Bioch Suppl* 1993;17D:121
259. Koh H.K. Cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 1991;325:171-182.
260. Rohdes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, et al. Risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 1987;258:3146-54.
261. Green A. Incidence and reporting of cutaneous melanoma in Queensland. *Australian J Dermatol.* 1982;23:105-109.
262. Balch CM, Shaw HM, Soong S-j et al. Changing trends in the clinical pathological features of melanoma. In Balch CM, Milton GW (eds): *Cutaneous Melanoma: Clinical Management and treatment Results Worldwide.* 1985:313.
263. Balch, CM., AN. Houghton, and LJ. Peters. Cutaneous melanoma. Cancer: *Principles & Practice of Oncology*, 4ta. Ed. pp 1612-1661, 1993.
264. Elder D. Dysplastic nevus syndrome-Biological significance. *Seminars in Oncology.* 1988;15:529-540.
265. Loggie BW, Eddy JA. Solar considerations in the developpmment of cutaneous melanoma. *Seminar in Oncology.* 1988;15:494-499.
266. Holman CDJ, Armstrong BK, Heenan PJ. Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight-exposure habits. *J Natl Cancer Inst.* 1986;76:403-14.
267. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum: cutaneous, ocular and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* 1987;123:241-50.
268. Bale SJ, Dracopoli NC, Trucker MA et al. Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *N Engl J Med* 1989;320:1367-72
269. Dracopoli NC, Harret P, Bale SJ et al. Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4614-4618
270. Dracopoli N, Bale SJ. Genetic aspects of cutaneous malignant melanoma. *Seminars in Oncology* 1988;15:541-548.

271. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705-27

272. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of the invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-8

273. Fitzpatrick TB, Szabo G. The melanocyte: cytology and citochemistry. *J Invest Dermatol* 1959;32:197-209

274. Herlyn M, Clark WH, Rodeck U. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987;56:461-74

275. Walker, MJ. Role of hormones and growth factors in melanomas. *Sem. Oncol.* 15: 512-523, 1988.

276. Woodruff JM, Pathology of malignant melanoma:Part I. *Clin Bull.* 1976;6:15-30

277. Mihm MC, Clark WH, From L. The clinical diagnosis, clasification and histogenetic concepts of the early stages of cutaneous melanoma. *N Eng J Med* 1971;284:1078-1080.

278. Clark WH, Ainsworth AM, Bernardino EA, et al. The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Semin Oncol* 1975;2:83-90

279. Ronan, SG., MC. Han and TK Das Gupta. Histologic prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma. *Sem. Oncol.* 15: 558-565, 1988

280 Kopf AW, Gross DF, Rogers GS, et al. Prognostic index for malignant melanoma. *Cancer* 1987;59:1236-41287.Salmeron, MA., CM.

281. Burnier, MN., IW. McLean, and JW. Gamel. Immunohistochemical evaluation of uveal melanocytic tumors. *Cancer* 68: 809-814, 1991

282. Ollert, MW., JV. Kadlec, EC. Petrella, R. et al. Molecular basis of complement resistance of human melanoma cells expressing the C3-cleaving membrane protease p65¹. *Cancer Res.* 1993;53: 592-599.

283. Slingluff, CL., Cos L, Henderson RA, et al. Recognition of human melanoma cells by HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes is mediated by at least six shared peptide epitopes. *J Immunol.* 150: 2955-2963, 1993

284. Leong, SPL., Granberry ME, Zhou YM et al. Selection of cytotoxic T lymphocytes against autologous human melanoma from lymph nodes with metastatic melanoma using repeated in vitro sensitization. *Clin. Expl. Metastasis* 9: 301-317, 1991

285. Traversari C et al. A nonapeptide encoded by human MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 1992;176: 1453-1457.

286. Rosenberg, SA. Principles and applications of biologic therapy. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 4ta. Ed. pp293-320, 1993

288. Viret C. et al. Recognition of shared melanoma by HLA-A2-restricted cytolytic T cell clones derived from human tumor-infiltrating lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 141-146.

289. Kageshita, T., M. Temponi, U. Kekish, et al. Human high molecular weight melanoma associated antigen as a target for active specific immunotherapy. A phase I clinical trial with murine antiidiotypic monoclonal antibodies. *Molecular Probes: Technology and Medical Applications*. pp.245-261, 1989

290. Presant CA, Bartolucci AA. Prognostic factors in metastatic malignant melanoma: the Southeastern Cancer Study Group experience. *Cancer* 1982;49:2192-6.

291. Urist MM, Balch CM, Soong SJ, et al The influence of surgical margins and prognostic factors predicting the risk of local recurrence in 3445 patients with primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1985;55:1398-402

292. Balch CM. Excising melanomas: how wide is enough? And how to reconstruct? *J Surg Oncol* 1990;44:135-37

293. Cady B. "Prophylactic lymph node dissection in melanoma: does it help?." *J Clin Oncol* 1988;6:2-4

294. Overgaard J. The role of radiotherapy in recurrent and metastatic malignant melanoma. : a clinical radiobiologic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12:867-72

295. Eilber FR, Morton DL, Homes EC et al. Adjuvant immunotherapy with BCG in treatment of regional lymph node metastases for malignant melanoma. *N Engl J Med* 1976;294:237-40

296. Veronesi U, Adamus J, Aubert C et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy and immunotherapy in cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 1982;307:913-916

297. Splitter LE. A randomized trial of levamisole versus placebo as adjuvant therapy in malignant melanoma. *J Clin Oncol* 1991; 9:736-40

298. Quirt IC, Shelley ME, Peter JL et al. Improved survival in patients with poor prognosis malignant melanoma treated with adjuvant levamisole: a phase III study by the National Cancer Institute of Canada Trials Group. *J Clin Oncol* 1991;9:729-35

299. Creagan ET. Regional and systemic strategies for metastatic malignant melanoma. *Mayo Clin Proc* 1989;64:852-60
300. Shea TC, Antman KH, Eder JP et al. Malignant melanoma: treatment with high dose combination alkylating agent chemotherapy and autologous bone marrow support. *Arch Dermatol* 1988; 124:878-84.
301. Malcolm, SM., W. Harel, RA. Kempf, et al. Active-specific immunotherapy for melanoma. *J Clin. Oncol.* 8: 856-869, 1990.
302. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D IV, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1893-904
303. Balch CM, Soongs SJ, Murad TM. et al. A multifactorial analysis of melanoma III. Prognostic factors in melanoma patients with lymph node metastasis (stage II) *Ann Surg* 1981;193:377-88
304. Balch CM, Soongs SJ, Murad TM. et al. A multifactorial analysis of melanoma IV. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastasis (stage III). *J Clin Oncol* 1983;1:126-34.
305. World Health Organization. BCG vaccination policies. *WHO Tech. Report Series* 1980;652
306. Pacheco CR, Vazquez RV, Badillo N. Vacuna del bacilo Calmette y Guerin (BCG) In: *Vacunas Ciencia y Salud. Secretaria de Salud* 1992;12:187-201.
307. Lozzio BB, Lozzio CB, Bamnberger E et al. A multipotential leukemic cell line (K52) of human origin. *Proc Soc Exp Biol* 1981;166:546-550
308. Cikes M, Firber S, Klein G. Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell surface antigen (s) determined by Moloney Leukemia virus in cultured murine lymphomas. *J. Natl Cancer Inst* 1973;50 347-50
309. Hart IR Selection and characterization of an invasive variant of B16 melanoma. *Am J Pathol* 1979;97:587-600
310. Ficoll-Hypaque: For in vitro isolation of lymphocytes (booklet). 1983. Pharmacia. Uppsala, Sweden.
311. Kruisbeek A. Isolation of mouse mononuclear cell. Preparation of cell suspensions from spleen, thymus and lymph nodes. En: *Current Protocols in Immunology*. (Coligan JE et al, NIH Ed) 1991;1:3.1.1-3.1.5. Wiley Interscience NY

312. Kruisbeek A. Proliferative assays for T cell functions. Blocking cellular division of accessory/stimulatory cells. T cell proliferation in mixed lymphocyte cultures. En: **Current Protocols in Immunology**. (Coligan JE et al, NIH Ed) 1991;1:3.12.6-3.12.7 y 3.12.8-3.12.9. Wiley Interscience NY

313. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC et al. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr labeled allogenic target cells in vitro: Inhibition by isoantibody and by drugs. **Immunology** 1968;14:181-96

314. Grabstein K and Cheng Y.U. Cell mediated cytotoxic responses. en **Selected methods in cellular immunology** (BB Mishell et al Ed) 1980;124-137. WH Freeman NY

315. Mule JJ y Rosenberg SA. Isolation of cell populations containing NK cells and LAK precursor cells. pp 7.7.1-7.7.5 En: **Curr. Prot. Immunol.** Ed. Cooligan JE et al. 1991.

316. Mirshell BB, Shiigi SM. Modification and use of antibodies to label cell surface antigens. En: **Selected methods in Cellular Immunology**. 1980;287-304. WH Freeman, San Francisco.

317. Yokoyama WM. Flow cytometry analysis using the Beckton Dickinson FACScan. pp 5.4.1.-5.4.15 En: **Curr. Prot. Immunol.** Ed. Cooligan JE et al. 1991.

318. Andersson M, Pääbo S, Nilson T and Peterson PA. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenovirus to evade immune surveillance. **Cell** 1985;43:215-222

319. Robinson MK, Wheelock F. Synergistic cytolytic activity by combined population of peritoneal macrophages during L5178Y cell dormant state in DBA/2 mice. **Cell Immunol** 1982;73:230-46

320. Robinson MK, Wheelock F. Identification of macrophage-mediated cytolytic activity as a tumor suppressive mechanism during maintenance of the L5178Y tumor dormant state in DBA/2 mice. **J Immunol** 1981;126:673-79

321. Mizoguchi H, O'Shea DL, Longo CM, et al. Alteration in signal transduction molecules in T lymphocyte from tumor-bearing mice. **Science** 1992;258:1795-98

322. Mosmann TR. Cytokine patterns during progression of AIDS. **Science** 1994;265:193-94

323. Abe R, Hodes R. T cell recognition of minor lymphocyte stimulating (MIs) gene products. **Annu Rev Immunol** 1989;7:683-707.

324. Herman A, Kappler JW, Marrak P, Pullen AM. Superantigens: Mechanism of T cell stimulation and role in immune response. **Annu Rev Immunol** 191;9:745-72

325. Kariv, I., F.G. Ferguson, and F.L. Confer. Age- and strain-related differences in murine spleen cell responses to different activation signals. *Cell Immunol.* 1992, 140: 67-80
326. McCormick, A., and J. Campisi. Cellular aging and senescence *Curr. Op. Biol.* 1991, 3: 230-234
327. Gahring, L.C., and W.O. Weigle. The effect of aging on the induction of humoral and cellular immunity and tolerance in two long-lived mouse strains. *Cell Immunol* 1990, 128: 142-151
328. Saltzman, R.L., and P.K. Peterson. Immunodeficiency of the elderly. *Rev. Infect. Dis.* 1987, 9: 1127-1139
329. Kay, M.M.B. Autoimmunity and aging. *Concepts Immunopathol* 1991, 6: 166-192
330. Thoman, M.L., and W.O. Weigle. The cellular and subcellular bases of immunosenescence. *Adv. Immunol.* 1989, 46: 221-261
331. Vitale, M., L. Zamal, L.M. Neri., et al. The impairment of natural killer function in the healthy aged is due to a postbinding deficient mechanism. *Cell Immunol* 1992, 145: 1-10
332. Krishnaraj, R. Negative modulation of human NK cell activity by purinoceptors 2. Age-associated, gender-specific partial loss of sensitivity to ATP. *Cell Immunol* 1993, 144: 11-21
333. Schmidt, R.M., Wu, M., et al. Health watch: A longitudinal prospective study of healthy aging in 2200 individuals. I. Preliminary analysis of biochemical, hematological, and physiological data for males and females. Application to the care of older patients.
334. Alfaro G, Verastegui E, Nava G et al. Age related differences in the capacity to develop cell mediated immune response in C57BL/6J mice. *J Cell Bioch. (Suppl)* 1994; 18D:380
335. Whisler, R.L., L. Beiqing, L-C. Wu. Reduced activation of transcriptional factor AP-1 among peripheral blood T cells from elderly humans after PHA stimulation: restorative effect of phorbol diesters. *Cell Immunol* 1993, 152: 96-109
336. Li, S.K., and R.A. Miller. Age-associated decline IL-4 production by murine T lymphocytes in extended culture. *Cell Immunol* 1993, 151: 187-195
337. Kirschmann, D.A., and M. Murasko. Splenic and inguinal lymph node T cells of aged mice respond differently to polyclonal and antigen-specific stimuli. *Cell Immunol.* 1992, 139: 426-437

338. Bloemena E, Gall H, Ranson JH et al. Delayed type hypersensitivity reaction to tumor associated antigens in colon carcinoma patients immunized with an autologous tumor cell/bacillus Calmette Guerin vaccine. **Cancer Res** 1993;53:456-59.
339. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR et al. New use of BCG for recombinant vaccines. **Nature** 1991;351:456-460
340. Quirt IC, Shelley W, Pater JL et al. Improved survival in patients with poor prognosis malignant melanoma treated with adjuvant levamisole: A phase III study by the National Cancer Institute of Canada Clinical trial group. **J Clin Oncol** 1991;9:729-735.
341. Herr HW, Wartinger DP, Fair WR, et al. Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: A 10 year follow-up. **J Urol** 1992;147:1020-1023
342. Herman RF, Lindeman A, Mertelsmann R. Experimental and clinical evaluation of cytokines. **Mol Probes: Technology and Medical applications** pp 203-213, 1989
343. Kedar E, Klein E. Cancer Immunotherapy are the results discouraging? can they be improved? **Adv Cancer Res** 1992;53:245-321
344. Richards JM. Sequential chemoimmunotherapy for metastatic melanoma. **Sem Oncol** 1991;18:91-95
345. Dutcher JP, Gaynor ER, Boldt DH et al. A phase II study of high dose continuous infusion Interleukin-2 with lymphokine activated killer cells in patients with metastatic melanoma. **J Clin Oncol** 1991;9:641-648
346. Mastrangelo MJ, Schultz S, Kane M, Berd D. Newer immunologic approaches to the treatment of patients with melanoma. **Sem Oncol** 15;1988: 589-94
347. Creagan ET, Kovach JS, Moertel CG et al. A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. **Cancer** 1988;62:2467-2471
348. Mitchell Ms, Combining chemotherapy with biological response modifiers in treatment of cancer. **J Natl Cancer Inst** 1988;80:1445-50
349. Pardoll D. New strategies for active immunotherapy with genetically engineered tumor cells. **Curr Op Immunol** 1992;4:619-623
350. Klein E, Mantovani A. Action of natural killer cells and macrophages in Cancer. **Curr Op Immunol** 1993;5:714-718
351. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. **Science** 1994;6:346-35.