actuales del desarrollo neoplásico.

El devenir de los acontecimientos que provocan la aparición de una neoplasia, generalmente se divide en tres estadios: iniciación, promoción y progresión (Pitot y cols. 1981).

A.- EL ESTADIO DE INICIACION

La iniciación es un corto intervalo, durante el cual un agente carcinogénico puede inducir un cambio en una célula, que queda predispuesta a la transformación maligna. La iniciación es aceptada generalmente, como un proceso en el que se induce una lesión irreversible en el DNA de la célula madre, que la hace susceptible a la acción de un agente promotor. A nivel clínico, se conoce esta situación como un estado preneoplásico: displasia severa o carcinoma "in situ"; alteraciones que pueden persistir durante muchos años antes de convertirse en tumores.

1.- Factores genéticos.

La evidencia de que la iniciación es el resultado de una alteración en el genoma celular se basa en el hecho de que el único o principal mecanismo de acción de todos los carcinógenos físicos, químicos y biológicos conocidos, es su facultad para alterar la estructura del DNA. La imposibilidad de concluir que tales alteraciones son absolutamente necesarias para la transformación neoplásica reside en la falta de conocimientos sobre lo que sucede entre la -

reacción inicial del carcinógeno o su forma activada y la - aparición final de un tumor identificable. A continuación - vamos a describir brevemente algunos de los hechos básicos_ que apoyan la tesis del proceso de iniciación como resultan_ te de la alteración en la estructura del DNA celular.

El proceso de iniciación es un fenómeno irreversi_ ble, heredado por la progenie de las células que ya lo han_ sufrido y con efectos aditivos por parte del o de los agen- tes iniciadores (Scribner y Süss, 1978). Los estudios reali_ zados hasta la fecha sobre la inducción de neoplasias con - radiaciones ionizantes (Todaro y Gree, 1966) y dosis únicas de carcinógenos químicos (Scherer y Emmelot, 1975) indican_ que la iniciación sigue una cinética de lesión puntual o - simple en el genoma celular. El proceso de iniciación no - presenta un efecto umbral medible ni una respuesta máxima - dentro de los límites de toxicidad de las poblaciones celu- lares expuestas (Peto y cols., 1982).

2.- Factores epigenéticos.

Muchos carcinógenos químicos requieren varias eta_ pas metabólicas de "activación" dentro de la célula, antes_ de poder iniciar la transformación neoplásica (Miller, - 1973); las diferencias de especie y tisulares en la efecti- vidad de la iniciación, probablemente sean el resultado de_ variaciones en la dotación enzimática requerida para el pro_ ceso de activación del carcinógeno (Weisburger y Williams,_ 1982). Además, el carácter genético de una célula determina_ da puede incrementar o reprimir los efectos iniciadores de_

distintos carcinógenos (German, 1972). Por último, debemos añadir que la iniciación del proceso neoplásico, según han demostrado algunos estudios in vitro (Bertram y Heidelberger, 1974; Grisham y cols., 1980), es más efectivo durante la fase S del siclo celular, de forma que la división celular activa parece un requisito para que el fenómeno de iniciación quede "fijado" en la célula que va a sufrir transformación maligna.

B.- EL ESTADIO DE PROMOCION

La promoción consiste en un período más prolongado, en el que repetidas exposiciones a un agente activo, puede determinar dicha transformación. Los efectos del promotor sobre células no iniciadas suelen ser reversibles, y para actuar sobre células iniciadas deben superar determinados umbrales de dosis. Los promotores incluyen diversos compuestos, entre los que se encuentran la sacarina y el fenobarbital. En algunos casos, se ha observado que los factores del crecimiento también pueden actuar como agentes promotores.

1.- Factores genéticos.

En 1981, Emerit y Cerutti demostraron al menos una serie de agentes promotores tumorales, los ésteres activos de forbol; tenían una acción aparentemente indirecta sobre la estructura del DNA, propiedad no tenida en cuenta hasta entonces para este tipo de agentes. La adición de tetrahidrodecanoil forbol acetato (TPA) a cultivos de linfoci

tos, induce la formación de aberraciones cromosómicas y roturas en las hebras del DNA (Birnboim, 1982), a través de un mecanismo que puede inhibirse reprimiendo la producción en el sistema de radicales oxigenados activos. Cuando se introducen in vivo inhibidores de la formación de tales radicales oxigenados, se pueden yugular también los efectos de promoción tumoral que tienen lugar tras la aplicación del TPA (Kozumbo y cols., 1983).

Si, por una parte, estos estudios sugieren que al menos este tipo de agentes promotores ocasionan, bien que indirectamente, cambios estructurales en el genoma celular, por otra queda por saber aún si estas alteraciones son críticas para el estado de promoción tumoral o son más bien importantes en la transición de esta fase a la de progresión, etapa final en la historia natural del desarrollo neoplásico.

2.- Factores epigenéticos.

La promoción tumoral es un proceso esencialmente epigenético, al menos teniendo en cuenta la evidencia experimental aportada hasta ahora. Los efectos de los agentes promotores son en su mayoría reversibles y no aparecen como resultado de fenómenos aditivos, sino más bien tras la exposición crónica al agente promotor (Boutwell, 1964).

A pesar de algunos trabajos que sugerían la posibilidad de que ciertos agentes promotores se comportaran como carcinógenos completos (capaces de iniciar y promover el

crecimiento tumoral), investigaciones posteriores han demostrado que estos agentes son incapaces de inducir per se un proceso de iniciación, puesto que en los casos dudosos existe siempre un fondo de células que han sido iniciadas de forma fortuita (Schulte-Hermann y cols., 1983; Slaga y cols 1982). Así pues, la promoción sólo es efectiva cuando sigue a la iniciación y puede ser modulada por factores ambientales como la edad, el sexo, la dieta, etc., algunos de los cuales inhiben el proceso completamente y otros actúan en dirección inversa (Berenblum y Shubik, 1947).

Todos los agentes promotores se caracterizan por su facultad de alterar la expresión genética de las células sobre las que ejercen sus efectos (Boutwell, 1974), probablemente a través de la mediación de receptores celulares específicos (Horowitz y cols., 1981; Poland y cols., 1976).

Queda por decir que la promoción tumoral presenta un efecto umbral medible, así como una respuesta máxima objetivable (en la tasa de aparición de neoplasias) dentro de los límites tóxicos del agente para las poblaciones celulares expuestas (Van Duuren y cols., 1973).

C.- EL ESTADIO DE PROGRESION

En 1964 Foulds enunció los fenómenos fundamentales que caracterizan el estadio de progresión tumoral. Estos incluían la invasión de tejidos vecinos, las metástasis, incremento en la tasa de crecimiento, anaplasia y disminución de la respuesta a factores reguladores tales como hor-

monas. Actualmente, el estado de progresión tumoral se define por un hecho citogenético básico: la aparición de alguna alteración demostrable en el cariotipo celular (Pitot y cols., 1981), es decir, la progresión es el resultado de una o más alteraciones genéticas demostrables.

El factor epigenético más sobresaliente que opera en la progresión tumoral es el efecto del medio ambiente sobre la selección de una o más variantes cariotípicas celulares (Nowell, 1982; Gootwine y cols., 1982); sin embargo, queda por determinar el grado en que dicha selección depende de los cariotipos anormales presentes en la población celular o más bien de factores ambientales aún no definidos.

Teóricamente, la progresión tumoral es un proceso infinito, pero en la práctica termina con la muerte del paciente.

En resumen, la historia natural del desarrollo neoplásico puede comenzar con la aparición de una alteración sutil en el genoma, seguida por la expresión crónica de este genoma alterado, hasta que un segundo tipo de alteración provoca un cambio más grosero en la estructura genómica, dando como resultado una neoplasia maligna.

D.- EL ESTADIO DE REGRESION TUMORAL: UNA PRIMERA VIA ALTERNATIVA EN LA HISTORIA NATURAL DEL PROCESO NEOPLASICO

La regresión tumoral espontánea tiene lugar, aunque raras veces, tanto en animales como en humanos. A pesar

de ello. Desde 1975 contamos con modelos experimentales que aportan una base científica a estos fenómenos ocasionales. Ya hemos comentado los trabajos de Papaioannou y cols. y de Mintz e Illmensee, demostrando la diferenciación normal de células teratocarcinomatosas al inyectarlas en blastocistos embrionarios murinos.

En 1982 Sachs y cols. demostraron que factores normales producidos en el ratón pueden estimular la diferenciación de células leucémicas murinas cuando éstas se inyectan en embriones de 10 días de gestación, de forma que aquéllas pierden su potencial leucémico y pueblan como células normales la médula ósea de los ratones receptores.

Parece que la regulación de las células teratocarcinomatosas por el microambiente embrionario tiene más éxito cuando dichas células están aún en un estadio de promoción, sin presentar anormalidades cariotípicas evidentes (Stewart y Mintz, 1981). Sin embargo, es posible inducir la diferenciación química de carcinomas embrionarios murinos in vivo, así como la de leucemias murinas y humanas in vitro cuando las células neoplásicas presentan un cariotipo aneuploide (Speers, 1982; Fibach y cols., 1982; Friend y Freedman, 1978).

Así pues, mientras la historia natural del proceso neoplásico procede normalmente a través de los tres estadios mencionados, en determinadas circunstancias, de las cuales solamente algunas están definidas, las células neoplásicas, bien en fase de promoción, o en la de progresión,

pueden ser inducidas por factores ambientales hacia proce - sos de diferenciación normales, desapareciendo los procesos metabólicos y divisiones celulares anormales.

E.-LA FORMACION DE LESIONES "PRENEOPLASICAS": UNA SEGUNDA - VIA ALTERNATIVA EN LA HISTORIA NATURAL DEL PROCESO NEO - PLASICO

Las lesiones preneoplásicas (no deben confundirse con lesiones premalignas) se conocen desde hace muchos años en el ser humano, e incluyen el fenómeno de la leucoplaquia la atrofia gástrica y determinadas queratosis de la piel - (Dunham, 1972). Tales lesiones per se no son de tipo neoplá sico, pero las células que las sufren presentan una inciden cia de transformación maligna llamativamente más alta que - sus correlatos tisulares normales.

En animales experimentales, los nódulos hiperplá- sicos hepáticos inducidos por varios tóxicos, son uno de - los ejemplos más característicos de tales lesiones preneo - plásicas. La mayor parte de tales nódulos sufren un proceso de regresión, pero en algunas circunstancias avanzan hasta transformarse en lesiones francamente malignas (Teebor y - Becker, 1971).

F.- EXPRESION ONCOGENICA DURANTE LOS ESTADIOS DEL DESARRO - LLO NEOPLASICO.

Los oncogenes son candidatos de primer orden en - cuanto agentes potencialmente inductores de alteraciones en

el DNA que conducen directamente a la transformación neoplásica. Por ello, reviste gran importancia conocer el grado de activación oncogénica en cada uno de los estadios del desarrollo tumoral.

Ya comentamos en la sección dedicada a oncogenes, que uno de los mecanismos de disrregulación oncogénica era la mutación puntual en un exón codificador, y anotábamos que ésto había sido confirmado en el caso del oncogen H-ras. La mutación y consiguiente activación de ese oncogen provoca la iniciación neoplásica en las células afectadas. Land y cols. (Land y cols., 1983) han demostrado la activación de dos oncogenes cooperantes en la transformación neoplásica de fibroblastos embriónicos frescos.

Las características del estadio de promoción no parecen ser propicias para que en él tengan lugar cambios estructurales en los oncogenes celulares que jueguen un papel preponderante. El TPA puede ocasionar amplificación génica, pero sólo en poblaciones celulares aneuploides (Hayashi y cols., 1983).

Parece que es en el estadio de progresión donde la activación oncogénica juega un papel más significativo: virtualmente todos los experimentos de transfección se llevan a cabo con oncogenes activados; por otra parte, los virus RNA y DNA que poseen sus propios oncogenes, transforman rápidamente las células, tanto in vivo como in vitro, de forma que la fase de promoción queda prácticamente eliminada. Con algunas excepciones, la demostración de activación

oncogénica en neoplasias químicas y físicamente inducidas, - ha tenido más éxito cuando éstas estaban en el estadio de - progresión (Cooper, 1982).

En cuanto al estadio de regresión tumoral, cuando se induce la diferenciación terminal de la línea celular - leucémica HL-60 con varios mediadores químicos, la expre - sión de c-myc se reduce de forma llamativa. Este fenómeno - ha sido confirmado induciendo la diferenciación de dicha lí nea con un metabolito de la vitamina D (Reitsma y cols., - 1983). Así pues, la regresión tumoral, al menos desde el es tadio de progresión, podría conllevar la "desactivación" de oncogenes específicos.

IV.- EL CONTROL ENDOGENO DEL PROCESO NEOPLASICO: INMUNOVIGI - LANCIA.

A.- LA HIPOTESIS DE LA INMUNOVIGILANCIA

Han sido muchos los investigadores que en su mo - mento propusieron la idea de que el sistema inmune tiene - una función general en la prevención o limitación del creci miento tumoral. El concepto básico de esta idea, conocido - como "hipótesis de la vigilancia inmune", postula que el - sistema inmune juega un papel central en la resistencia - frente al desarrollo de tumores detectables.

Las primeras manifestaciones conocidas a este res pecto, parten de Paul Ehrlich en 1909 (Ehrlich, 1957). La - formulación moderna de la hipótesis la llevó a cabo Thomas

en 1959. Cuando se conocieron las características básicas de la inmunidad timodependiente y el papel básico que las células T juegan en el rechazo de homoinjertos, fue modificada la teoría de la inmunovigilancia por Burnet, para resaltar la función esencial del sistema inmune celular específico como mecanismo efector en la resistencia antitumoral (Burnet, 1970).

A partir de estas formulaciones originales, la hipótesis de la inmunovigilancia ha generado gran número de estudios experimentales, pero también innumerables discusiones y controversias. Una de las razones de la disensión surge como consecuencia de la serie de predicciones que la hipótesis implica. Veamos algunas de ellas:

1) Las células tumorales debieran tener antígenos de tipo trasplante.

2) La resistencia frente a tumores sería una reacción T-dependiente y análoga a la del rechazo del injerto.

3) Existiría una vinculación evolutiva muy estrecha entre malignidad y desarrollo de un sistema inmune capaz de rechazar los tumores.

4) La depresión inmune deberá asociarse e incluso preceder al desarrollo de tumores detectables.

5) La inmunosupresión sería un requisito en la acción de los carcinógenos y/o promotores tumorales.

La predicción nº 4 ha resultado ser la que más evidencias experimentales ha apuntado para apoyar la teoría de la inmunovigilancia, puesto que la inmunodepresión indu-

cida o natural parece asociarse a una incidencia más alta - de algunos tipos de tumores, tales como aquellos inducidos por virus oncogénicos, de forma que la timectomía neonatal y otras formas de inmunosupresión, conducen a un incremento de la susceptibilidad a tumores inducidos por virus del polioma en ratones (Law, 1966) y a la enfermedad de Marek en pollos (Payne, 1972).

Existen también considerables evidencias clínicas de que las inmunodeficiencias se asocian a una incidencia - mucho más alta que en la población normal de leucemias y - linfomas (Gatti y Good, 1971). Los pacientes con alotrans - plantes, sometidos a terapia inmunosupresora, también pre - sentan una tasa elevada de tumores (unas 100 veces mayor - que la población normal) (Penn y Starzl, 1972). Lo mismo - ocurre en enfermos con cánceres, artritis y otras enfermedades tratadas con agentes inmunosupresores (principalmente - agentes alquilantes) (Roberts y cols, 1976). Las observaciones, más recientes, respecto a la elevada incidencia de Sarcoma de Kaposi en adultos jóvenes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida sería una indicación más de la asocia - ción entre malignización e inmunodepresión.

A pesar de todas estas evidencias parciales, la - hipótesis, tal y como aquí ha sido formulada, tiene limitaciones, algunas de ellas muy importantes:

1) La mayoría de los tumores humanos asociados - con la inmunodepresión son leucemias y linfomas, más que - otros tipos de neoplasias de aparición espontánea más fre -

cuente.

2) La asociación entre inmunodepresión y aparición de tumores no es sistemática, sino más bien esporádica.

3) La timectomía neonatal en ratones conlleva una menor incidencia de tumores mamarios (Yunis y cols., 1969). Por otra parte, la incidencia de tumores espontáneos o inducidos químicamente en ratones desnudos o eutímicos es similar (Stutman, 1975).

4) En la mayor parte de los tumores espontáneos en animales de experimentación, no se detectan antígenos de transplante asociados con tumores (Hewitt y cols., 1976).

5) Asímismo, parece existir una disociación evolutiva entre la aparición de tumores y el desarrollo de un sistema inmune sofisticado (Cooper, 1976).

Estos hechos llevaron a Klein y Klein (1977) a sugerir que la inmunovigilancia sería operativa únicamente frente a tumores inducidos por virus oncogénicos, los cuales poseen antígenos de transplante frente a los que las células T representan un mecanismo de defensa importante. Otros investigadores han llegado incluso a negar que exista una vigilancia inmune antitumoral específica (Nossal, 1980), mientras que otros, en el extremo opuesto, sugerían que el sistema inmune operaba fundamentalmente como inductor de la promoción y el crecimiento tumoral (Prehn y Lappe, 1971).

La explicación de estos resultados tan discordantes probablemente resida en la variedad de mecanismos operativos que el huésped puede desarrollar frente a un tumor determinado. De forma que la inmunidad mediada por células T

sería sólo uno de los mecanismos de defensa posibles. Por otra parte, existen en las células tumorales diana estructuras moleculares distintas a los antígenos de transplante, que podrían ser reconocidas por otros tipos de células efectoras, de forma que en individuos con deficiencias en sus células T, serían operativos sistemas alternativos de inmunidad natural, capaces de oponer una resistencia efectiva al crecimiento tumoral.

B. POSIBLES MECANISMOS EFECTORES DE LA INMUNOVIGILANCIA

1.- Células T.

El mecanismo de vigilancia antitumoral descrito por Burnett tenía su apoyo argumental en dos observaciones básicas: a) la presencia de estructuras antigénicas asociadas a los tumores o específicas de éstos en la membrana de las células neoplásicas, y b) la posibilidad de inducir una respuesta inmune frente a tales antígenos. Sin embargo, como ya hemos comentado, la mayoría de los estudios clínicos o experimentales han puesto de manifiesto que muchas de las predicciones implicadas en la hipótesis formulada por Burnett no se cumplen. Si la mayoría de tumores espontáneos que aparecen en individuos inmunocompetentes presentan una antigenicidad muy débil (Bartlett, 1972), hecho compatible con la teoría de la inmunovigilancia, no es menos cierto que los tumores espontáneos surgidos in vitro en ausencia de presión inmune (Prehn, 1970), en vitros inmunológicamente privilegiados (Prehn, 1976) o en huéspedes inmunodeficientes (Gleichmann y Gleichmann, 1973) tienen también, en

general, un poder inmunógeno muy pobre.

Los tumores inducidos por carcinógenos químicos o virus en huéspedes normales o inmunodeficientes, pueden ser fuertemente inmunogénicos (Bartlett, 1972; Schwartz, 1975); sin embargo, la inyección en un receptor singénico de una pequeña dosis de células tumorales inmunogénica, no conduce a menudo, a la lisis tumoral inmune, mientras que la inyección de una dosis mayor provoca su rechazo (Moller y Moller 1978; Prehn, 1976). Este fenómeno ha sido invocado como un argumento en contra de la inmunovigilancia por células T de pequeños tumores focales inmunogénicos. No obstante, Gatenby y cols. en 1981, apuntaron que el fenómeno no se debería a una alteración en la capacidad de estimular linfocitos T citotóxicos (CTL), sino a la generación de linfocitos T supresores que inhibirían secundariamente el desarrollo de una respuesta CTL. En cualquier caso, queda la evidencia de que una respuesta primaria débil puede facilitar más que inhibir el crecimiento tumoral (Prehn, 1976).

Ya hemos comentado en la introducció a esta sección que un argumento muy importante frente a la inmunovigilancia celular T es que no existe un incremento en la incidencia de la mayoría de los tumores en pacientes inmunosuprimidos (Kripke y Borsos, 1974; Moller y Moller, 1978; Schwartz, 1975). Hecho similar al observado en ratones desnudos (Outzen y cols., 1975) o en aquellos timectomizados o irradiados (Gillette y Fox, 1975), donde la incidencia de tumores espontáneos o químicamente inducidos es similar a la que presentan los ratones normales. Tampoco existe mayor

incidencia tumoral en sitios "inmunológicamente privilegiados" tales como el buche, la córnea, el panículo adiposo o la matriz de los folículos pilosos (Billingham y Silvers, 1971).

A pesar del considerable cúmulo de evidencias en contra de un mecanismo general de inmunovigilancia gobernado por células T, parece, sin embargo, y también lo hemos reseñado ya, que este tipo de células ejerce un control efectivo sobre la incidencia de tumores inducidos por virus o radiaciones. La supresión del sistema inmune murino con suero antilinfocitario o timectomía neonatal provoca un incremento en la tasa de neoplasias inducidas por virus tumorales RNA o DNA (Law, 1969). Una explicación posible de la llamativa asociación entre la inmunovigilancia T y los tumores inducidos por virus podría radicar en la sensibilización inicial del huésped a los antígenos virales, los cuales evocarían una respuesta celular inmune enérgica frente a las células tumorales en desarrollo portadoras de los antígenos virales en su superficie.

En 1982, Gooding por una parte y Urban y cols. por otra, reevaluaron el papel de las células T en el control de los procesos neoplásicos, mediante la selección de líneas celulares tumorigénicas variantes de líneas tumorales parentales no tumorigénicas, comparando ambos tipos de líneas en cuanto a su susceptibilidad a la lisis por CTL y su capacidad para producir una sensibilización de tipo CTL in vitro. En unos casos, la progresión de las sublíneas tumorigénicas se asoció a un descenso en la expresión de antí

genos específicos de tumor con una reducción concomitante - en la inmunidad antígeno-específica mediada por células T y en otros a una pérdida de antígenos H-2 necesarios para el_ reconocimiento de los antígenos tumorales diana por parte - de los CTL.

Estos estudios sugieren la idea de un cierto pa_ pel de la inmunidad celular específica, al menos frente a - ciertos tipos de tumores.

2.- Células "Natural Killer" (NK).

La observación de que poblaciones celulares lin_ foides no inmunes eran capaces de producir una actividad ci_ tolítica significativa e inespecífica de células tumorales_ in vitro (Herberman y cols., 1973; Kiessling y cols., 1975a Rosenberg y cols., 1974) fue coincidente con el rechazo ini_ cial de la inmunovigilancia por células T, tal y como había sido formulada originalmente. Las células responsables de - esa actividad no específica, denominadas "natural killer" - (NK), comprenden una subpoblación celular linfoide discreta que representa alrededor del 5% de la población linfocítica periférica total (Roder y Halistes, 1980). Aunque las células NK murinas pueden expresar una cantidad limitada del an_ tígeno de la serie celular T, Thy-1 (Herberman y cols., - 1978), su maduración es timoindependiente (Haller y cols.,_ 1978; Herberman y cols., 1975) y no expresan el aloantígeno de células T, Lyt-1 (Brooks y cols., 1982; Roder y cols., - 1981). Sin embargo, otros antígenos adicionales como NK-1 - (Burton y Winn, 1981), Lyt-5 (Cantor y cols., 1979), asialo

GM-1 (Young y cols., 1980) y Ly-11 (Meruelo y cols., 1980), sirven para distinguirlas tanto de los linfocitos T como de los B.

Anatómicamente, las células NK son fácilmente detectables en sangre periférica, nódulos linfoides y bazo. En menor grado pueden detectarse también en médula ósea y cavidad peritoneal, estando ausentes del timo (Herberman y Holden, 1978). La actividad citolítica de las células NK de todos los sitios anatómicos, puede aumentarse tras su exposición a células tumorales (Herberman y cols., 1977), virus (Welsh y cols., 1979), adyuvantes bacterianos (Wolfe y cols 1976) o agentes químicos tales como poli I:C (Djeu y cols., 1979). Esta estimulación no es antígeno-específica y parece estar mediada en último término por modificaciones de las respuestas biológicas, tales como interferón e interleukina 2 (Djeu y cols., 1979; Kuribayashi y cols., 1981).

En el momento actual existe un considerable cúmulo de evidencias para justificar una función y actividad citolítica ejercida por células NK frente a tumores incipientes. Los primeros estudios en este sentido establecieron las correlaciones entre el grado de mortalidad in vitro mediada por células NK de células tumorales pertenecientes a varias cepas murinas y la resistencia de estas cepas al transplante de pequeños inóculos tumorales in vivo (Kiessling y cols., 1975b). Los ratones con actividad NK elevada in vitro fueron más resistentes al crecimiento primario de tumores NK-sensibles in vivo, mientras las células tumorales NK-resistentes in vitro fueron igualmente tumorigénicas

en animales con alto o bajo grado de actividad NK (Kiess - ling y cols., 1975b; Warner y cols., 1977). La transferencia pasiva de células NK en ratones irradiados incrementa la re sistencia de éstos al crecimiento de tumores NK-sensibles - (Cantor y cols., 1979; Kiessling y cols., 1976). Desde los trabajos de Herberman y cols. en 1975 es conocida la consi- derable actividad NK de las células esplénicas de ratones - desnudos deficientes en células T. Estos ratones son muy re sistentes a la inoculación in vitro de células tumorales - NK-sensibles (Kiessling y cols., 1976). Estas observaciones de la actividad NK in vitro respecto de la resistencia al - crecimiento tumoral in vivo, fueron confirmadas por estu - dios genéticos llevados a cabo inicialmente por Haller y - cols. (1977) y más tarde por Riesenfeld y cols. (1980). Es- tos hechos parecían indicar de forma bastante clara, que el grado de actividad NK del huésped y la sensibilidad de las células tumorales al efecto citotóxico, podrían determinar la resistencia de aquél al desarrollo de tumores incipien - tes.

En 1981 Lattime y cols. propusieron que la citoto xicidad natural frente a tumores sólidos era ejercida por - células pertenecientes a una subpoblación con característi- cas diferentes de las células NK. Sin embargo, en estudios posteriores se demostró que las células NK activas frente a células linfomatosas en suspensión lo eran también frente a la forma tumoral sólida in vivo e in vitro (Hanna y Burton, 1981). En 1982, Hanna demostró que las líneas fibrosarcoma- tosas sólidas con idéntica antigenicidad e inmunogenicidad, presentaban la misma susceptibilidad a la lisis por células

T sensibilizadas y por macrófagos pero diferían en su comportamiento frente a la lisis por células NK, cuando se inoculaban en ratones singénicos con alta actividad NK. En el caso de la línea NK-resistente su período de latencia, antes de iniciar la progresión, era menor; sin embargo, una vez esteblecidos, las curvas de crecimiento de ambos tumores fueron paralelas. Además, las células NK-resistentes isotópicamente marcadas eran retenidas en el huésped un intervalo de tiempo considerablemente mayor que el de sus homólogas NK-sensibles. Estas observaciones indican que la actividad NK in vivo es importante en la eliminación de las células tumorales durante los primeros estadios del desarrollo neoplásico, pero apenas tienen efecto sobre la progresión tumoral tardía. Por otra parte, los ratones portadores de tumores ya establecidos tienen deprimida su actividad NK (Becker y Klein, 1976), hecho que sugiere el efecto supresor de las células tumorales o sus productos sobre la actividad NK endógena. Este efecto depresor del crecimiento tumoral sobre la actividad NK puede explicar la dificultad que existe para recuperar dicha función NK de tumores humanos establecidos (Mantovani y cols., 1980; Vose y Moore, 1979; Vose y cols., 1977).

Existe una subcepa murina proveniente de C57BL/6 que porta una mutación genética conocida como "beige" (bg/bg) que se asocia con un defecto pronunciado en la actividad NK endógena sin afectar a la actividad T o B (Karre y cols., 1980). La incidencia de formaciones tumorales con dosis bajas de inóculos leucémicos, químicos o viralmente inducidos, estaba aumentada significativamente y el período -

de latencia disminuido en ratones bg/bg con respecto a sus correlatos normales bg/+. Utilizando líneas de melanoma NK-sensibles y una línea resistente, la B16, Talmadge y cols. (1980) encontraron efectos similares de la mutación bg sobre la resistencia a tumores sólidos. También se ha encontrado un aumento en la incidencia de tumores químicamente inducidos en ratones "beige" (Roder y Halistes, 1980).

El síndrome de Chediak-Higashi en humanos parece ser la contrapartida clínica de la mutación bg murina. Las células de estos pacientes tienen una actividad NK frente a tumores sensibles unas 500 veces menor que los sujetos normales, así como una actividad citotóxica dependiente de anticuerpos 3 veces menor, sin afectación de las funciones T, B o macrofágica (Roder y cols., 1980). Este síndrome de inmunodeficiencia proporciona datos suficientes para suponer una función de las células NK en la inmunovigilancia antitumoral, basado en el hecho de que este trastorno se asocia a una fase proliferativa con características linfomatosas (Blume y Wolff, 1972) de tipo posiblemente maligno (Dent y cols., 1966).

Experiencias más recientes sobre el papel de las células NK en la vigilancia antitumoral provienen de estudios sobre el efecto que produce la ablación activa de la actividad NK endógena sobre la resistencia frente a tumores. El tratamiento de ratones con antisueros frente al aloantígeno NK-1 o frente al glicolípido asialoGM-1 reduce o elimina, de una manera transitoria, la actividad NK esplénica endógena sin afectar la función B, T o macrofágica (Habu y -

cols., 1981; Hanna y Burton, 1981; Kawase y cols., 1982; - Pollack y Hallenbeck, 1982). Para estudiar el efecto de esta ablación sobre el crecimiento tumoral, Kawase y cols. en 1982 estudiaron líneas del linfoma L5178Y seleccionadas por su resistencia o susceptibilidad a la citolisis NK in vitro. El tratamiento de ratones normales o desnudos con suero antisialoGM-1 eliminó selectivamente la actividad NK in vivo, incrementando la tumorogénesis de bajas dosis de inóculos - tumorales NK-sensibles, sin afectar la capacidad tumorígena de las líneas NK-resistentes. El tratamiento suprimió así - mismo el efecto protector de la preinoculación de poli I:C_ a ratones frente al efecto de una sublínea L5178Y NK-sensible. Estos estudios sobre la supresión in vivo de la actividad NK y los efectos resultantes sobre la resistencia antitumoral mantienen una buena correlación con los otros estudios en ratones normales, ratones beige y pacientes con síndrome de Chediak-Higashi, proporcionando una evidencia sustantiva del papel de las células NK en la inmunovigilancia_ antitumoral inespecífica.

3.- Macrófagos.

Además de las células T y células Natural Killer, el sistema retículoendotelial, particularmente los macrófagos, parece participar también en la defensa frente al desarrollo tumoral (Levy y Wheelock, 1974; Nelson, 1976). Los - macrófagos pueden activarse in vivo o in vitro, dando lugar a efectos citostáticos o citolíticos, antígeno-específicos_ o antígeno-inespecíficos, cuando se enfrentan a células tumorales (Evans y Alexander, 1976). Los mecanismos de activa_

ción proceden a través de la interacción cooperativa entre macrófagos y células T o mediadores solubles producidos por éstas en respuesta a su interacción con un antígeno específico (p. ej. células tumorales) o agentes activadores inespecíficos (p. ej. bacterias, virus) (Evans y Alexander, 1972; Farr y cols., 1979; Lohmann-Mathes, 1976). Los macrófagos activados específicamente ("armados") exhiben la misma especificidad antitumoral que las células T responsables de su activación (Evans y Alexander, 1976). Por el contrario, los macrófagos activados inespecíficamente lisan indistintamente una variedad de tipos celulares tumorales (Evans y Alexander, 1976; Weinberg y Hibbs, 1978). Las células tumorales pueden ser reconocidas selectivamente como dianas de la lisis mediada por macrófagos, sobre la base de sus propiedades anormales de crecimiento (Hibbs y cols., 1972).

La especulación respecto al papel de los macrófagos en la inmunovigilancia sobre tumores experimentales está basada primordialmente en las correlaciones halladas entre la actividad tumoricida macrofágica in vitro y la resistencia al crecimiento tumoral in vivo (Adams y Snyderman, 1979; Weinberg y Hibbs, 1978). La depresión de la actividad macrofágica in vivo mediante suero antimacrófagos (Isa y Sanders, 1975), o con las toxinas macrofágicas sílice y musgo, se asocia a menudo con resistencia disminuida frente a la incidencia y crecimiento tumorales (Keller, 1976; Nelson y cols., 1978). El descenso en el nivel de resistencia antitumoral que acontece en los animales viejos, puede ser revertido temporalmente por la transferencia pasiva de macrófagos de animales más jóvenes (Keller, 1979; Stutman, 1975).

Todos estos datos deben manejarse con sumo cuidado, ya que las toxinas macrofágicas, por ejemplo, pueden no ser totalmente selectivas para estas células (Wirth y cols., 1980) o bien que la potenciación del crecimiento celular tumoral resultante de tal tratamiento sea debido a la liberación de factores promotores del crecimiento neoplásico desde los macrófagos lesionados (Keller, 1979).

Desde un punto de vista clínico, la proporción de monocitos circulantes está reducida en pacientes que reciben terapia inmunosupresora (Levy y Wheelock, 1974), un hecho posiblemente relacionado con la mayor incedencia de neoplasias linforreticulares en tales enfermos. Igualmente, los agentes con efectos carcinogénicos probados en las neoplasias humanas (cigarrillos, fibras de asbesto, etc.) son tóxicos para los macrófagos in vitro (Levy y Wheelock, 1974).

La estimulación de los macrófagos in vivo con productos bacterianos, se asocia a un refuerzo de la resistencia frente a tumores (Bast y cols., 1974; Gelboin y Levy, 1970; Hibbs y cols., 1971); sin embargo, estos agentes activadores también potencian la actividad NK (Djeu y cols., 1980; Hanna, 1982) y pueden afectar igualmente la función celular T (McBride y cols., 1980).

La evidencia quizá más convincente para asignar a los macrófagos un papel en la inmunovigilancia, ha sido proporcionada por los estudios de Chow y cols. (1981a) y los de Greenberg y Greene (1976) sobre el rechazo no inmune de pequeños inóculos tumorales en ratones singénicos. En los

primeros estudios observaron que inóculos tumorales pequeños (entre 10 y 100 células) de varias líneas celulares, inyectados subcutáneamente, eran rechazados por un mecanismo T-independiente. En estudios subsiguientes lograron demostrar que el proceso de rechazo era debido a macrófagos y no a células NK, quizá con participación de anticuerpos naturales antitumorales. Sin embargo, la eficacia de este mecanismo estaba estrictamente limitada, puesto que sólo podían rechazarse cantidades muy pequeñas de células tumorales; con inóculos tumorales mayores se incrementaba significativamente la incidencia de crecimiento tumoral. Asímismo, este mecanismo de rechazo funcionaba defectuosamente cuando las células a dosis muy bajas se administraban intraperitonealmente, sugiriendo que los macrófagos funcionan mejor frente a células tumorales localizadas que sistémicas. A pesar de todo, estos trabajos demuestran que los macrófagos pueden funcionar independientemente de las células T para destruir células tumorales incipientes.

4.- Células "citotóxicas naturales" (NC).

En 1978 Stutman y cols. identificaron una población celular en el bazo murino, que como en el caso de las células NK eran capaces de producir lisis tumoral inespecífica, sin sensibilización previa del huésped. Este nuevo tipo celular, denominado "Natural Citotóxico" (NC), actuaba preferentemente frente a células diana pertenecientes a tumores sólidos no linfoides y en este sentido parecían mostrar un abanico de actividad diferente al de las células NK cuyas dianas tendían a localizarse en los tumores de estir-

pe hematopoyética. Ya hemos discutido en el apartado dedicado a células NK, que esta aparente dicotomía quedó posteriormente resuelta al demostrarse que las células NK también eran capaces de lisar tumores sólidos de estirpe no hematopoyética.

Así pues, esta nueva población celular permanece como un verdadero enigma, tanto en lo referente a sus características fenotípicas como a sus propiedades funcionales y mecanismos de regulación, máxime al no haberle sido asignado aún un marcador fenotípico que la identifique.

En 1983, **Latimer** y cols. establecieron algunas propiedades de las células NC, respecto a su inmunorregulación y marcadores de membrana. En principio, este tipo celular carece de antígenos asociados a la línea T, B, macrofágica o NK. La interleukina-2 puede incrementar su actividad, igual que en el caso de las células NK, pero difieren de éstas en que el agente poli I:C no tiene ningún efecto sobre aquéllas. La interleukina-3, irrelevante para la activación de las células NK, es capaz, sin embargo, de activar las células NC.

En definitiva, es muy poco lo que conocemos aún sobre esta clase de células, con apenas evidencias experimentales sobre su acción citotóxica directa frente a dianas tumorales.

5.- Anticuerpos naturales.

Una serie de estudios clínicos y experimentales han descubierto la existencia en individuos normales de "anticuerpos naturales" (Ac Na), capaces de reaccionar con antígenos de células tumorales. Este hecho sitúa a la inmunidad humoral específica como un mecanismo potencial de inmunovigilancia antitumoral.

Muchos de estos estudios han identificado Ac Na frente a determinantes antigénicos víricos en la superficie de las células tumorales (Ihle y Lee, 1977; Lee e Ihle, 1979); sin embargo, las especificidades no se limitan a antígenos víricos, sino que pueden reflejar sensibilización frente a antígenos oncofetales (Menard y cols., 1977), frente a antígenos bacterianos que inducen reacciones cruzadas con determinantes celulares tumorales (Minden y cols., 1976), o bien frente a especificidades asociadas a los tumores, aún no bien definidas.

El potencial papel de los Ac Na que reconocen determinantes virales en la resistencia a la leucogénesis viral, fue sugerido por los estudios de Schwartz y cols. en 1979, al observar que la terapia pasiva con suero antiviral en ratones AKR con una tasa muy alta de leucemias espontáneas, conducía a una reducción significativa en la incidencia de aquéllas.

En otros estudios experimentales sobre la presencia de Ac Na antitumor, se ha utilizado un sistema de cito-

lisis complemento-dependiente de células tumorales in vitro como una prueba cuantitativa de este tipo de reactividad humoral. Martin y Martin en 1975, demostraron que diversos murinos alogénicos o singénicos (IgM) lisaban en presencia de complemento células de linfomas, carcinomas, teratomas y neuroblastomas aisladas de tumores frescos. Estos autores especularon con la posibilidad de que la lisis complemento-dependiente de las células tumorales in vivo, podría no representar un mecanismo de inmunovigilancia primario, teniendo en cuenta la escasa capacidad que la IgM murina tiene de fijar complemento, sugiriendo que el sistema operativo podría tener lugar a través de una lisis celular anticuerpo-dependiente (ADCC).

Menard y cols. en 1977, indicaron que los títulos de Ac Na podrían incrementarse después de la inoculación primaria de células tumorales y que los niveles de esos anticuerpos in vivo tenían una correlación inversa con el grado de crecimiento tumoral posterior a la inoculación de células tumorales a bajas dosis. Estas observaciones fueron ampliadas por el grupo del Dr. Greenberg (Chow y cols., 1981b; Wolosin y Greenberg, 1979), demostrando que tras la inoculación de células tumorales in vivo, existía una rápida fijación de Ac Na a acuéllas, e igualmente que estos anticuerpos podían colaborar con los macrófagos en el rechazo de pequeños inóculos neoplásicos (Chow y cols., 1979; Chow y cols., 1981b). Las conclusiones a las que llegó este grupo de investigadores podemos resumirlas en los siguientes cinco puntos:

a) Existía una relación inversa entre la capaci-

dad tumorígena de pequeños inóculos de líneas clonadas pertenecientes al linfoma L5178Y y la sensibilidad de las líneas a la lisis por Ac Na más complemento.

b) Las líneas tumorales más susceptibles a los Ac Na eran eliminadas más fácilmente in vivo, tras la inoculación intraperitoneal de células isotópicamente marcadas.

c) La administración de adyuvantes (LPS, peptonas, etc.) potenciaba la reactividad de los Ac Na y el rechazo tumoral.

d) Las células tumorales cubiertas con Ac Na eran eliminadas más fácilmente que las que no lo estaban cuando se inoculaban subcutáneamente.

e) En definitiva, la inmunovigilancia T-independiente parece ser el reflejo de un conglomerado de mecanismos (NK, K, macrófagos, Ac Na) cuya actuación preferencial es dirigida, tanto por el fenotipo de un tumor particular, como por la capacidad efectiva relativa del huésped.

En una serie de estudios llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Springer (Springer y cols., 1979; Springer y cols., 1980; Springer y cols., 1982) descubrieron que más del 90% de los carcinomas probados expresaban la especificidad correspondiente al antígeno de Thomsen-Friedenreich (T), un precursor glicoproteico en la biosíntesis de los principales antígenos del sistema antigénico eritrocitario MN. El antígeno no se expresa en forma inmunogénica en tejidos normales o fetales, pero puede aislarse de células normales, especialmente eritrocitos, mediante tratamiento con sialidasa de los antígenos MN extraídos. El antígeno T está presente en la inmensa mayoría de los carcinomas mamarios,

gástricos, pulmonares y colónicos, incluyendo metástasis distales detectadas meses después de la resección de los tumores primarios. La mayor parte de los individuos sanos poseen Ac Na frente el antígeno T, probablemente debido a reacciones cruzadas con antígenos de microorganismos intestinales. El título de Ac Na anti-T está descendido en individuos portadores de una neoplasia, posiblemente como resultado de su absorción por los antígenos T asociados al tumor o los que circulan libres en el plasma.

6.- Mecanismos no inmunológicos.

Existe un número significativo de mediadores bioquímicos y reacciones químicas que pueden actuar por mecanismos no inmunológicos in vivo, destruyendo células tumorales o inhibiendo el crecimiento tumoral, así como detoxificando determinados carcinógenos potenciales antes de que den lugar a la transformación celular.

Entre los diversos mediadores existentes, destacan sin lugar a dudas las chalonas, glicoproteinas cuyo tamaño oscila entre pequeño y mediano y de las cuales hablamos en el apartado de los factores de crecimiento. Allí apuntábamos que su mecanismo de acción fuera probablemente a través de un bloqueo en la internalización del calcio, interfiriendo en la hidrólisis del AMP cíclico catalizada por la fosfodiesterasa, con lo cual se bloquea el paso de la célula a la fase S en el ciclo celular (Houck, 1973). El crecimiento tumoral induce un aumento en la concentración de chalonas en la sangre, lo cual conduce a un feedback negati

vo que afecta al crecimiento neoplásico (Apffel, 1976).

Además de las chalonas, se han aislado varios tipos de lipoproteinas en ascitis (Apffel, 1976) y sueros tumorales (Luscher y cols., 1967), que son selectivamente citotóxicas para las células neoplásicas, en comparación con las células normales del mismo individuo.

La generación de radicales superóxido ($O_2^{\cdot}$) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el foco tumoral, a través de la autooxidación de grupos tioles o intercambio sulfidril--disulfuro en distintas reacciones bioquímicas, podría dar lugar en último término a la destrucción de células tumorales (Apffel, 1976). Aunque este tipo de reacciones no es selectivo frente al tumor, las posibles lesiones sobre tejidos normales serían mínimas al estar localizadas, como ya hemos mencionado, en el foco neoplásico. Es muy posible que en muchos de los mecanismos descritos en este apartado tengan una intervención decisiva las células macrofágicas (Nathan y Cohn, 1980).

La actividad antioxidante natural in vivo supone posiblemente un mecanismo adicional de lucha antitumoral, no por eliminación de células neoplásicas incipientes, sino actuando como elemento detoxificador de agentes carcinogénicos previamente a la transformación celular (Apffel, 1976). Entre estos antioxidantes químicos se incluyen el selenio y alfa-tocoferol (vitamina E), cuya actividad es potenciada por los ácidos grasos poliinsaturados, de forma que una dieta rica en este tipo de lípidos administrada a un animal an

tes o subsecuentemente a la inoculación del agente carcinogénico, reduce apreciablemente la incidencia tumoral (Holden y cols., 1976).

7.- Mecanismos moleculares de lisis tumoral mediados por células de estirpe linfoidea

Las células linfoides murinas y humanas inducen lesiones ultraestructurales en la membrana de las células diana durante la reacción citolítica (Dourmashkin y cols., 1980; Henkart y Henkart, 1982). Teniendo en cuenta que otros mecanismos efectores, p. ej. el complemento, operan biológicamente como sistemas lesivos de membrana, la hipótesis de que los linfocitos citolíticos utilizan una vía similar ha ido tomando auge en los últimos cinco años. Se conoce con detalle el proceso de polimerización de los últimos componentes del complemento, que da lugar a las lesiones ultraestructurales en la superficie celular (Podack y Tschopp 1984; Tschopp y cols., 1982): de 10 a 16 moléculas de C9 son polimerizadas por los componentes anteriores del complemento para formar un complejo anfifílico tubular que, insertado en la membrana, induce la formación de lesiones funcionales y estructurales que ocasionan la muerte de la célula.

El análisis de la formación de lesiones en las membranas, debidas a linfocitos T citolíticos (CTL) y células NK, ha puesto en evidencia que aquéllas parecen ser producidas también por polimerización de precursores monoméricos (Henkart y Podack, 1983). Estos precursores se localizan en los gránulos citoplasmáticos de los linfocitos T y

NK. Estos gránulos aislados dan lugar a la lisis de células tumorales en presencia de Ca^{++} y producen lesiones en la membrana durante la reacción citolítica.

Los gráculos obtenidos de células NK y CTL tienen propiedades funcionales y bioquímicas similares, sugiriendo que en ambos casos el mecanismo lítico es semejante (Podack y Dennert, 1982). Además de producir lesiones en la membrana, los linfocitos T median la degradación del DNA en el núcleo de la célula diana (Russel y cols., 1980; Duker y cols 1983), reacción que también parece contribuir a la muerte celular.

7.1.- Etapas del proceso lítico.

Durante la década de los años setenta, pudo demostrarse en varios laboratorios que el proceso lítico a cargo de los CTL se desarrollaba en tres estadios básicos, que eran susceptibles de analizarse independientemente:

a) Unión específica, que podía medirse contando el número de conjugados efector-diana.

b) Programación de la lisis dependiente de Calcio o golpe letal.

c) Lisis independiente de la célula efectora, con muerte de la célula diana por efecto del golpe letal (Martz 1977; Berke, 1980).

Los estudios más recientes sobre el mecanismo de citotoxicidad mediado por células NK, han utilizado técnicas y conceptos desarrollados por los investigadores de los

procesos citotóxicos mediados por CTL, haciendo posible de esta forma, el poder comparar directamente las propiedades, en los distintos estadios citotóxicos, de las células NK y CTL. Aunque la formación de conjugados efector-diana, en el caso de las células NK, no es inhibida por temperaturas bajas o fármacos bloqueantes del metabolismo energético, a diferencia de los CTL que sí lo son (Roder y cols., 1980)[b], las etapas posteriores muestran fenómenos bioquímicos paralelos (Hiserodt y cols., 1984)[a].

7.2.- Antígenos de las células efectoras que intervienen en el proceso lítico.

7.2.1.- En los linfocitos T citotóxicos (CTL).

Recientemente, utilizando anticuerpos monoclonales, ha sido posible bloquear la fase de reconocimiento entre los CTL y la célula diana, poniendo de manifiesto la importancia de diversas interacciones moleculares al margen de aquéllas que atañen directamente al receptor antigénico, de las cuales no vamos a tratar en esta sección. Las interacciones moleculares que tienen lugar junto a las del receptor antigénico durante el proceso de reconocimiento, están relacionadas con los antígenos Lyt 2/3 (Fan y cols., 1980; MacDonald y cols., 1982), los antígenos L3T4/T4 (Biddison y cols., 1984) y los antígenos LFA (Martz y cols., 1983; Krensky y cols., 1983). Estos últimos parece que intervienen también en la unión de las células NK a sus dianas. Todos estos antígenos parecen actuar incrementando el grado de unión de la célula efectora a sus células blanco cuando

la interacción entre el receptor antigénico y el correspondiente determinante no tiene una afinidad alta. Hoy día, aún no existe un modelo detallado para explicar la relación entre estas interacciones moleculares y la iniciación de la vía lítica.

Los anticuerpos frente al antígeno celular humano T3 bloquean la lisis de la célula diana mediada por CTL, cuando ya se ha producido la unión efector-blanco, pero no inhiben el reconocimiento ni la adhesión entre los CTL y la célula blanco correspondiente (Landegren y cols., 1982; Tsoukas y cols., 1982a). El bloqueo tiene lugar también con fragmentos $F(ab')_2$ y con F(ab') de anticuerpos monoclonales antiT3 (Tsoukas y cols., 1982b). El efecto de bloqueo puede anularse cuando se añade Concanavalina A al sistema.

Cuando Moretta y cols. (1984) utilizaron clonos CTL individuales, solamente el 70% de ellos eran sensibles al bloqueo con antiT3. Los clonos resistentes presentaban una expresión y modulación de la molécula T3 comparable a la de los clonos sensibles, sin que existiera una correlación directa entre el bloqueo por antiT3 y por otros anticuerpos, como los dirigidos frente a T8 o T4.

Leeuwenberg y cols. (1984) descubrieron que los anticuerpos antiT3 inducía citotoxicidad inespecífica cuando los CTL se mezclaban con células diana irrelevantes, fenómeno que no ocurría con anticuerpos dirigidos frente a otros antígenos de la célula efectora. Este efecto fue observado en linfocitos periféricos activados mediante culti-

vo mixto (MLR) y en CTL clonados; pero no en linfocitos de sangre normal frescos.

Todos estos estudios sugieren que los anticuerpos antiT3 pueden ser capaces de activar la vía lítica en CTL - sin necesidad de reconocimiento antigénico específico.

Estas observaciones, junto a los efectos mitogénicos de los anticuerpos antiT3 (Wauwe y cols., 1980; Chang y cols., 1981) y su relación con el receptor antigénico -- - Reinherz y cols. han demostrado que la molécula T3 está asociada al receptor para el antígeno, mediante estudios de co capping, coprecipitación y coexpresión estequiométrica - (Meuer y cols., 1983a; Reinherz y cols., 1983; Meuer y cols 1983b) -- apoyan la hipótesis de que T3 pueda actuar como - una molécula iniciadora, estimulando determinadas vías bioquímicas que producirían una serie de cambios funcionales, posteriores a la fase de reconocimiento por el receptor antigénico. Esta hipótesis ha dado un paso adelante recientemente, con los hallazgos de Weiss y cols. (1984b), quienes observaron que los anticuerpos antiT3 producían un incremento de tres a cuatro veces del Calcio libre intracelular en una línea leucémica T que produce Interleukina-2.

Se han descrito otros anticuerpos que bloquean la función CTL en etapas posteriores a la unión CTL-diana, como el antisuero de rata anti-ratón conocido como RAT (Hiserodt y Bonavida, 1981; Neville e Hiserodt, 1982). Este anticuerpo se fija a moléculas de la superficie de CTL activados, pero no de CTL no estimulados o de otros linfocitos. -

Ciertos anticuerpos frente a preparaciones de linfotoxinas, parece que bloquean también la actividad CTL en estadios - postunión (Devlin y cols., 1982).

7.2.2.- En los linfocitos granulares grandes (LGL).

En el caso de las células NK, el bloqueo de la - función lítica por anticuerpos se complica por los receptores Fc de los LGL, los cuales también pueden producir una - inhibición de la función lítica en estadios posteriores a - la unión efector-diana (Merrill y cols., 1981). No obstante Targan y Newman (1983) han demostrado que un anticuerpo monoclonal frente a la molécula T200 inhibe la actividad lítica NK humana, frente a algunas células diana, aunque no - frente a la mayoría. El anticuerpo no bloquea la formación de conjugados diana-efector, pero lo hace antes del estadio Calcio-dependiente. Otros anticuerpos monoclonales frente a T200 bloquean la formación de conjugados (Sparrow y McKenzie, 1983). Existen otros anticuerpos monoclonales frente a determinantes de la superficie NK (Nieminen y cols., 1982), xenoanticuerpos frente a antígenos pobremente definidos - (Kahle y cols., 1983) y anticuerpos antigránulos (Reynolds y cols., 1984), que también tienen efectos inhibitorios del proceso lítico NK-dependiente.

7.3.- Posibles mediadores moleculares de las lesiones en la célula diana.

7.3.1.- Especies moleculares de oxígeno, altamente reactivas.

Roder y sus cols. en 1982, observaron que las células NK liberaban intermediarios de oxígeno reactivos después de su unión a las células diana; sin embargo, el hecho de que la actividad NK (Tanaka y cols., 1981) y ADCC (Katz y cols., 1980) sean normales en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, representa un fuerte argumento en contra de la hipótesis que aboga por un papel efector de los intermediarios de oxígeno en el golpe letal mediado por los LGL. Los resultados de Nathan y cols. (1982) argumentan en contra de este mecanismo en los LGL. Pohajdak y cols. (1984) han observado que las células diana sensibles a NK, inducen rápidamente en los LGL la liberación de un factor soluble que activa la vía shunt hexosa-monofosfato en monocitos, sugiriendo que la contaminación con este tipo de células puede ser el hecho que explique los resultados, debido a la presencia de estos mediadores en preparaciones de células NK no completamente purificadas (Kay y cols., 1983).

7.3.2.- Factores líticos solubles.

Las linfotoxinas son factores solubles presentes en el medio de cultivo de líneas celulares linfoides, o de linfocitos estimulados por antígenos o mitógenos. Tienen efectos citostáticos y/o citolíticos sobre el crecimiento de determinadas células in vitro. Aunque se ha debatido la posibilidad de que las linfotoxinas sean los mediadores responsables de las lesiones en la célula diana, provocadas por CTL y LGL, algunas de sus propiedades bioquímicas plantean ciertas dificultades a la hora de asignar a estas moléculas un papel en el proceso lítico (Henney, 1977). Ejemplo

de ello es la lentitud de la cinética lítica inducida por las linfotoxinas sobre las células blanco, que requiere un mínimo de cinco horas para ser detectable (Hiserodt y cols. 1979), en contraste con la rápida muerte de la célula diana cuando intervienen linfocitos citotóxicos (Hiserodt y cols. 1982; Martz, 1975). Por otra parte, la especificidad de la citolisis inducida por alfa-linfotoxina, no se corresponde con la especificidad antigénica que induce la síntesis y secreción de linfotoxinas al medio de cultivo. A pesar de todo, parece indudable que existen diversas correlaciones entre la acción de las linfotoxinas y la citotoxicidad mediada por células (Granger y cols., 1980) y que anticuerpos dirigidos contra diversas preparaciones de linfotoxinas, bloquean los mecanismos líticos de CTL (Leopardi y Rosenau, 1982) y NK (Weitzen y cols., 1983), aunque los dirigidos frente a otras preparaciones no hayan dado el mismo resultado (Gately y cols., 1976). Tal vez con el advenimiento de linfotoxina recombinante clonada, será posible la obtención de anticuerpos con especificidad definida para poder definir la especificidad bioquímica y biológica de esta molécula.

Wright y Bonavida (1981; 1982) describieron un factor citotóxico soluble denominado NKCF (factor citotóxico derivado de células NK), semejante a la linfotoxina, que es liberado al medio de cultivo por los linfocitos humanos y murinos tras el contacto con células tumorales o mitógenos. La característica más sobresaliente de este factor es su especificidad ante la célula diana, que se correlaciona con la de las células NK que lo secretan, hecho que diferen

cia a este factor de las linfotoxinas. Tanto en los cultivos murinos como humanos, la producción de NKCF requiere la presencia de LGL entre la población de linfocitos estimulados, necesidad que también parece afectar a la producción de linfotoxina (Wright y cols., 1983; Farram y Targan, 1983 Leopardi y Rossenau, 1984).

Basándose en las correlaciones existentes entre la lisis mediada por células NK y por NKCF, de una parte, y entre las condiciones que se requieren para inducir NKCF y el fenómeno de reconocimiento en la lisis por NK de otra; Wright y Bonavida en 1983 avanzaron la hipótesis de que NKCF fuera el responsable de las lesiones letales ocasionadas en las membranas celulares por las células NK. Como en el caso de las linfotoxinas, la dificultad para acomodar el factor NKCF dentro del modelo de acción citolítico mediado por NK, es su lenta cinética (Hiserodt y cols., 1982b), aparte de la confusa relación existente entre la unión de las células NK a sus blancos y el proceso de secreción postulado para NKCF (Wright y Bonavida, 1984). Al igual que con las linfotoxinas, se hace necesaria la caracterización bioquímica de este factor para poder demostrar de forma rigurosa su, hasta ahora, hipotético papel en la citolisis NK dependiente y su posible relación con las linfotoxinas y las citolisinas granulares de los LGL.

Nota: Siguiendo a Pierre A. Henkart (1985), hemos utilizado el término "citolisinas" para denominar las proteinas granulares que de algún modo están implicadas en el mecanismo molecular citolítico de los LGL y seguramente tam

bién de los CTL. No obstante, puesto que Eckhard R. Podack (1985) ha realizado un estudio más completo de estos mecanismos moleculares citolíticos y este autor utiliza el término "perforinas" para referirse a las proteínas implicadas nosotros desde ahora usaremos sistemáticamente esta denominación en vez de la más conocida, pero también a nuestro juicio, más imprecisa, "citolisinas".

7.3.3.- Mediadores que no requieren secreción.

Existen diversos trabajos que sugieren la posibilidad de que la lisis de la célula diana tenga lugar a través de fuerzas físicas u otros mecanismos que no suponen una transferencia molecular desde la célula efectora a la célula diana (Sanderson, 1981; Russell, 1983; Berke, 1983).

En algunos estudios con microscopía electrónica, las fracturas en las membranas de las células diana sugerían la intervención de fuerzas de cizallamiento (Grimm y cols., 1979). Sin embargo, los experimentos para confirmar esta teoría son difíciles de realizar y más aún de interpretar, por lo que de momento la hipótesis es poco más que una especulación.

Otros investigadores han considerado la posibilidad de que la propia membrana plasmática de los linfocitos citotóxicos sea la fuente del golpe letal (Ferluga y Allison, 1975; Kahn-Perles y Golstein, 1978) y en este sentido, Harris y cols. en 1984, consiguieron transferir capacidad citolítica a células citotóxicas mediante fusión de membra-

nas a partir de CTL, lo cual fue interpretado como indicativo del potencial citotóxico per se de la membrana efectora. Ahora bien, dado que el material de fusión no estaba bien definido, no se excluyó la posibilidad de que en las células aceptoras del material de membrana, existieran gránulos con perforinas (citolisinas). Son necesarios estudios con sistemas más controlados para concluir que es la membrana efectora la responsable de al menos parte de la actividad citotóxica.

7.3.4.- Componentes de los gránulos citoplasmáticos.

Por lo que sabemos actualmente, son, sin duda, las proteinas de los gránulos citoplasmáticos en las células citotóxicas las que cuentan con más probabilidades de tener un papel importante en la citolisis célulomediada. Hoy día existen ya modelos moleculares líticos, un tanto hipotéticos aún, con base en estas proteinas granulares (a uno de estos modelos haremos referencia después).

En la mayor parte de los estudios con microscopía electrónica (ME) se han observado gránulos en el citoplasma de los linfocitos citolíticos. Estos gránulos están unidos a la membrana y generalmente contienen material que se tiñe de oscuro con Osmio, cuando se visualizan con el ME. El reciente descubrimiento de los LGL, aparte de suponer un avance en la clasificación de los linfocitos, ha permitido comprobar que en los LGL humanos existe gran cantidad de gránulos citoplásmicos que contienen formaciones llamativas de material paracristalino, que no se observan en los de otras

especies (Payne y cols., 1983; Kanayama y cols., 1983).

Grossi y cols. en 1983 encontraron una correlación llamativa entre la presencia de gránulos citoplasmáticos y actividad lítica: los clones de células T humanas (15 en total) obtenidos mediante cultivo mixto de linfocitos, con actividad CTL, NK o K, contenían gránulos citoplasmáticos, mientras que otros 10, obtenidos por el mismo procedimiento pero carentes de actividad citotóxica, no tenían gránulos detectables por ME. Sin embargo, también en clones humanos con actividad NK, Schneider y cols. (1984) observaron que las células citolíticamente más activas tenían menos gránulos que otras pertenecientes a clones con actividad más modesta.

La mayor parte de los gránulos citoplasmáticos de CTL y LGL contienen enzimas lisosomales (Sparrow y MacKenzie, 1983; Burns y cols., 1983), los cuales aparentemente no tienen relación con la actividad citolítica (Henkart y cols., 1984). Dichos gránulos no parecen contener, sin embargo, los marcadores moleculares característicos de los mastocitos o neutrófilos, tales como histamina o proteasas neutrales. Las proteinas granulares, con bajo contenido en azúcar por lo general, han sido clasificadas en cinco tipos principales, de acuerdo con los resultados obtenidos por electroforesis en geles de dodecilsulfatosódico (SDS) (Millard y cols., 1984). Como sus pesos moleculares (62, 58, 30, 29 y 28 kilodaltons) no se correspondían con los de las proteinas terminales del sistema complemento, es probable que las propiedades líticas de estos gránulos no se deban a

la acción de los componentes de dicho sistema.

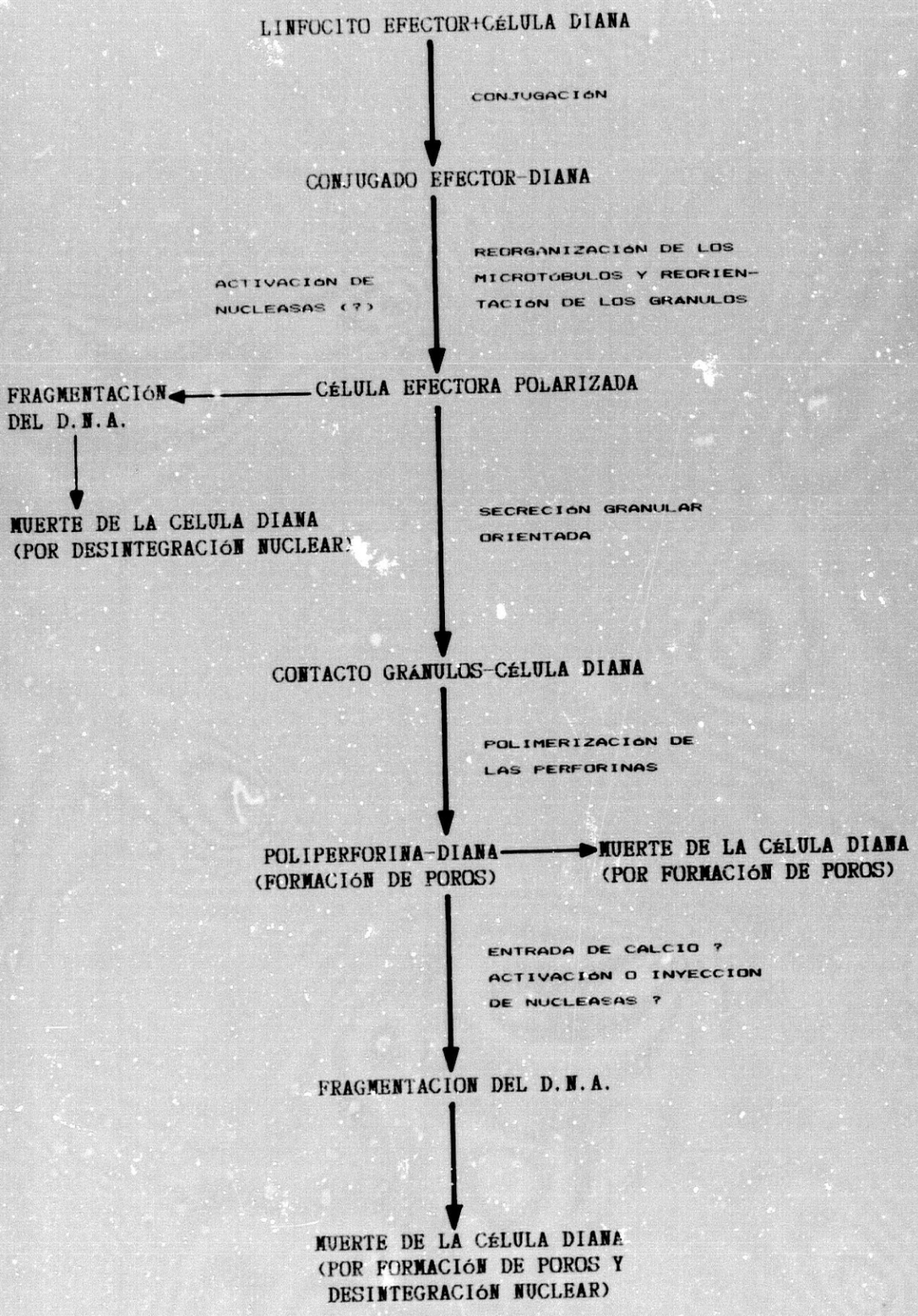
Reynolds y cols. (1984) han demostrado que varios anticuerpos dirigidos contra gránulos purificados de LGL, - reaccionan con un número determinado de proteinas granula - res y son capaces de inhibir la actividad lítica de las per forinas (citolisinas) granulares. Estos resultados propor - cionan una evidencia directa de que se requiere uno o más - componentes granulares para los procesos citotóxicos media- dos por LGL. Proporcionan también una base experimental pa- ra el modelo lítico de exocitosis granular (Vid. Fig. 21),_ puesto que tales anticuerpos no pueden tener acceso a los - gránulos en ausencia de secreción de los mismos.

7.4.- El papel de los gránulos citolíticos en la lisis ce lular mediada por linfocitos.

La citolisis mediada por linfocitos requiere el - contacto de la célula efectora con su diana. A partir de - ese momento, la célula efectora se polariza rápidamente, po sicionando y orientando el centro de organización microtubu lar y el complejo de Golgi hacia el área de contacto (Kup - fer y cols., 1983). Las sustancias bloqueadoras de la tubu- lina impiden la organización de los microtúbulos evitando - la lisis de la célula diana. Con antisueros específicos pa- ra algunos de los componentes granulares, es posible obser- var que a los 10 minutos de incubación de los conjugados - efector-diana, los gránulos de las células T también se po- sicionan hacia el área de contacto intercelular. Es proba - ble que la reorientación del centro de organización microtu

FIGURA 21: Esquema hipotético de la citolisis mediada por linfocitos. Las flechas gruesas indican la ruta teóricamente principal que resulta en la muerte celular por formación de poros y desintegración nuclear. Las flechas horizontales muestran vías alternativas que también dan lugar a muerte celular.

FIGURA 21


LINFOCITO EFECTOR+CÉLULA DIANA
CONJUGACIÓN
CONJUGADO EFECTOR-DIANA
ACTIVACIÓN DE NUCLEASAS (?)
REORGANIZACIÓN DE LOS MICROTÚBULOS Y REORIENTACIÓN DE LOS GRANULOS
FRAGMENTACIÓN DEL D.N.A.
CÉLULA EFECTORA POLARIZADA
MUERTE DE LA CELULA DIANA (POR DESINTEGRACIÓN NUCLEAR)
SECRECIÓN GRANULAR ORIENTADA
CONTACTO GRÁNULOS-CÉLULA DIANA
POLIMERIZACIÓN DE LAS PERFORINAS
POLIPERFORINA-DIANA (FORMACIÓN DE POROS)
MUERTE DE LA CÉLULA DIANA (POR FORMACIÓN DE POROS)
ENTRADA DE CALCIO ?
ACTIVACIÓN O INYECCION DE NUCLEASAS ?
FRAGMENTACION DEL D.N.A.
MUERTE DE LA CÉLULA DIANA (POR FORMACIÓN DE POROS Y DESINTEGRACIÓN NUCLEAR)

bular sea la responsable del acarreo de los gránulos hasta el sitio de conjugación (contacto), donde serán liberados - subsecuentemente sobre la membrana de la célula diana por - un mecanismo de secreción dirigida (Geiger y cols., 1982).

Podack (1985), utilizando la fracción IgG marcada con fluoresceina de un antisuero antigránulos, ha podido - comprobar que los antígenos granulares se secretan rápida - mente, asociándose a la célula blanco, de forma que al cabo de una hora de incubación, la célula diana muestra una fluorescencia difusa con la IgG antigranular. Estos estudios sugieren un papel directo de los gránulos citolíticos en la - citotoxicidad mediada por células T.

7.4.1.- Formación de lesiones de membrana por gránulos - aislados.

La existencia de formaciones granulares típicas - en el citoplasma de los linfocitos citotóxicos, y el estu - dio de sus características morfológicas a lo largo del proceso lítico, hizo pensar a diversos investigadores que las proteínas integrantes de tales gránulos tenían algo que ver con la formación de lesiones en la membrana de las células diana y que dichas lesiones eran una parte integral del fenómeno citolítico mediado por células linfoides (Podack y Dennert, 1982; Henkart y Henkart, 1982). La incubación de - eritrocitos con gránulos aislados, en presencia de Ca^{++}, da lugar a hemólisis y a la formación de lesiones en la membrana de los hematíes. Morfológicamente, las lesiones se parecen a las observadas en las membranas diana, cuando se uti-

lizan células T [illegible] intactas.

A la lesión de la membrana diana se llega por un proceso polimerizante de precursores monoméricos llamados - perforinas, que da lugar a la formación de complejos tubulares que, como su nombre sugiere, perforan la membrana insertándose en ella. Este mecanismo tiene una singular semejanza con el del complejo de ataque a la membrana del complemento (Podack y Tschopp, 1982; Tschopp y cols., 1982).

Las lesiones que pueden verse con el ME en las - membranas atacadas son de dos tipos: unas de mayor tamaño - (160 Å), designadas como "Poliperforinas 1" y otras más pequeñas (50-70 Å) llamadas "Poliperforinas 2" (Podack y - Tschopp, 1984). Este mecanismo de polimerización es compatible con el análisis de dosis-respuesta, cinética, dependencia térmica y requerimiento iónico de la hemólisis mediada por gránulos. La curva dosis-respuesta sigmoidal y su fuerte dependencia de la temperatura del medio es bastante comparable con las propiedades de la polimerización de C9 durante la citolisis mediada por el Complemento.

Los gránulos aislado y extractos granulares lisan bicapas lipídicas vesiculares artificiales, dando lugar a - un incremento de la conductancia, comparable al ocasionado por las Poliperforinas (Duker y cols., 1983), apoyando la - teoría de que las Poliperforinas forman realmente canales - transmembrana.

7.4.2.- Desintegración nuclear de las células diana durante el ataque citolítico de las células T.

Desde los trabajos de Russell y cols. en 1980, y los de Duker en 1983, es bien conocida la intensa desintegración que sufre el DNA de la célula diana durante el ataque de las células T, formándose fragmentos de unos 200 pares de bases o múltiplos de ese número. La fragmentación del DNA resulta ser un proceso Ca^{++}-dependiente, siendo fuertemente inhibido por iones Zn^{++}, lo que sugiere un papel importante de la endonucleasa dependiente de Calcio en la degradación del DNA nuclear y subsecuente muerte celular en la citolisis mediada por células T. Sin embargo, es evidente también que los CTL lisan eficientemente células blanco enucleadas (Siliciano y Henney, 1978) y que los gránulos aislados hacen lo mismo con los hematíes, los cuales tampoco tienen núcleo. Estos hechos permiten suponer que la fragmentación del DNA nuclear mediada por células T, no es esencial para la lisis de las células diana, aunque pueda contribuir de forma importante a la muerte celular.

Así pues, el papel de los gránulos citolíticos en la fragmentación del DNA nuclear es algo todavía hipotético, aunque de un modo especulativo se hayan avanzado tres posibles mecanismos de acción:

a) La formación de poros en la membrana de las células diana por las perforinas granulares, permitiría la entrada de Calcio iónico y la posterior activación de endonucleasas endógenas.

b) Los gránulos podrían poseer factores activado-

ros per se de las endonucleasas endógenas.

c) Los gránulos podrían liberar e inyectar directamente endonucleasas en las células diana.

Más hipotético aún es el papel de los gránulos o de las perforinas en la diferenciación de precursores de células T a linfocitos citolíticos, ya que en esta dirección ni siquiera se ha comprobado si la adquisición de la capacidad citotóxica se correlaciona con el comienzo de la biosíntesis de perforinas u otras proteinas granulares.

C.- EL CRECIMIENTO DE TUMORES PRIMARIOS Y SU CONTROL

A pesar de todos los posibles mecanismos de vigilancia antitumoral descritos, muchos tumores primarios, independientemente de su origen, crecen progresivamente, matando finalmente al huésped; el cual, por otra parte, a menudo es capaz de responder inmunológicamente al tumor primario y en ciertos sistemas neoplásicos producir su rechazo y regresión (Key y Haskill, 1981; Lill y Fortner, 1973; Wheelock y Brodovsky, 1982). Sin embargo, existen limitaciones severas aún mal conocidas, que entorpecen la capacidad del sistema inmune para detener el crecimiento tumoral progresivo. La demostración más notable de tal limitación de la reactividad inmunológica del huésped frente a un tumor letal autólogo, se deduce del fenómeno ya comentado en el prólogo de esta Introducción, conocido como "inmunidad concomitante", por el que, según dijimos, un animal portador de un tumor primario progresivo, puede rechazar una segunda inoculación del mismo tumor en un sitio diferente (Hopper y cols.,

1979; Hopper y Nelson, 1979; North y Kirstein, 1977). Tanto los linfocitos T como los macrófagos parecen intervenir como células inmunológicas efectoras en este proceso. Tal reactividad sistémica frente a tumores autólogos ha sido detectada también en muchos tipos de tumores humanos.

1.- Reactividad inmunológica "in situ" frente a los tumores primarios.

Existen muchos sistemas tumorales animales en los cuales puede detectarse reactividad inmunológica de las células normales del huésped infiltrantes del tumor. Este proceso se detecta más fácilmente en aquellos sistemas donde a una fase inicial de progresión neoplásica, le sigue otra de rechazo y regresión, aunque también ha sido descrito en tumores progresivos letales.

El sistema estudiado de forma más extensiva ha sido el del sarcoma inducido por virus del sarcoma murino (MSV), en el cual la inyección intramuscular del virión en ratones inmunocompetentes da lugar a un pequeño foco tumoral, que luego regresa completamente sin recidivas posteriores. Son los linfocitos T citolíticos (CTL) los que aparentemente provocan el rechazo tumoral, puesto que las células T esplénicas de ratones con tumores MSV regresores expresan actividad citolítica específica para células con el antígeno o antígenos virales MSV en su membrana. Dicha actividad puede ser potenciada, si esos CTL son estimulados in vitro con el antígeno viral (Plata y cols., 1976; Plater y cols., 1981). Por otra parte, la depleción de células T en los ra-

tones impide el rechazo tumoral, en tanto que la infusión de células T inmunes frente al virus restaura dicha capacidad (Gorczynski, 1974). Trabajos más recientes han demostrado que mientras el rechazo de células linfomatosas transplantadas antígeno-MSV positivas requiere la participación de CTL Lyt-23$^+$, la protección del animal frente a tumores inducidos por MSV precisa solamente la presencia de células T helper Lyt-1$^+$ (Leclerc y Canter, 1980), puesto que estas células provocan una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado en el foco de crecimiento tumoral.

Otros autores han sugerido igualmente, que reacciones de hipersensibilidad tipo IV en el área tumoral pueden dar lugar al rechazo y regresión de las células cancerosas, por medio de una interacción entre células Lyt-1$^+$ y macrófagos (Nelson y Nelson, 1978; Nelson y cols., 1981b). Los macrófagos peritoneales y macrófagos infiltrantes del foco neoplásico de ratones con un tumor inducido por MSV, tienen efectos no específicos citostáticos o citolíticos sobre las células tumorales in vitro (Puccetti y Holden, 1979 Russell y McIntosh, 1977; Taniyama y Holden, 1979). Hallazgos que sugieren una posible activación macrofágica por factores liberados de las células T sensibilizadas frente al antígeno vírico correspondiente.

El panorama cambia cuando se utilizan preparaciones especiales de virus MSV que provocan la aparición de tumores muy poco inmunogénicos, o bien se inoculan preparaciones estándar MSV en animales inmunodeficientes (Becker y Haskill, 1980; Taniyama y Holden, 1979). En estos casos, la

reactividad inmunológica está considerablemente reducida, - de forma que la actividad CTL intratumoral es prácticamente nula (Gillespie y cols., 1977), así como la actividad NK - (Becker y Klein, 1976). A este respecto, en una reunión sobre los mecanismos de defensa inmunológicos asociados al foco tumoral, mantenida en la ciudad de Milán en diciembre de 1984, no se pudo llegar a conclusiones válidas sobre el hecho un tanto sorprendente de la escasez de células NK que - se encuentran en el área de infiltración de tumores primarios establecidos.

Al igual que la actividad NK y CTL, la de los macrófagos intratumorales también está drásticamente disminuida en este tipo de tumores progresores, bien por incapacidad de las células en sí, o por una reducción en el flujo - de macrófagos hacia el foco cancerígeno (Becker y Haskill, 1980; Russell y McIntosh, 1977).

Lill y Fortner en 1978, publicaron resultados similares a los obtenidos en el sistema MSV con transplantes de sarcomas regresores y progresores inducidos por radiación ultravioleta. Los sarcoma inmunogénicos, tanto los regresores como los proliferantes, estaban infiltrados con un número comparable de macrófagos, granulocitos y células B, pero el número de células T era tres veces superior en los regresores. Los linfocitos de los tumores en regresión producían citotoxicidad antígeno-específica in vitro, a diferencia de los asociados a los proliferantes que no lo hacían, sugiriendo que los CTL representan el mecanismo de rechazo principal en este sistema experimental. No obstante,

los macrófagos infiltrantes de ambos tipos tumorales eran - capaces también de ocasionar citotoxicidad inespecífica. En 1977 Haskill y en 1981 Key y Haskill, estudiando la inmunoreactividad local en carcinomas mamarios murinos en regresión, observaron fagocitosis de células tumorales y actividad citotóxica anticuerpo-dependiente en los macrófagos asociados a los tumores. Dicha actividad estaba dirigida contra células tumorales autólogas cubiertas con anticuerpo antitumor y no era operativa in vitro cuando se eliminaba el anticuerpo de las células neoplásicas. En los carcinomas mamarios progresores, la infiltración macrofágica era muy pobre y apenas se detectaba en ellos funcionalidad citotóxica o fagocítica.

Los resultados son mucho más contradictorios en - el caso de carcinomas mamarios humanos, donde algunos autores han demostrado que el mayor grado de infiltración macrofágica se observa precisamente en los casos con peor evolución y pronóstico (Mantovani y Evans, 1985). Además, existen evidencias claras de que los macrófagos, al menos en algunos estadios de la progresión tumoral, proporcionan un microambiente local óptimo para la proliferación neoplásica, secretando factores de crecimiento y/o favoreciendo la angiogénesis (Evans y Haskill, 1983; Mantovani, 1984).

Igualmente, otros autores, trabajando en distintos modelos tumorales experimentales, han podido comprobar niveles significativos de capacidad citolítica mediada por células (CTL, macrófagos o NK) en tumores con crecimiento - progresivo (Haskill y cols., 1975; DeLustro y Haskill, 1978

Flannery y cols., 1981; Robins y cols., 1979).

La demostración de actividad inmune antitumoral - "in situ" es más difícil en los procesos cancerosos humanos que en los modelos experimentales animales. No obstante, - Klein y cols. han detectado respuestas proliferativas de - linfocitos no adherentes asociados con un tumor determinado cuando se estimulaban con extractos antigénicos tumorales - in vitro (Klein y cols., 1980). También fueron capaces de - detectar en diferentes tipos de carcinomas una actividad citolítica significativa mediada por linfocitos T.

Ya hemos comentado la llamativa falta de una actividad NK local apreciable en la mayoría de los tumores humanos (Mantovani y cols., 1980; Pierce, 1978; Vose y Moore, - 1979; Vose y cols., 1977), una observación que puede tener una base inmunorregulatoria. También en algún caso ha sido posible detectar actividad local CTL específica de tumor - frente a linfomas de Burkitt, quizá dirigida frente a especificidades del virus de Epstein-Barr (Jondal y cols., - 1975). Eibergen y cols. en 1972 comprobaron que en melanomas malignos existían fenómenos fagocíticos mediados por macrófagos de células tumorales sensibilizadas con anticuerpo (Eibergen y cols., 1972). Más recientemente, en este mismo tipo de tumores, se ha demostrado que existe una regulación inmune diferente en el foco primario con respecto a las metástasis. En efecto, en el caso de melanomas primarios DR - positivos, los cultivos mixtos autólogos linfocito-célula - tumoral eran positivos. Sin embargo, las células melanomatosas metastásicas DR positivas, no sólo no inducían respues-

tas apreciables en los linfocitos autólogos, sino que además suprimían la generación de células citotóxicas en cultivos mixtos de leucocitos. Es pues evidente, que la expresión de antígenos HLA de clase II (DR) tiene un significado biológico diferente, en este caso, dependiendo de que la célula maligna pertenezca a la lesión primaria o metastásica (Mantovani y Evans, 1985).

En resumen, puesto que la modulación de la inmunidad frente a un proceso neoplásico determinado va a depender en última instancia de la alteración en las relaciones huésped-tumor dentro del propio tejido canceroso, parece importante cambiar el enfoque investigador, centrándolo fundamentalmente en el área tisular tumoral, ya que actualmente la información disponible es escasa, pero muy sugerente, de que el estudio de la función inmune sistémica proporciona datos no necesariamente representativos de los procesos reguladores intratumorales.

2.- Control local no inmunológico del crecimiento de tumores primarios.

La viabilidad y capacidad proliferativa de las células tumorales, como la de las células en general, depende en última instancia de su acceso a elementos nutrientes y factores promotores del crecimiento. Por ello, los tumores sólidos esferoidales no vascularizados, tienen una capacidad de crecimiento autolimitada in vivo (Boyd, 1966) o in vitro (Folkman y Hochberg, 1973), puesto que la proliferación de sus células está restringida al grado de difusión

de nutrientes al interior de la masa tumoral. Los tumores - pueden inducir su propia vascularización elaborando factores angiogénicos (Folkman, 1974); sin embargo, el huésped - puede controlar este proceso y, por tanto, restringir el - crecimiento neoplásico, elaborando a su vez factores antiangiogénicos (Brem y Folkman, 1975).

Los leucocitos y monocitos que se acumulan en la periferia de la masa tumoral, tienen la posibilidad de controlar y provocar la regresión del tumor, lesionando, a través de la producción de radicales intermedios de oxígeno - con gran poder oxidante, la microvasculatura que alimenta - al tumor (Galli y cols., 1982).

El huésped puede igualmente restringir el crecimiento neoplásico primario, reduciendo la síntesis de factores elaborados por él, que sin embargo son necesarios para la proliferación de las células cancerosas. Por ejemplo, - los tumores hormonodependientes reducen o dejan de proliferar in vivo (Noble y Hoover, 1975) o in vitro (Yuhas y Tarleton, 1978) en un ambiente deficiente en la hormona que - les es necesaria. No obstante, los tumores pueden obviar esta presión restrictiva seleccionando células no hormonodependientes (Yuhas y Tarleton, 1978).

D.- LA INVASION TUMORAL Y LAS METASTASIS: SU CONTROL

Las células de los tumores malignos son biológicamente heterogéneas (Fidler y Hart, 1982). Esta heterogeneidad parece tener su base en la evolución de células neoplá-

sicas con un origen unicelular (Nowell, 1982). La progre- sión de los tumores desde la primera célula transformada hasta el estado maligno, es la resultante de una inestabili- dad genética creciente de las células proliferantes, dando lugar a la aparición, dentro de un mismo tumor, de células individuales con propiedades distintas, incluyendo su capa- cidad de invasión y metástasis (Hart, 1980). Las células me- tastásicas tienen muy probablemente un origen clonal (Tal- madge y Wolman, 1982), como resultado de una selección de variantes celulares dentro de la población neoplásica, que adquieren la capacidad de abandonar la masa tumoral prima- ria, invadiendo los tejidos circundantes y colonizando con éxito tejidos distantes del foco primario.

1.- Invasión tumoral.

Para que las células cancerosas metastaticen des- de una masa tumoral localmente proliferante, deben llegar primero hasta los vasos sanguíneos o linfáticos. En este proceso, llamado invasión, las células neoplásicas atravie- san las membranas basales celulares endoteliales que delimi- tan los capilares. Un fenómeno común a todos estos pasos es la motilidad de las células tumorales, la cual a su vez su- pone la ausencia de inhibición por contacto en este tipo de células. La capacidad de las células neoplásicas para mover- se libremente sobre la superficie de otras células, permite a las primeras el poder migrar desde la masa tumoral. La mi- gración de las células cancerosas es el resultado de la pre- sión mecánica de la masa neoplásica, por una parte (Eaves, 1973), y posiblemente de la actuación de factores quimiotác-

ticos por otra (Varani, 1982).

Durante el paso de las células malignas a través de las membranas basales, pueden observarse microscópicamente en ellas fenómenos de disolución (Ozello, 1959; Rubio y Biberfeld, 1975), sugerentes de uno o varios mecanismos enzimáticos. Efectivamente, en varios tipos de tumores se ha comprobado que las células metastásicas son capaces de solubilizar el colágeno de tipo IV (la proteína estructural principal de las membranas basales), mientras las células del tumor primario apenas lo hacen (Kefalides, 1973; Liotta y cols., 1977). Además, aquellas células malignas con niveles más elevados de colagenasa tipo IV son las que tienen más propensión a metastatizar espontáneamente (Liotta y cols., 1980). Así pues, las membranas basales que se interponen entre el tumor y la corriente sanguínea o linfática, tal vez constituyan barreras efectivas capaces de frenar el movimiento de aquellas células tumorales carentes de colagenasa tipo IV.

El paso final de la invasión es la penetración a través de las células endoteliales que delimitan los capilares sanguíneos o linfáticos, por medio de pseudópodos que logran introducirse entre las intersecciones de células contiguas, de forma que al cabo de unos minutos las células endoteliales retraen sus membranas citoplasmáticas de esos puntos de intersección, probablemente por liberación de enzimas elaboradas por las células neoplásicas. Este proceso final de retracción, puede ser contenido por inhibidores de las proteasas presentes en el tejido conectivo (Sorgente y

cols., 1975).

Otra forma de llegar a la corriente sanguínea es a través de un proceso de angiogénesis dentro de la masa tumoral. La penetración en la sangre se hace ahora rápidamente, al igual que la migración metastásica (Warren y Shubik, 1966).

2.- Embolización de células tumorales.

Las células tumorales que entran en la circulación, encuentran una variedad de factores y mecanismos citolíticos que hacen ese ambiente enormemente estresante para la célula neoplásica. La mayoría de los estudios practicados en animales, han puesto de manifiesto que hasta el 99,9% de las células malignas que llegan a la sangre son destruidas en la propia circulación (Fidler y Gerster, 1978). Así pues, el proceso metastásico es extremadamente ineficiente, ya que el microambiente de la circulación constituye el principal sistema de control del huésped frente a la diseminación de los tumores.

El alto grado de eficacia que muestra el torrente sanguíneo en la lisis tumoral, hace de este paso, en el proceso metastásico, un elemento esencial para la intervención terapéutica, una vez detectada una masa localizada o tras la excisión quirúrgica de la misma. Las investigaciones realizadas para identificar los mecanismos líticos de la sangre, indican que la reacción frente a los émbolos tumorígenos es un proceso multifactorial que comprende respuestas -

de linfocitos T frente a antígenos tumorales específicos - (Fidler y Gersten, 1973; Fidler y Kripke, 1980), respuestas inmunes inespecíficas mediadas por macrófagos (Den Otter y_ cols., 1977; Fidler, 1974) y células NK, así como mecanis - mos de citotoxicidad anticuerpo-dependientes (Hanna y Bur - to, 1981; Hanna y Fidler, 1980; Talmadge y cols., 1980).

3.- Asentamiento y crecimiento de la célula tumoral metas_ tásica.

La localización y capacidad de crecimiento de las células tumorales migratorias en un órgano diana, es un paso importante en el proceso metastásico. Un número significativo de experimentos animales y observaciones clínicas - (Hart, 1982; Poste y Fidler, 1980; Sugarbaker, 1980) han - puesto de manifiesto que determinados tumores metastatizan_ sistemáticamente en un órgano diana específico. Aunque los_ patrones de migración tumoral a partir de la masa primaria_ están determinados en parte por la localización anatómica - de ésta y por factores hemodinámicos (Weiss y cols., 1980), no son éstos, sin embargo, los factores básicos a conside_ rar. En efecto, han sido varios los autores que han comprobado interacciones adhesivas específicas entre las células_ endoteliales vasculares y las células tumorales circulantes (Poste y Nicolson, 1980; Sinha y Goldenberg, 1974; Talmadge y Wolman, 1982). Este fenómeno puede demostrarse in vitro,_ observando la agregación particular de células tumorales - con suspensiones celulares de los órganos diana (Hart, - 1982). Este mecanismo sugiere la existencia en la superfi - cie de las células, tanto neoplásicas como endoteliales, de

moléculas que actuarían como verdaderas unidades de reconocimiento órgano-específico, permitiendo a las células metastásicas alcanzar y colonizar los tejidos en cuestión.

Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que los patrones metastásicos in vivo cambian cuando se tratan enzimáticamente las superficies de las células malignas, lo cual conllevaría la destrucción de las unidades moleculares de reconocimiento (Sinha y Goldenberg, 1974). Igualmente, la embolización experimental en capilares pulmonares de células neoplásicas que normalmente no metastatizan ese órgano, no provoca la extravasación de dichas células y consiguiente desarrollo de metástasis en el estroma pulmonar (Nicolson y Custead, 1982).

Otros factores sanguíneos, tales como la agregación plaquetaria inducida por una proteasa semejante a la catepsina B liberada por las células tumorales, o mecanismos anticoagulantes puestos en marcha por el huésped, pueden favorecer o dificultar respectivamente la fijación órganoespecífica de una célula metastásica determinada (Honn y cols., 1982; Brown, 1973).

4.- Control mediado por linfocitos T de las metástasis tumorales.

En el Prólogo de esta Introducción llamamos la atención sobre dos paradojas básicas de la inmunología tumoral. La primera se refería al hecho de que el huésped portador de un foco tumoral desarrolle normalmente una respuesta

inmune de tipo T frente a los antígenos tumorales; pero en la mayoría de los casos esa respuesta es inefectiva para controlar el crecimiento tumoral. La segunda se refería al fenómeno denominado "inmunidad concomitante", descrito por Ehrlich en 1906, al observar que un animal portador de un tumor progresivo podía suprimir el crecimiento de pequeños inóculos de células pertenecientes al mismo tumor, implantados en lugares distantes al foco primario.

Estos dos fenómenos acontecen igualmente en el caso de las neoplasias humanas, constituyendo la inmunidad concomitante el principal mecanismo de control de la diseminación metastásica, ya que las células migratorias en la sangre son susceptibles al ataque de los linfocitos T citolíticos (Gorelik y cols., 1982), al contrario que sus homólogas del foco primario.

Aunque en un principio se pensó que sólo las células T citolíticas eran las responsables de la inmunidad concomitante (North y Kirstein, 1977), estudios más recientes han demostrado que determinadas poblaciones de macrófagos activados inespecíficamente, posiblemente inducidos por células T helper, contribuyen también a la supresión inmune concomitante del crecimiento tumoral (Hopper y cols., 1979; Hopper y Nelson, 1978). A pesar de la efectividad de los CTL frente a las células metastásicas, éstas pueden evitar su destrucción por medio de, al menos, tres mecanismos básicos: a) modulación de los antígenos asociados con el tumor; b) selección de células metastatizantes no inmunogénicas dentro del foco primario; 3) regresión genética estable de

la expresión de antígenos asociados al tumor por las célu - las metastatizantes, como resultado de la selección y pre - sión de la inmunidad antitumoral (Bosslet y Schirrmacher, - 1981). En 1973, Proctor y cols. observaron que después de - inyectar suero de ratas portadoras de un tumor en ratas nor males, éstas destruían células neoplásicas del mismo tipo - que las primeras, cuando se les inoculaban intravenosamente (Proctor y cols., 1973). En sus conclusiones aludían a un - factor humoral protector, y aunque no pudieron demostrar an ticuerpos libres, sí demostraron la existencia de complejos antígeno-anticuerpo, los cuales podrían actuar a través de_ la fijación del anticuerpo a los receptores Fc de los mono- citos (Thomson y cols., 1973).

5.- Control por macrófagos y células NK de las metástasis tumorales.

Han sido numerosos los estudios llevados a cabo - sobre el papel que los macrófagos juegan en el control y re sistencia del huésped al crecimiento de las metástasis tumo rales -- revisados por Levy y Wheelock en 1974 --. Actual - mente, sigue siendo tema de discusión, sin embargo, si los_ macrófagos que infiltran las masas tumorales secundarias se comportan como elementos defensivos, o más bien como coadyu vantes del crecimiento tumoral, hecho éste último bien de - mostrado, como ya hemos descrito anteriormente, en ciertos_ tumores de mama (Mantovani y Evans, 1985). Igualmente, Man- tovani en 1978 y Russell y McIntosh en 1977, comprobaron - que los macrófagos infiltrantes de sarcomas no metastatizan tes eran citotóxicos in vitro, mientras los aislados de me-

tástasis sarcomatosas estimulaban inespecíficamente el crecimiento tumoral.

A pesar de esta dicotomía en los resultados, parece evidente que los macrófagos representan normalmente un mecanismo de control en la expansión neoplásica. La transferencia pasiva intravenosa a ratones de macrófagos singéni - cos activados, en un sistema experimental diseñado por Fidler, redujo la formación de metástasis pulmonares del melanoma B16 (Fidler, 1974). Otros investigadores han demostrado también que los macrófagos activados pueden inhibir el - crecimiento tumoral primario y metastásico (Den Otter y - cols., 1977).

El bloqueo funcional del macrófago con agentes como la sílice, parece facilitar la oncogénesis a distancia - (Levy y Wheelock, 1974). Por el contrario, cuando se estimula la actividad citolítica macrofágica con modificadores de la respuesta biológica, tales como liposomas cargados con - factores activadores del macrófago, se reduce o inhibe en - ratones la incidencia de metástasis (Fidler, 1980).

En cuanto a las células NK, parece existir una estrecha correlación entre los niveles de actividad celular - NK y la capacidad del huésped para eliminar células tumorales circulantes. Ratones con niveles bajos de actividad NK, tienen mayor incidencia de metástasis que los normales (Herberman y cols., 1979; Roder y Duwe, 1979; Seaman y cols., - 1978). Sin embargo, ratones con actividad NK elevada son, - en muchos de los sistemas experimentales probados, resisten

tes a las metástasis (Warner y cols., 1977; Gidlund y cols. 1978). La transferencia pasiva de células NK a ratones defi cientes en ellas, incrementó su resistencia a las metásta - sis (Hanna, 1982; Hanna y Burton, 1981), hecho que no ocu - rre cuando se transfieren células depleccionadas de activi- dad NK.

El que las células NK puedan destruir células neo plásicas circulantes y reducir o prevenir la incidencia de_ metástasis, tiene implicaciones terapéuticas importantes, - ya que puede diseñarse la utilización de modificadores de - la respuesta biológica para estimular la actividad NK e in- crementar incluso el espectro de dianas tumorales posibles, que de otra forma escaparían al control del sistema inmune.

V.- MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL

La capacidad de un tumor determinado para crecer_ progresivamente en presencia de células citotóxicas efecto- ras del huésped, indica claramente que las células neoplási_ cas son capaces de evadir los mecanismos de rechazo puestos en marcha por las células inmunocompetentes. En última ins- tancia, es muy posible que sea la heterogeneidad celular de un tumor la que determine su capacidad de evasión ante los_ sistemas efectores del huésped. La diversidad biológica de_ las células constitutivas de un tumor primario, incluye ca- racterísticas tales como velocidad de crecimiento, inmunoge_ nicidad, inmunosensibilidad y capacidad metastásica. La ge- neración de esa diversidad es en parte consecuencia de la - evolución y progresión tumoral (Fidler y Hart, 1982), y en_

parte refleja también una presión selectiva impuesta por el huésped (Doublet y Schirrmacher, 1981).

Desde una perspectiva homeostática, podemos considerar que el escape inmunológico de una célula maligmizada tiene lugar cuando el balance entre los factores que favorecen el crecimiento tumoral y los que tratan de impedirlo se desequilibra a favor de los primeros.

Algunos mecanismos de escape son tan potentes que llegan no sólo a bloquear los circuitos inmunovigilantes, sino también a incorporar algunas de las actividades biológicas de éstos en su propio provecho (Dvorak y cols., 1979; Hawrylko, 1978).

A continuación se exponen brevemente algunos de los factores de evasión mejor conocidos.

A.- GENETICA TUMORAL: CAMUFLAJE.

En animales inmunizados, la administración de células tumorales en dosis lo suficientemente pequeñas, provoca la constitución y desarrollo posterior de una masa tumoral progresiva, fenómeno que no tiene lugar cuando se administran dosis mayores de células neoplásicas, ya que en este caso son rechazadas; así pues, bajo condiciones teóricamente óptimas para el rechazo, las células neoplásicas pueden "camuflarse por completo" y no se reconocidas hasta que ya hayan sobrepasado la capacidad antitumoral del huésped (Moller y Moller, 1978; Prehn, 1976).

B.- MODULACION ANTIGENICA.

En presencia del anticuerpo correspondiente, algunos antígenos de superficie sufren procesos de modulación, tales como liberación al medio exterior, endocitosis y redistribución en la membrana misma sin que, en este caso, se pierdan completamente los determinantes antigénicos de la superficie celular. Este fenómeno, que es distinto del de polarización antigénica o "capping", facilita el escape tumoral eliminando los antígenos diana que pudieran ser reconocidos por las células efectoras del sistema inmune (- Hawrylko, 1978).

C.- ENMASCARAMIENTO DEL ANTIGENO.

Ciertas moléculas, tales como la sialomucina y la fibrina, que frecuentemente se hallan unidas a la superficie de las células neoplásicas, pueden enmascarar los antígenos tumorales, bloqueando la fijación de los linfocitos citotóxicos y demás células efectoras (Dvorak y cols., 1979) El tratamiento con neuraminidasa degrada estas proteinas de superficie bloqueantes, evitando su enmascaramiento.

D.- LIBERACION DEL ANTIGENO.

En el suero de muchos animales y pacientes humanos portadores de un tumor, se han detectado antígenos tumorales solubles. Estas moléculas tienen la capacidad de comprometer la actividad de las células T inmunocompetentes frente al tumor, por saturación de las estructuras molecula

res de reconocimiento presentes en la membrana de esos linfocitos, particularmente los que se encuentran en el microambiente tumoral y zonas próximas, donde la concentración del antígeno liberado es más alta (Herberman y cols., 1980; Ingenito y Calkins, 1981).

E.- TOLERANCIA.

El ejemplo más característico de inhibición específica de la respuesta inmune normal a los antígenos tumorales, lo constituye la interrelación del huésped murino correspondiente con el tumor producido por el virus tumoral mamario (MTV). El virus se transmite por medio de la leche materna (los ratones alimentados con biberón no se infectan y por tanto no desarrollan la neoplasia).

Mediante experimentos de transplante, puede demostrarse que los tumores mamarios son más antigénicos en ratones que carecen del virus que en aquellos que lo adquirieron en los primeros períodos después del nacimiento. Aquellos ratones que son infectados congénitamente, desarrollan tolerancia inmunológica a ciertos antígenos comunes al virus y a los tumores resultantes (Herberman, 1983).

La tolerancia a determinados cánceres puede producirse también, y así lo indican numerosos autores (Perry y Greene, 1981; Plater y cols., 1981; Takei y cols., 1977), por la generación de células T supresoras aparentemente inducidas por el tumor, que suprimen la generación de linfocitos T citotóxicos in vitro, así como las respuestas de tipo

humoral específico. Los antisueros frente a determinantes - de la subregión I-J, que se expresan en células T supreso - ras, provocan un retardo del crecimiento tumoral.

No obstante, existe una polémica actual muy viva_ sobre el problema de las células T supresoras en los tumo - res y si son fruto de una "up-regulation" o bien la conse - cuencia de una "down-regulation". Este problema ha sido dis_ cutido ya va ias veces a lo largo de esta Introducción y - por tanto no volveremos sobre él.

F.- ATRAPAMIENTO DE LINFOCITOS.

Es posible que in vivo, el atrapamiento de linfo- citos antitumorales específicos en los nódulos linfáticos - que drenan la masa tumoral, pueda facilitar el escape tumo- ral (Hawrylko, 1978). En estos nódulos linfáticos el nivel_ de antígenos tumorales podría hacer tolerantes a los linfo- citos locales, mientras la reactividad de los linfocitos en nódulos distantes sería normal. No obstante, en la circula- ción de no pocos pacientes con procesos malignos avanzados, puede demostrarse un número apreciable de células citotóxi- cas efectoras (Pierce, 1978).

G.- FACTORES GENETICOS.

El haplotipo HLA del huésped, podría ser un fac - tor a tener en cuenta en determinados procesos de maligniza_ ción, donde la ausencia o debilidad de la respuesta inmune_ (sobre todo de tipo T) vendría condicionada genéticamente,_

de una forma análoga a la respuesta CTL frente a células infectadas por virus. En efecto, en el caso de infecciones con varios tipos víricos murinos y con el virus de la influenza humano, los huéspedes con determinados haplotipos MHC son pobres inductores de linfocitos T citotóxicos activos frente a células infectadas, probablemente por incapacidad de los productos del MHC para formar complejos de asociación adecuados con el antígeno vírico.

Hoy en día, sin embargo, este problema se plantea desde otra perspectiva, considerando que en la mayoría de estos casos lo que acontece es un fallo en la expresión de antígenos de clase I en las células malignizadas, hecho que favorece su escape del sistema inmune (Lampson y cols., 1983).

H.- FACTORES BLOQUEANTES.

Cuando la célula tumoral libera sus antígenos, éstos pueden formar complejos con los anticuerpos antitumor específicos. Estos complejos tienen dos posibilidades de bloquear la citotoxicidad T-específica: a) bien por unión directa a los CTL, evitando así su acoplamiento con las células cancerosas; b) o bien por unión a las células T helper, bloqueando el reconocimiento del tumor por éstas, que, evidentemente, no secretarán factores activadores de los CTL.

Adicionalmente, si el anticuerpo es ineficaz, puede unirse al antígeno tumoral específico en la membrana de

la célula tumoral, anulando la fijación a ésta de las células T citotóxicas y T helper. Incluso si el anticuerpo específico resulta ser potencialmente eficaz para matar la célula tumoral (por su capacidad para fijar Complemento, por ejemplo), los antígenos tumorales libres en el medio pueden anular su efecto potencial uniéndose a él, de forma que éste, a su vez, no pueda hacerlo con la célula tumoral (Nelson y cols., 1981a; Ting y cols., 1979; Ting y cols., 1977).

El lugar operativo de estos factores bloqueantes sería fundamentalmente en las inmediaciones y dentro del tumor, ya que de otra forma no se explica el ya consabido fenómeno de la "inmunidad antitumoral concomitante".

I.- PRODUCTOS TUMORALES.

Otros factores distintos a los antígenos tumorales pueden modular negativamente la respuesta inmune frente a la célula neoplásica. Las Prostaglandinas, derivados lipídicos que regulan negativamente la función Killer y Natural Killer, constituyen un ejemplo de tales productos. No es evidente, no obstante, que esos productos provengan de la célula tumoral en todos los casos, ya que en 1977 Goodwin y cols. apuntaron la posibilidad de que la inhibición de la respuesta celular citotóxica en pacientes con Enfermedad de Hodgkin, estuviera mediada por la prostaglandina inmunosupresora PGE_2, sintetizada y liberada por los propios macrófagos del huésped. Algunos autores han llegado incluso a afirmar, que la liberación de factores del tipo de la PGE_2 por los macrófagos del huésped, serían los responsables de

la práctica total ausencia de actividad NK in situ, en el caso de los tumores humanos (Mantovani y cols., 1980; Vose y Moore, 1979; Vose y cols., 1977).

De la misma forma, otros factores humorales actuando inespecíficamente podrían alterar las respuestas inflamatorias, la quimiotaxis o la activación del Complemento, elementos muy importantes en la respuesta antitumoral.

J.- FACTORES DE CRECIMIENTO.

Es bien conocido que la amplificación de las respuestas celulares T depende estrechamente de la disponibilidad de interleukinas. Cualquier perturbación de la producción de IL-1 por los macrófagos o de la IL-2 por los linfocitos T, reduciría el grado de cooperación entre distintas subpoblaciones de células T, limitando la respuesta antineoplásica. Las investigaciones actuales con interleukina-2 exógena, como agente potenciador de la inmunidad celular en sistemas tumorales experimentales y en el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, vienen a apoyar la idea de que un disbalance en determinados factores del crecimiento favorecería el crecimiento tumoral (Rosenberg, 1985).

O B J E T I V O

OBJETIVO

Tanto en seres humanos como en animales de experimentación, en situaciones que conllevan una alteración del estatus inmunológico del huésped, se observa un incremento llamativo en la incidencia de tumores de estirpe linfoide. Inicialmente, se pensó que el mecanismo patogénico subyacente a estos procesos de malignización era un déficit en los circuitos de inmunovigilancia del paciente o del animal en los que se originaba la neoplasia.

Sin embargo, el concepto de inmunovigilancia, - aparte de las restricciones de todo tipo que ha recibido - desde su formulación inicial, es incapaz de explicar el por qué en los estados inmunodeficitarios se originan casi exclusivamente tumores de origen linfoide o del sistema mononuclear-fagocítico.

Otros autores han apuntado la posibilidad de que sea una disregulación previa del sistema inmune del huésped, tal como sucede en pacientes con enfermedades autoinmunes, la alteración básica responsable del incremento en las frecuencias de tumores de estirpe linfoide en los estados disinmunes.

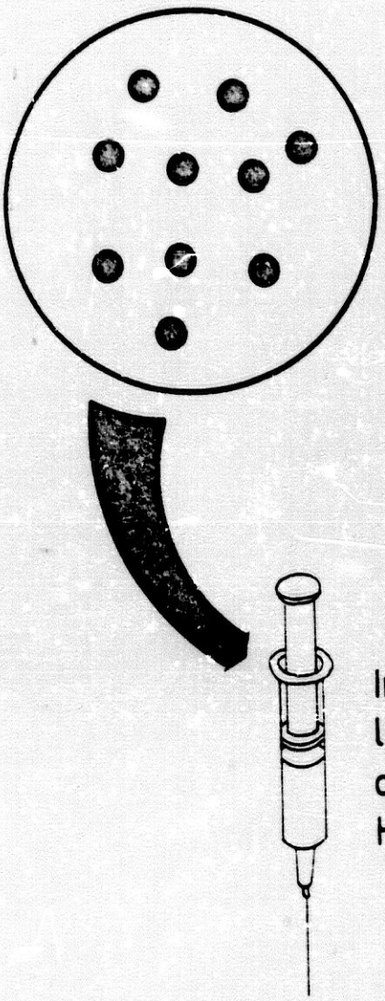
Por otra parte, experimentos más recientes, utilizando modelos de inmunización animal con células semialogénicas, han enfatizado la hipótesis de que una estimulación persistente de un huésped inmunocompetente por un antígeno

o antígenos que no pueden ser eliminados en un período de - tiempo adecuado, podría dar lugar a una disregulación del - sistema inmune del receptor, no siendo por tanto necesaria_ la premisa de una alteración previa en la inmunorregulación del huésped, para explicar el aumento en la incidencia de - procesos linfoproliferativos en aquellos pacientes que de - una u otra forma presentan una alteración de sus circuitos_ inmunorreguladores.

De acuerdo con este último planteamiento, nosotros concebimos la posibilidad de provocar una transformación tumoral en células de receptores inmunocompetentes (ratones de la cepa BALB/c) mediante la inoculación de células plenamente alogénicas con un alto potencial de supervivencia en un medio adverso; por ello elegimos células tumorales (MCG3 en nuestro caso) originadas en un animal histoincompatible con el primero (Vid. Fig. 22).

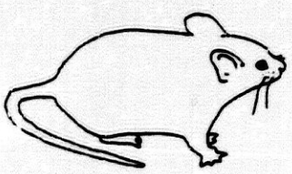
El segundo objetivo, si lográbamos efectivamente_ provocar una neocarcinogénesis en los tejidos de los ratones receptores (BALB/c), consistiría en caracterizar inmunobiológicamente el o los tumores obtenidos en el huésped.

FIGURA 22



Células tumorales con haplotipo H2=X

Inoculación de las células tumorales en un animal con haplotipo H2 incompatible.



Ratón con haplotipo H2=Y

MATERIALES Y METODOS

I.- MATERIALES

A.- RATONES

Se han utilizado ratones de las siguientes cepas endogámicas:

- BALB/c ($H\text{-}2^d$)
- DBA/2 ($H\text{-}2^d$)
- B10 ($H\text{-}2^b$)
- C57BL/6 ($H\text{-}2^b$)
- C57BL10 ($H\text{-}2^b$)
- (C57BL/6 × BALB/c)F1 ($H\text{-}2^{b,d}$)
- (BALB/c × CBA)F1 ($H\text{-}2^{d,k}$)
- (CBA × C57BL10)F1 ($H\text{-}2^{k,b}$)

Criados en el criadero de animales del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina, procedentes de padres donados por Charles River (Francia) y Hannover. Se eligieron ratones machos entre 10-16 semanas de edad.

B.- LINEAS CELULARES TUMORALES Y CELULAS NORMALES

Células	Origen
Raji	Linfoma humano tipo Burkitt
EL-4	Timoma de la cepa C57BL/6
P815-X2	Mastocitoma cepa DBA/2
YAC-1	Linfoma de la cepa AJAX
L5178Y/ES	Linfoma de la cepa DBA/2
Timocitos murinos	Cepa C57BL/6

Células	Origen
Macrófagos murinos	Cepa BALB/c
Esplenocitos murinos	Cepa BALB/c
Esplenocitos murinos	Cepa C57BL/6
Polimorfonucleares periféricos .	Humanos
Mononucleares periféricos	Humanos
Cél. monocíticas periféricas ...	Humanos
PMN eosinofílicos periféricos ..	Humanos

C.- MATERIAL INSTRUMENTAL

1) Autoclave (Hirayama, Japón)
2) Estufa Pasteur (Comercial Técnica Hospitalaria S.A., - España)
3) Contenedor de Nitrógeno líquido, DX-55-AT (L'air liqui de, Francia)
4) Cámara estéril por flujo laminar, Gelaire (Flow, Inglaterra)
5) Centrífugas:
   - Centrífuga Macrotomic (Selecta, España)
   - Centrífuga refrigerada, IEC B-20 A (Damon)
   - Centrífuga de brazo fijo en ángulo de 45º, -- Moltronic (Ortho, R.F. Alemania)
6) Microscopios:
   - Microscopio óptico de contraste de fase (Zeiss R.F. Alemania)
   - Microscopio de fluorescencia (Reichert, Austria)
   - Microscopio con objetivo invertido de contraste de fase (Leitz, USA)

7) Incubador de CO_2 (5%), 3028 (Forma Scientific, USA). - Es una estufa, regulada a 37ºC, con una atmósfera humedificada y rica en CO_2 (5% de CO_2 y 95% de aire)

8) Recolector semiautomático de células, Titertek (Skatron, USA)

9) Contadores:

- Contador de radioactividad β, Betamatic (Kontron, Suiza)
- Contador de radioactividad γ, Ultrogamma (LKB Suecia)

10) pHmetro, 601 A/digital (Orion Research, USA)

11) Espectrofotómetros:

- Espectrofotómetro Spectronic 740 (Bausch and - Lomb, USA)
- Espectrofotómetro Photon (Hybritech, USA)

12) Fluorímetro Photon (Hybritech, USA)

13) Fuente monitor electroforesis (LKB, Suecia)

14) Equipo de electroforesis (LKB, Suecia)

15) Balanza de precisión H-16 (Mettler, Suiza)

16) Placas de microcultivo de fondo plano (Sterilin, Inglaterra)

17) Pipetas:

- Pipetas automáticas Hamilton (Hamilton Bonaduz AG, Suiza)
- Pipetas Pasteur desechables (Labclinics, España)
- Pipetas Pasteur de vidrio (Brand, R.F. Alemania)
- Pipetas de plástico desechables de 10, 5 y 2 - ml. (Nunc, Dinamarca)

18) Papel de filtro GF/A (Whatman, Inglaterra)

19) Filtros estériles de 0,22 y 0,40 u de diámetro de poro (Millipore, USA)

20) Tripa de diálisis de 12.000 daltons de diámetro de poro, Visking (Serva, R.F. Alemania)

21) Frascos de cultivo celular:

- Frascos de 75 cm^2 y 200 ml (Costar, Holanda)
- Frascos de 25 cm^2 y 50 ml (Costar, Holanda)

22) Tubos:

- Tubos de ensayo universales (Labclinics, España)
- Tubos de plástico de 10 y 25 ml (Sterilin, Inglaterra)
- Tubos de polivinilo de 50 ml (Costar, Holanda)

23) Placas de Petri de 10 x 33 mm y 15 x 60 mm (Nunc, Dinamarca)

24) Cámara de recuento microscópico celular Neubauer (Saariegia, R.F. Alemania)

D.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

1) RPMI 1640 + 10% Suero fetal de ternera (incompleto)

2) RPMI 1640 + 20% Suero fetal de ternera + aa no esenciales + 2-mercaptoetanol (5×10^{-5} M) + piruvato sódico (completo)

3) Solución de Krebs-Ringer pH 7,2-7,4

4) DMEM + 10% Suero fetal de ternera

5) MEM-HANKS + 10% Suero fetal de ternera

6) Solución salina tamponada con fosfato pH 7,2-7,4

7) Tampón veronal salino con Ca^{++} y Mg^{++} pH 7,2-7,4

8) Solución de eosina al 3% en PBS
9) Solución de formaldehido al 35%, pH 7,2-7,4
10) Solución PBS + Tween 20 0,5%, pH 7,4
11) Solución PBS + Tween 20 0,5% + Albúmina sérica bovina, pH 7,4
12) Solución Tris 0,9 M / EDTA 0,02 M / Ac. bórico 0,5 M , pH 8,6
13) Tampón Tris 0,1 M / Fosfato monosódico 0,1 M, pH 7,4
14) Solución Tris 0,22 M / Ac. cítrico 0,086 M, pH 6,2
15) Solución Tris 0,1 M / Ac. cítrico 0,031 M, pH 7
16) Solución salina 3,6% (4x)
17) Tampón acetato sódico 0,2 M, pH 5,2
18) Tampón Tris-ClH 0,1 M, pH 9
19) Tampón fosfato potásico 0,1 M + 0,5% acetona, pH 5,8
20) Tampón fosfato potásico 0,1 M + 0,5% acetona, pH 7,2
21) Tampón fosfato potásico 0,1 M + 0,5% acetona, pH 6,5
22) Solución de formaldehido-acetona (8% y 50% respectivamente) tamponada con Fosfato, pH 6,6
23) Solución de formaldehido al 4%, tamponado con fosfato + cloruro cálcico al 1%
24) Mezcla etanol absoluto / acetona / ácido acético glacial (6/3/1)

E.- REACTIVOS Y COMPONENTES ESPECIALES

1) Inmunoglobulina de cabra anti-Ig de ratón marcada con peroxidasa (Bio-Rad)
2) Inmunoglobulina de cabra anti-Ig de ratón marcada con fluoresceina (Cappel)
3) Esferas de poliestireno acopladas a inmunoglobulina de

conejo anti-Ig de ratón (Bio-Rad)

4) Fracción 19S (IgM) de conejo anti-estroma de hematíes ovinos (Cordis)

5) Fracción 19S (IgM) de conejo anti-estroma de hematíes bovinos (Cappel)

6) Suero anti-cadena kappa de ratón, obtenido en cordero, marcado con fluoresceina (Nordick)

7) Suero anti-cadena lambda de ratón, obtenido en cordero marcado con fluoresceina (Nordick)

8) Suero anti-IgG de ratón, obtenido en cabra, marcado con fluoresceina (Nordick)

9) Sueros monoespecíficos anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM de ratón, obtenidos en conejo (Nordick)

10) IgG de conejo (fracción 7S) anti-hematíes de carnero (Nordick)

11) Fracción inmunoglobulínica humana 7S (Miles)

12) Anticuerpos monoclonales anti-células de ratón:

- Ac. Monoclonal NEI 017 (New England Nuclear)
- Ac. Monoclonal NEI 006 (New England Nuclear)
- Ac. Monoclonal NEI 020 (New England Nuclear)
- Ac. Monoclonal NEI 001 (New England Nuclear)
- Ac. Monoclonal 16-3-22N (Bionetics)
- Ac. Monoclonal 26-7-11S (Bionetics)
- Ac. Monoclonal 28-13-3S (Bionetics)
- Ac. Monoclonal 31-3-4S (Bionetics)
- Ac. Monoclonal 34-1-2S (Bionetics)
- Ac. Monoclonal 34-5-3S (Bionetics)
- Ac. Monoclonal 34-5-8S (Bionetics)
- Ac. Monoclonal M5/114 (Hybritech)
- Ac. Monoclonal MAS-034 (Sera-Lab)
- **Ac. Monoclonal 28-16-8S (Bionetics)**

13) Anticuerpos monoclonales anti-células T humanas:

- Ac. Monoclonal OKT3 (Ortho)
- Ac. Monoclonal BMA 010 (Behring)
- Ac. Monoclonal BMA 0110 (Behring)
- Ac. Monoclonal BMA 110 (Behring)

14) Cl_2 (Cordis)

15) Tris base (Merck)

16) Cloruro de Magnesio (Merck)

17) Agar Noble (Difco)

18) Tween 20 (Merck)

19) Nafto AS-BI fosfato - sal disódica - (Sigma)

20) Sal diazo-4-amino-2'-5'-dietoxilbenzanilina de cloruro zincico (Sigma)

21) L(-) ácido tartárico (Sigma)

22) AS-MX fosfato (Sigma)

23) Alfa-naftilacetato (Sigma)

24) Naftol AS-D acetato (Sigma)

25) Acetona (Merck)

26) NaftolAS-cloroacetato (Sigma)

27) Formaldehido (35%) (Merck)

28) 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma)

29) Dimetilsulfóxido (Merck)

30) Negro Sudán B (Sigma)

31) Fosfato monosódico (B.D.H.)

32) Fosfato disódico (B.D.H.)

33) Cloruro potásico (Merck)

34) Cloruro sódico (Merck)

35) DMEM polvo (Flow)

36) MEM-HANKS polvo (Flow)

37) Cloruro cálcico (Merck)

38) Eosina polvo (Merck)
39) Acido bórico (Merck)
40) Borato sódico (Merck)
41) Acetato de sodio (Merck)
42) Acido acético glacial (Merck)
43) P-nitrocatecol sulfato (Sigma)
44) Hidróxido sódico (Panreac)
45) Acido sulfúrico 18 M (Panreac)
46) Percoll, densidad 1.130 (Pharmacia Fine Chemicals)
47) Ficoll-Hypaque, densidad 1.077 (Pharmacia Fine Chemicals)
48) Medio de cultivo RPMI 1.640 (polvo) (Gibco)
49) Suero de ternera fetal (Gibco)
50) L-Glutamina (Gibco)
51) Albúmina sérica bovina (Sigma)
52) Lana de vidrio (Leucopak)
53) Cromo radioactivo (Cr^{51}) (Amersham)
54) Timidina tritiada (T^{H3}) (Amersham)
55) Reactivo de Bradford (Bio-Rad)
56) Acido isocítrico, sal trisódica dihidratada (Sigma)
57) Bromuro de dimetil-tiazolil-difeniltetrazolio (MTT) - (Sigma)
58) Beta-Nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD grado V) - (Sigma)
59) Beta-Nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato (NADP coenzima II) (Sigma)
60) Metosulfato de Fenacina (PMS) (Sigma)
61) L-ácido málico (Sigma)
62) Peroxidasa (Sigma)
63) L-leucil-L-alanina (Sigma)

64) Venom Snake (Sigma)

65) 3-aminoetilcarbazol (Sigma)

66) Glucosa-6-fosfato (G-6P) (Sigma)

67) D-Fructosa-6-fosfato (F-6P) (Sigma)

68) Acido cítrico (Sigma)

69) Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6PD) (Sigma)

70) Cloruro de Magnesio hexahidratado (Cl_2Mg) (Merck)

71) Acido etilendiamino tetraacetato disódico y dihidratado (Titriplex III) (Merck)

II.- METODOS

A.- INOCULACION TUMORAL ALOGENICA

De acuerdo con el propósito de la Tesis, se eligieron 15 ratones de la cepa BALB/c ($H\text{-}2^d$) como receptores, y células tumorales MCG3 clonadas (ver apartado de "Clonación de células tumorales") ($H\text{-}2^b$), obtenidas en C57BL10 mediante inoculación de Metilcolantreno (una sustancia de poder carcinogénico conocido), como elementos biológicos inductores del choque alogénico.

A cada ratón se le inyectaron intraperitonealmente $2x10^6$ células de MCG3. Uno de los ratones desarrolló ascitis celular y fue sacrificado en la 7ª semana (45 días después de la inoculación) mediante dislocación cervical. El fluido ascítico se extrajo en condiciones estériles por aspiración con pipetas Pasteur. Las células fueron resuspendidas en PBS conteniendo 10 u/ml de heparina sin preservativos (Sigma), lavadas tres veces en el mismo tipo de solución y su viabilidad determinada a través de la prueba de exclusión del azul tripán. Estas células ascíticas se denominaron C3Ra

B.- ESTUDIOS SEROLOGICOS

1.- Antisueros

Los diversos tipos de antisueros convencionales empleados en este estudio, sus características, especifici-

dad y posibles reacciones cruzadas, están reseñados en las Tablas IV, V y VI. Consultar también la Tabla VII.

En la obtención de antisueros poliespecíficos se emplearon para cada antisuero series de 5 ratones receptores y una mezcla de células esplénicas, de ganglios linfáticos (braquial, inguinal, mesentérico) y tímicas de un ratón donante. A cada ratón se le inyectaron $10x10^6$ linfocitos a intervalos semanales, durante 4 semanas. Siete días después de la 4ª inyección, los ratones fueron sangrados mediante punción en el seno retroorbital; el pool de suero se tituló mediante microcitotoxicidad y se congeló a -40ºC hasta su utilización.

Para el antisuero específico de tumor, se inyectaron 10 ratones BALB/c con $2x10^6$ células tumorales MCG3, y después de 20 días los regresores fueron sometidos al mismo protocolo de inoculación que el descrito anteriormente.

Los sueros monoespecíficos y anti-Ia se obtuvieron del National Institute of Health (NIH: USA, Bethesda, Md.).

2.- Absorciones

Con el fin de eliminar los anticuerpos contaminantes no específicamente antitumorales, el suero MCG3TSA fue absorbido con células tímicas y esplénicas de C57BL/10 a distintas concentraciones ($80x10^6$, $40x10^6$, $20x10^6$). Las células fueron lavadas tres veces en RPMI sin FCS y ajustadas

TABLA IV

ANTISUEROS POLIESPECIFICOS FRENTE A ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD H-2 DE CLASE I

Receptor	Donante	Ac frente a:	Reacciones cruzadas*
BALB/c	CBA	$H\text{-}2^k$	$H\text{-}2^b$
C57	B10BR	$H\text{-}2^k$	$H\text{-}2^d$
CBA	BALB/c	$H\text{-}2^d$	$H\text{-}2^b$
B10	B10D2	$H\text{-}2^d$	$H\text{-}2^k$
CBA	C57	$H\text{-}2^b$	$H\text{-}2^d$
(BALB/c CBA)	C57	$H\text{-}2^b$	-
(CBA C57)	BALB/c	$H\text{-}2^d$	-
(BALB/c C57)	CBA	$H\text{-}2^k$	-
BALB/c	MCG3 (absorbido)	MCG3 TSA	-

* Posibles reacciones cruzadas en haplotipos $H\text{-}2^b$, $H\text{-}2^d$ y $H\text{-}2^k$.

TABLA V

ANTICUERPOS MONOESPECIFICOS FRENTE A ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD H-2 DE CLASE I

Monoespecíficos	Especificidad Privada	Especificidad Pública*
D-2	D^b	
D-3		$H\text{-}2^d$, $H\text{-}2^k$
D-4	D^d	
D-5		$H\text{-}2^b$, $H\text{-}2^k$
D-13		$H\text{-}2^d$
D-29		$H\text{-}2^b$, $H\text{-}2^d$
D-31	K^d	
D-33	K^b	
D-35		$H\text{-}2^b$, $H\text{-}2^d$
D-36		$H\text{-}2^b$, $H\text{-}2^d$

*Sólo se reseñan los haplotipos $H\text{-}2^b$, $H\text{-}2^d$ y $H\text{-}2^k$

TABLA VI

ANTISUEROS FRENTE A ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD H-2 DE CLASE II

Receptor ∝ Donante	Ac frente a	Especificidades Is	Reacciones cruzadas*
ATL ∝ ATH	I^s	4,5,9,12	I^b (9)
ATH ∝ ATL	I^k	1,2,3,7,15,19,22 .	I^b (3); I^d (7)
(ATH X B10D2) ∝ ATL ...	I^k	1,2,3	I^b (3)
(B10K X ATL) ∝ HTT	I^s	4,5,9,12,23,24 ..	I^b (9)
(ATL X B10) ∝ ATH	I^s	4,5,12,23,24 ...	-

*Posibles reacciones cruzadas en haplotipos $H\text{-}2^b$, $H\text{-}2^d$ y $H\text{-}2^k$.

TABLA VII

REGIONES H-2 ABREVIADAS DE LAS CEPAS MURINAS MAS COMUNES

		I				Designación Haplotipos
	K	A	J	E	D	H-2
C57BL/6, C57BL/10, C3H.SW	b	b	b	b	b	b
BALB/c, DBA/2, B10.D2, NZB	d	d	d	d	d	d
CBA, C3H, AKR, B10.BR	k	k	k	k	k	k
A, A/J, B10.A	k	k	k	k	d	a
AQR	q	k	k	k	d	y1
A.TH	s	s	s	s	d	t2
A.TL	s	s/k*	k	k	d	t1
B10.A (3R)	b	b	b	k	d	i3
B10.A (4R)	k	k	b	b	b	h4
B10.A (5R)	b	b	k	k	d	i5
B10.G	q	q	q	q	q	q
B10.HTT	s	s	s	k	d	t3
B10.M	f	f	f	f	f	f
B10.MBR	b	k	k	k	q	bq1
B10.S (24R)	s	s	s	s	d	t6
B10.T (6R)	q	q	q	q	d	y2
C3H.OH	d	d	d	d	k	o2
D2.GD	d	d	b	b	b	g2

* $A_\alpha - A_\beta - E_\beta = s - k - k$

a las concentraciones dichas anteriormente. Luego se incubaron 0,5 ml de la suspersión celular con 0,5 ml de MCG3TSA - durante 15 minutos a temperatura ambiente y otros 15 minutos en agua de hielo; finalmente se centrifugaron las preparaciones a 500xg durante 5 min. y los sobrenadantes se congelaron a -40ºC hasta su utilización posterior.

3.- Prueba de citotoxicidad (inhibición de la captación - de timidina marcada con tritio)

La presencia o ausencia de los diversos antígenos reconocidos por los antisueros reseñados en el apartado anterior, se valoró con un método de citotoxicidad cuantitativo en placas microtiter (Sterilin).

Las células en cultivo se lavaban 3 veces en HBSS y a continuación se incubaban 1 hora en RPMI 1.640 sin suero fetal, para eliminar cualquier sustancia absorbida del - medio de cultivo. Una vez lavadas, se ajustaban a una concentración de $1x10^6$/ml en RPMI 1.640 con un 10% de FCS.

Por triplicado, se añadían 50 µl de células a cada pocillo, más 5 µl de antisuero de una dilución optimizada, de acuerdo con el título alcanzado. La placa era incubada 30 min. a 4º C. Finalizada esta primera incubación, se - añadían en cada pocillo otros 50 µl de Complemento previamente titulado (dilución final 1/80) con incubación posterior de la placa 1 hora a 37º C. Finalizado este período, - la reacción citolítica se paraba con 100 µl/pocillo de RPMI frío, cargándose 1 µl/pocillo de Timidina H^3 (Amersham SA),

con incubación posterior de 18 horas a 37º C en un ambiente húmedo y a una atmósfera mezcla de aire y 5% de CO_2.

Finalmente, las células eran recogidas con aspiración y lavado de las mismas sobre filtros de fibra de vidrio, mediante un sistema automatizado (Titertek), cuyo nivel radioactivo era cuantificado en un contador de radiaciones β.

C.- ADAPTACION DE LAS CELULAS ASCITICAS A CULTIVOS IN VITRO Y ESTABLECIMIENTO COMO LINEAS CELULARES CONTINUAS

Una vez extraidas del fluido ascítico y lavadas según se indicó anteriormente, las células se resuspendieron en medio de cultivo completo a una concentración de $2x10^6$ células/ml, y en volúmenes de 10 ml, se implantaron en frascos de cultivo de 25 cm^2 e incubaron a 37º C en atmósfera húmeda con un 5% de CO_2. Los cultivos fueron examinados diariamente y alimentados mediante extracción de 3 ml de sobrenadante, con reposición de medio de cultivo fresco en la misma cantidad extraida. Cuando las células comenzaron a mostrar una tasa rápida de crecimiento, evidenciado por la acidificación del sobrenadante de cultivo, se añadieron diariamente durante 2-3 días 3 ml de medio de cultivo fresco, sin extracción previa de sobrenadante. Al final de este ciclo, se extrajo la mitad del volumen de cultivo (aproximadamente 10 ml), congelándose las células en nitrógeno líquido y el resto se dividió en dos porciones, llevándose cada una de ellas a un volumen de 10 ml, repitiendo la técnica de alimentación anterior hasta un total de 5 ciclos.

A partir de ese momento, las células crecieron en suspen - sión sin ninguna dificultad, considerándose como líneas celulares establecidas, siendo denominadas C3Rc.

D.- CLONACION DE LAS CELULAS TUMORALES

La clonación de las células se realizó mediante - la técnica de dilución limitante, con timocitos murinos como células de alimentación, de acuerdo con la técnica de - Henry y cols. (1980).

1.- Preparación de los timocitos

Ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 respectivamente, fueron sacrificados mediante narcosis con éter. Se - extrajeron los timos asépticamente, siendo depositados en - sendas placas de Petri con 10 ml de medio de cultivo completo. Una vez lavado el timo, se depositó sobre un tamiz en - una placa de Petri conteniendo 10 ml de medio de cultivo - completo, y con unas pinzas curvas se exprimió el timo contra el tamiz para extraer las células. El tamiz se lavó con 10 ml adicionales de medio de cultivo completo y finalmente toda la suspensión de la placa de Petri se pasó a un tubo - de 20 ml, con centrifugación posterior 10 min. a 200xg.

Después de lavadas nuevamente las células, se resuspendieron en 20 ml de medio de cultivo completo.

2.- Proceso de clonación

Se tomaron células MCG3 y C3Rc de cultivos en suspensión y se lavaron dos veces con centrifugación a temperatura ambiente en medio de cultivo completo (MCC). Mediante la prueba de exclusión del azul tripán, se eligieron cultivos con viabilidad superior al 95%, ajustándose las suspensiones a $1x10^5$ células viables/ml.

Posteriormente se hicieron dos diluciones seriadas de las células, a $1x10^4$ células/ml y $1x10^3$ células/ml en MCC. Finalmente, a sendos tubos de plástico (50 ml) se añadieron 0,45 ml de cada tipo de células tumorales, a $1x10^3$/ml y $70x10^6$ timocitos/tubo, con un volumen final total de 45 ml de MCC.

Del tubo con células MCG3 se repartieron volúmenes de 0,2 ml a cada uno de los 96 pocillos de una placa microtiter (placa A). Del tubo con células C3Rc se repartieron los mismos volúmenes a cada uno de los 96 pocillos de dos placas microtiter (placas B y C). Con ésto se consiguió una media de 1-2 células tumorales/pocillo y $\simeq 3x10^5$ timocitos/pocillo. Las placas se cultivaban a continuación en un incubador a 37º C con un 5% de CO_2. Este día se marcó como día 0 (cero).

El día 7, cada pocillo se alimentó con 50 µl de MCC y el día 14 se examinaron las placas en un microscopio invertido con contraste de fase, marcándose los pocillos con crecimiento clonal positivo y alimentando cada uno de -

ellos con 50 µl de MCC, previa extracción de la misma cantidad de sobrenadante.

Durante la 4ª semana, los pocillos positivos de cada placa A, B y C, con un solo clon en crecimiento, se transfirieron a tres placas respectivamente de cultivo de 24 pocillos (placas A1, B1 y C1), elevando a 0,5 ml el volumen total/pocillo con MCC. Cinco días después, otros 0,5 ml de MCC fueron añadidos a cada pocillo, y pasados otros cinco se extrajeron de cada pocillo 0,5 ml de sobrenadante, supliéndolos con la misma cantidad de MCC. La expansión final de los clonos se realizó en frascos de cultivo de 50 ml.

De los cultivos provenientes de cada una de las placas se eligió un clono: denominándose MCG3c al obtenido de uno de los cultivos en la placa A1; GRA1 al obtenido de uno de los cultivos de la placa B1 y GRC3 al obtenido de uno de los cultivos de la placa C1. Estos clonos fueron cultivados sin interrupción y mantenidos en fase exponencial de crecimiento para su caracterización inmunobiológica. El clono proveniente de MCG3 fue subclonado antes de su inoculación en BALB/c y caracterizado (Vid. Resultados).

E.- ANALISIS DE ISOENZIMAS MEDIANTE MIGRACION ELECTROFORETICA EN GEL DE ALMIDON

1.- Líneas celulares y cepas murinas control

Para estudiar su comportamiento isoenzimático, el crecimiento de las líneas tumorales A1, C3 y MCG3 fue desa-

rrollado de tres formas diferentes: en cultivo, en forma as-
cítica y como tumores sólidos, según técnicas descritas ante-
riormente.

C57BL/10 y BALB/c y el híbrido (C57BL/6 X BALB/c) F1 fueron las líneas murinas control de referencia.

2.- Preparación de los extractos celulares

Finalizado el período de cultivo o de crecimiento ascítico/sólido, se recogieron las células en tubos universales y se sometieron a tres lavados sucesivos en PBS, 10 - minutos a 300xg. A continuación, todos los sedimentos celulares pertenecientes al mismo tumor se mezclaron en un solo tubo y se centrifugaron una vez más en PBS, resuspendiendo el sedimento celular final en 0,5 ml de agua destilada, que fueron transvasados seguidamente a tubos tipo Beckman de - 1,5 ml.

Posteriormente, el proceso de homogeneizado y lisis celular se completó mediante tres ciclos de congelación y descongelación sucesivos en nitrógeno líquido, después de los cuales los restos celulares se sedimentaron por centrifugación a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4º C. Los sobrenadantes fueron alicuotados en envases tipo Beckman de 1,5 ml a razón de 50 µl/tubo y almacenados en nitrógeno líquido - hasta su posterior utilización para análisis electroforético. Todas las muestras fueron utilizadas a lo largo de un - período que en ningún caso sobrepasó los dos meses de congelación.

En el caso de los extractos celulares de las cepas murinas control, una vez sacrificados los ratones, se preparó el homogeneizado tisular correspondiente a cada cepa, mediante desmenuzamiento y licuefacción de varios órganos (bazo, hígado, riñón, músculo, cerebro, ganglios, timo, estómago, páncreas). Posteriormente fueron sometidos a las mismas condiciones de centrifugado y congelación-descongelación que las células cultivadas.

Con los tumores sólidos se practicó el mismo protocolo que con los extractos tisulares control.

3.- Cuantificación de proteínas en los extractos

Con el fin de lograr la misma concentración de contenido proteico por extracto, se determinó la concentración de proteína en ellos mediante la técnica de Bradford (1976).

Se preparó una solución de albúmina sérica bovina (ASB) en PBS a una concentración de 3 mg/ml. De esa solución madre se añadieron, por duplicado, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 50 µl y 60 µl a una serie de tubos de vidrio químicamente limpios. En esta serie de tubos, y también por duplicado, se añadieron 10 µl, 40 µl y 60 µl de cada extracto. A continuación, se añadieron 5 ml de reactivo de Bradford (Bio-Rad) diluido 1/4 en agua desionizada y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Simultáneamente se montó un blanco, por duplicado

con 50 µl de PBS. Todas las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una D.O. de 595 nm.

Con las distintas diluciones de ASB se construyó una curva estándar, fijando los puntos de dicha curva entre las concentraciones absolutas de cada dilución en el eje de abscisas, frente a su correspondiente absorbancia en el eje de ordenadas. La concentración absoluta de proteinas en la muestra problema, se calculó trazando una perpendicular desde su punto de absorbancia hasta la curva estándar y de ahí otra perpendicular hasta el eje de abscisas.

4.- Electroforesis

Se determinaron los fenotipos isoenzimáticos de cuatro enzimas polimórficos: Enzima málico (EM) o Malatodeshidrogenasa, Isocitratodeshidrogenasa (IDH), Dipeptidasa (DIP) y Glucosa-fosfato-isomerasa (GPI); mediante electroforesis horizontal en bloques de gel de almidón, conforme a las técnicas descritas por Nichols y Ruddle (1973) y Harris y Hopkinson (1976), con diversas modificaciones.

4.1.- Protocolo general del estudio electroforético para isoenzimas.

4.1.1.- Montaje de la placa soporte

Sobre una placa de cristal de 26 x 15 cm se rotuló un rectángulo de 12 x 23 cm que sirviera de guía para disponer sobre las líneas rotuladas 4 varillas de forma

prismática rectangular, con 1 cm^2 de sección.

4.1.2.- Preparación del gel de almidón.

Una vez pesados 25 gr. de almidón, se disolvieron en 300 ml de tampón del gel correspondiente, en un matraz - Erlenmeyer de 500 ml con agitación constante. Al comenzar - la ebullición del gel, se procedió a desgasificarlo con la_ ayuda de una bomba de vacío. Una vez enfriado hasta aproximadamente 45-50º C, el gel era vertido sobre la placa, de_ jándolo enfriar a temperatura ambiente. Cuando el gel alcanzaba esta temperatura, se introducía en una cámara fría durante 1/2 hora, con el fin de equilibrarlo a 2-6º C.

4.1.3.- Disposición de las muestras y migración eléctrica

Con un bisturí se practicaron sendas incisiones - en el gel, en sentido perpendicular al eje longitudinal del soporte, separadas unas de otras aproximadamente 1,5 cm y - entre 4 y 10 cm del cátodo, dependiendo de la isoenzima a - migrar.

Seguidamente, se empapaban unas tiras de papel - Whatman duro con las muestras problemas, metiéndose a continuación en las incisiones del gel. Finalmente, se cerraba - el circuito eléctrico uniendo los bordes del bloque de gel_ con los tampones de los electrodos, mediante papel de filtro.

4.1.4.- Revelado de las isoenzimas

Al terminar el tiempo de migración, el gel era seccionado horizontalmente, de forma que se obtuvieran dos bloques nuevos. Uno de ellos era montado nuevamente como en el apartdo 4.1.1, y sobre él se vertía la solución-gel revelada a 45º C. Seguidamente, la placa se introducía en estufa a 37º C, y a los 25-30 min aparecían las isoenzimas reveladas en el gel.

4.2.- Condiciones específicas de migración de isoenzimas

4.2.1.- Electroforesis en gel de almidón para isoenzimas de dipeptidasa I (DIP-I) (3.4.11)

a) Soluciones

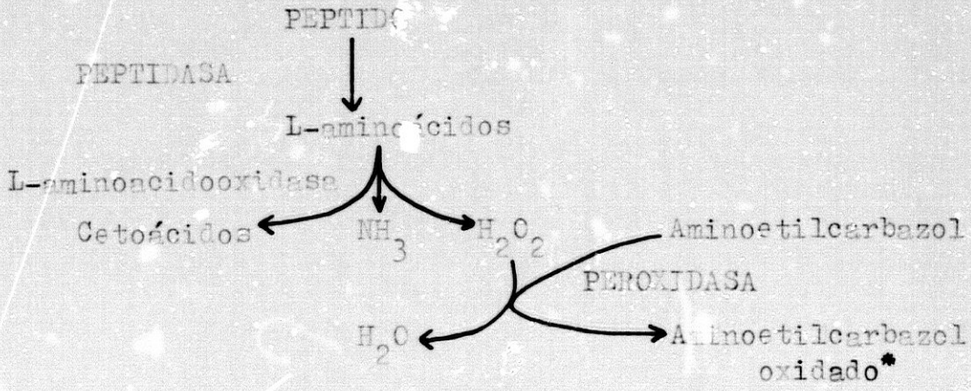
- Solución stock:
  .250 ml de Tris 0,1 M
  .250 ml de PO_4H_2Na 0,1 M
  Al volumen total (500 ml) ajustado a pH 7,6, se añaden 35 ml de PO_4H_2Na 0,1 M, quedando la solución equilibrada a un pH definitivo de 7,4.
- Solución del gel de almidón:
  .Solución stock diluida a 1/20 en agua bidestilada.
- Tampón de los electrodos:
  .Solución stock sin diluir.
- Solución reveladora:
  .Agar Noble, 1%

.Solución stock, 60 ml
.Peroxidasa (100 µg/ml en solución stock), 200µl
.3-amino-9-etil-carbazol (25 mg/ml en acetona),- 4 ml.
.Cloruro de Manganeso 0,1 M, 1 ml.
.Péptido L-Leucil-L-Alanina, 50 mg.
.Veneno de cobra, 10 mg.

b) Migración eléctrica

- 200 voltios durante 20-[illegible] horas a 4º C. Las - muestras se disponen a 4 cm del cátodo.

c) Representación gráfica del sistema de revelado



4.2.2.- Electroforesis en gel de almidón para isoenzimas de malatodeshidrogenasa o Enzima málico (EM) - (1.1.1.40)

a) Soluciones

- Solución stock:

.Tris 0,9 M/EDTANa_2 0,02 M/Ac. bórico 0,5 M pH - 8,6.

A 450 ml de agua bidestilada se añaden 54,5 gr. de Tris (0,9 M), 3,72 gr de EDTA disódico (0,02 M) y 15.45 gr de ác. bórico (0,5 M). El pH se - ajusta a 8,6, completándose hasta 500 ml con - agua bidestilada.

- Tampón del gel de almidón:

.Solución stock diluida 1/20 en agua bidestilada más 5 mg de NADP.

- Tampones de los electrodos:

.Cátodo: Solución stock diluida 1/5 más 5 µg de NADP

.Anodo: Solución stock diluida 1/7

- Solución reveladora:

.Agar Noble 1%

.Tris 0,5 M pH 8, 70 ml

.L-ácido málico, 150 mg

.Cl_2Mg 0,2 M, 5 ml

.NADP (5 mg/ml), 1 ml

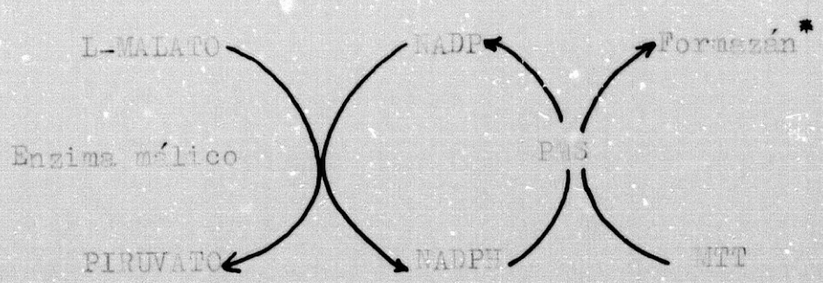
.MTT (5 mg/ml), 1 ml

.PMS (5 mg/ml), 1 ml

b) Migración eléctrica

- 200 voltios durante 48 horas a 4º C. Las muestras se disponen a 7 cm del cátodo.

c) Representación gráfica del sistema de revelado



4.2.3.- Electroforesis en gel de almidón para isoenzimas de Isocitrato Deshidrogenasa (IDH) (1.1.1.42)

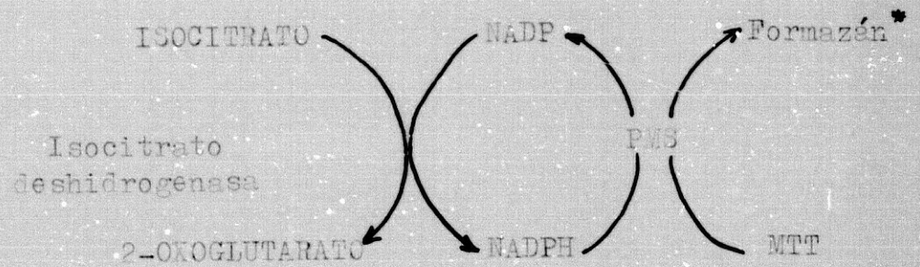
a) Soluciones

- Solución stock:
  .Tris 0,22 M/Ac. cítrico monohidratado 0,086 M - pH 6,2
  .Volumen total 500 ml con agua bidestilada
- Solución del gel de almidón:
  .17,5 ml del tampón stock disueltos en 482,5 ml de agua bidestilada.
- Tampón de los electrodos:
  .Solución stock sin diluir.
- Solución reveladora:
  .Ac. isocítrico (sal Na_3 dihidratada), 20 mg
  .Tris 0,5 M pH 8, 10 ml
  .Cloruro de Magnesio 0,2 M, 15 ml
  .NADP (5 mg/ml), 1 ml
  .MTT (5 mg/ml), 1 ml
  .PMS (5 mg/ml), 1 ml
  .Agar Noble, 1%

b) Migración eléctrica

- 75 voltios durante 24 horas a 4º C. Las muestras se disponen a 4 cm del cátodo.

c) Representación gráfica del sistema de revelado



4.2.4.- Electroforesis en gel de almidón para isoenzimas de Glucosa fosfato isomerasa (GPI) (5.3.1.9)

a) Soluciones

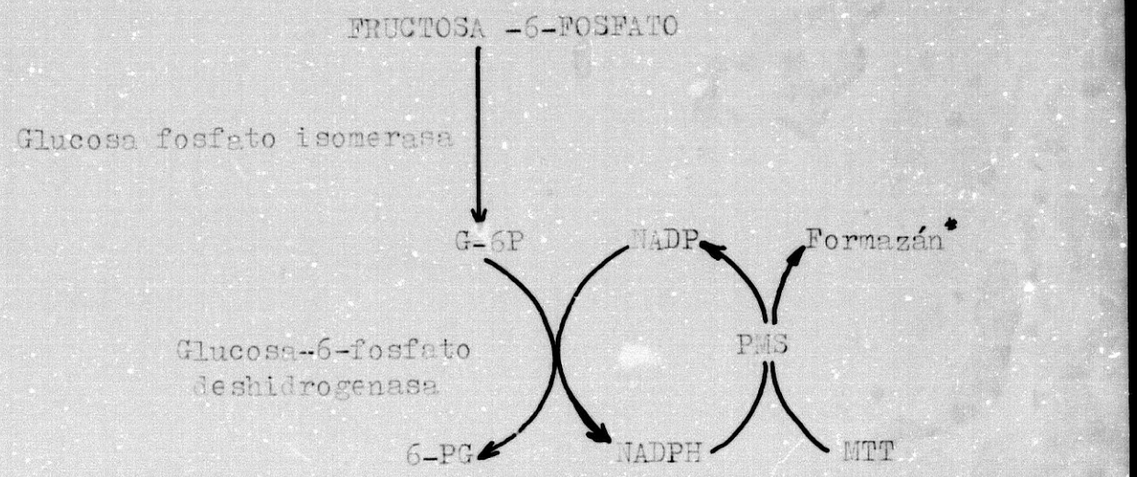
- Solución stock:
  .Tris 0,1 M/Ac. cítrico monohidratado 0,031 M - pH 7.
  .Volumen total 500 ml con agua bidestilada.
- Solución del gel de almidón:
  .Solución stock diluida 1/10 en agua bidestilada
- Tampón de los electrodos:
  .Solución stock sin diluir
- Solución reveladora:
  .Tris 0,06 M, 12,5 ml
  .Agua bidestilada, 12,5 ml
  .NADP (5 mg/ml), 1 ml

.G-6PD (140 u/ml), 10 µl
.F-6P (sal básica), 20 mg
.PMS (5 mg/ml), 0,5 ml
.Agar Noble al 2%, 25 ml

b) Migración eléctrica

- 150 voltios durante 24 horas a 4º C. Las muestras se disponen equidistantes de ánodo y cátodo.

c) Representación gráfica del sistema de revelado



F.- DETERMINACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA EN LAS CELULAS MCG3, GRA1 Y GRC3

1.- Receptores para la porción Fc de la Inmunoglobulina G (Rosetas Fcγ)

Empleamos para ello la técnica de Parish y Hayward (1974) modificada por Kwan y Mishell (1980).

Se lavaron tres veces hematíes de carnero en solución salina balanceada de Hanks (HBSS), siendo eventualmente resuspendidos en la misma solución a una concentración del 10% en un volumen total de 5 ml (células E). A continuación se mezclaron los 5 ml de células E con un volumen igual de anticuerpo purificado IgG (7S) (Nordick Immunology) anti estroma de hematíes ovinos, a una concentración de 0,35 mg/ml, previamente estandarizada como la máxima concentración subaglutinante. La mezcla se incubó 30 minutos a 37º C con agitación periódica. Una vez sensibilizados los hematíes (células EAG), se lavaron tres veces en HBSS y el sedimento de hematíes fue resuspendido a una concentración del 5%.

Finalmente, se mezclaron en sendos tubos de plástico 2,5 ml de hematíes EAG y muestras dobles del mismo volumen de células MCG3, GRA1 y GRC3 respectivamente, a una concentración de $1x10^7$/ml. Los tubos, una vez tapados, se dispusieron en un rotador vertical a 30 rpm durante 3 minutos e incubados nuevamente; la mitad de ellos 30 minutos a 4º C y la otra mitad 1,5 horas a 37º C para detectar una posible actividad fagocítica a través del receptor Fc.

Finalizadas las incubaciones, una vez resuspendido el sedimento, se contó en un hemocitómetro, con microscopio de contraste de fase a 40X, el porcentaje de rosetas positivas, así como el de células con hematíes en su citoplasma, sobre un total de 300 elementos celulares tumorales en

cada caso.

Como control positivo se utilizaron PMN humanos - aislados, según técnica descrita más adelante. Como control de fijación inespecífica se probaron células tumorales con hematíes no sensibilizados.

2.- Receptores para la fracción C3b del Complemento (Rosetas EACb)

De acuerdo con la técnica de Kwan y Mishell, se - mezclaron 5 ml de hematíes de carnero a una concentración - del 10% en HBSS, con volumen igual de anticuerpo purificado IgM (19S) (Cordis Laboratories) antiestroma de hematíes ovinos, a una dilución subaglutinante 1/300 previamente optimizada. La mezcla se incubó 30 min. a 37º C con agitación periódica.

Una vez sensibilizados los hematíes (células EA), se lavaron tres veces con HBSS y se resuspendieron al 10% - en tampón veronal gelatina (TVG) y se mezclaron 5 ml de hematíes con 5 ml de suero murino (fuente de Complemento), diluido 1/5 en el mismo tampón. La preparación se incubó 30 - minutos a 37º C, siendo posteriormente lavada dos veces en HBSS y el sedimento de hematíes (células EACb) resuspendido al 5%.

El paso final consistió en la mezcla, en sendos - tubos de plástico, de 1 ml de células EAC con el mismo volumen de células MCG3, GRA1 y GRC3 respectivamente, a una con

centración de $2x10^7$. Finalmente, se añadieron 3 ml de TVG a cada tubo, para lograr un volumen final de 5 ml. Los tubos tapados, se montaron en un rotador vertical a 30 rpm, durante 15 min. a 37º C. Luego se metieron en agua de hielo y se determinó el % de rosetas en un hemocitómetro sobre un total de 300 células tumorales en cada caso.

Como control positivo se utilizaron PMN humanos, probados en las mismas condiciones y a la misma concentración que las células tumorales. Como control inespecífico se probaron hematíes sensibilizados con IgM incubados con células tumorales.

3.- Receptores para la fracción C3d del Complemento (Rosetas EACd)

La preparación de las células EA se hizo del mismo modo que en el apartado anterior. Para la consecución de células EA sensibilizadas con el factor C3d, se procedió conforme a la técnica de Ross y Winchester (1980). A un volumen de 5 ml de células EA al 1% en TVG, se añade otro volumen igual de suero murino deficiente en el factor C1 del Complemento, diluido 1/2,5 en el mismo tampón.

Se incuba la mezcla 30 min. a 37º C, obteniéndose los hematíes sensibilizados con Complemento (Células EACd), que acto seguido son lavadas dos veces en TVG y resuspendidas en 5 ml de ese mismo tampón, a los que se añaden 50 µl de tripsina bovina recién preparada, a una concentración final de 1 µg/ml y se reincuba otros 30 min. a 37º C. Este pa

so último elimina los posibles restos de factores C3b y C4b unidos a los hematíes. Después de dos lavados adicionales en VVG, los hematíes se resuspenden al 1% en tampón PBS-BSA 2%.

Una vez preparadas así las células, se mezclaron 0,1 ml de hematíes EACd con el mismo volumen de células tumorales MCG3, GRA1 y GRC3 respectivamente, a una concentración de $4x10^6$/ml. Una vez tapados los tubos, se dispusieron en un rotador vertical a 30 rpm durante 20 min. a 37º C. El porcentaje de rosetas positivas se determinó en un hemocitómetro, sobre un total de 300 células tumorales en cada caso.

Como control positivo se utilizaron linfocitos B humanos purificados a partir de sangre periférica desfibrinada mediante adherencia a columnas de lana de nylon.

4.- Receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina M (Rosetas Fcμ)

En este caso, como sistema marcador empleamos eritrocitos de buey, dado su alto contenido de ácido neuramínico en su membrana y por tanto, su menor tendencia a la aglutinación en presencia de antisuero específico. El método explicitado en este caso es el seguido por Fauci y cols. (1978).

Los hematíes bovinos se lavaron tres veces en VBSS y luego se mezclaron 20 µl del sedimento empacado en hematíes con 1 ml de anticuerpo purificado IgM (19S)

(Cappel Lab.) anti-estroma de hematíes bovinos, a una dilución subaglutinante 1/100 previamente optimizada. La mezcla, después de incubarse 30 min. a 37º C, se lavó dos veces en HBSS y el sedimento de hematíes se resuspendió al 1% en el mismo tampón (células EAM). Para identificar las células tumorales MCG3, GRA1 y GRC3 con receptores de membrana para - IgM, se mezclaron 0,2 ml de la suspensión de EAM al 1% con 0,2 ml de células de cada uno de los clones, a una concentración de $5x10^6$/ml. Los tubos se centrifugaron a 1.000 rpm durante 3 min. e incubados a 4º C otros 60 min. más. Después de resuspender las células, se contó el % de rosetas - positivas en un hemocitómetro sobre un total de 300 células.

Con el fin de controlar la fiabilidad de la prueba, se montó en paralelo un control positivo con linfocitos T aislados mediante roseteo con hematíes de carnero-AET y - centrifugación diferencial posterior (ver anteriormente), - siendo incubados durante 16 horas a 37º C en RPMI más 30% - de FCS a una concentración de 10^6 células /ml. Al día siguiente, se centrifugaron dos veces en RPMI sin FCS, ajustándose finalmente a $3x10^6$ células /ml. De esa suspensión - se mezclaron 100 µl con otros tantos de eritrocitos bovinos sensibilizados con IgM anti-hematíes de buey (Cappel); se - centrifugaron a 1.000 rpm durante 3 min. e incubaron a 4º C durante 60 min.

La formación de rosetas inespecíficas se controló por medio de hematíes bovinos no sensibilizados con IgM, incubados con las correspondientes células tumorales o linfocíticas.

5.- Determinación del isotipo específico de IgG, reconocido por el receptor Fcγ sobre las células GRA1 y GRC3$^-$ (Rosetas linfocito-célula tumoral)

5.1.- Aislamiento de linfocitos T mediante rosetas con hematíes de carnero tratados con AET.

Hemos seguido la técnica de Fauchet y cols. del año 1980.

Se prepara una solución 0,28 M de Aminoetilisotiouronio (AET) (0,5 gr en 12,5 ml de agua bidestilada estéril), y se ajusta a pH 9 con NaOH 5 N. A continuación se lavan 2,5 ml de hematíes de carnero tres veces en Solución salina 8,75% y el sedimento se resuspende en los 12,5 ml de la solución AET, incubándose 15 min. a 37º C, agitando el tubo cada 5 min. Después de incubados, los hematíes se lavan 6 veces en PBS y se ajustan a una concentración del 1% en HBSS.

A continuación se mezclan 5 ml de hematíes de carnero con 5 ml de células mononucleares de sangre periférica, aisladas en gradiente de Ficoll-Paque y ajustadas a una concentración de $4x10^6$ células/ml. Se incuban 5 min. a 37º C, se centrifugan a 1.000 rpm durante 3 min. y se incuban 1,5 horas a 4º C.

Posteriormente, se resuspenden las células con cuidado y se depositan sobre un gradiente de Ficoll-Paque, centrifugándose nuevamente a 2.500 rpm durante 25 min., con

lo cual los linfocitos T que hayan formado rosetas bajarán al fondo del tubo, quedando el resto en la interfase. Una vez recogido el sedimento celular, se lisan los hematíes de carnero con un choque hipotónico en agua destilada, centrifugándose las células una vez más 10 min. a 1.500 rpm. El sedimento lo constituyen linfocitos T purificados, en una proporción mayor del 95%. Las células se ajustaron a una concentración de $20x10^6$/ml en HBSS.

5.2.- Optimización de la densidad de Ac sobre la membrana de los linfocitos T.

Para establecer el isotipo específico de IgG que era reconocido por el receptor Fcγ de los clones GRA1 y GRC3, estandarizamos en nuestro laboratorio una técnica consistente en la utilzación de Ac monoclonales murinos de isotipo definido, que reconocen epitopos comunes a la mayoría de los linfocitos T periféricos humanos. Para ello empleamos cuatro tipos diferentes de Ac monoclonales:

- OKT3 (Ortho Diagnostic Sistems), que reconoce un determinante presente en más del 95% de los linfocitos T periféricos. Su isotipo es IgG_{2a}.
- BMA 010 (Behring M.A.). Reconoce un epitopo presente en el 95-100% de los linfocitos T periféricos. Su isotipo es IgG_1.
- BMA 0110 (Behring M.A.). Reconoce un epitopo en el receptor para hematíes de carnero, presente en el 95-100% de los linfocitos T periféricos. Su isotipo es IgG_{2b}.
- BMA 110 (Behring M.A.). Reconoce un antígeno -

presente en todas las células humanas, y por - tanto también en todos los linfocitos T. Su isotipo es IgG_3.

Para obtener una sensibilidad adecuada en este tipo de rosetas, es necesario lograr la máxima densidad posible de anticuerpo sobre la membrana de la célula diana (en_ este caso linfocito T). En el caso de los anticuerpos monoclonales, al carecer prácticamente de poder aglutinante, se pueden saturar todos los determinantes antigénicos presen - tes sobre la célula diana, sin que se presente el fenómeno_ de aglutinación ya mencionado.

Con el fin de saber cuál era la concentración de_ Ac monoclonal con la que se lograba dicha saturación de los determinantes antigénicos sobre la membrana del linfocito T, incubamos 100 µl de linfocitos T a una concentración de 20×10^6/ml con 100 µl de distintas concentraciones de cada uno_ de los Ac monoclonales mencionados, según se muestra en la_ Figura 23, durante 5 min. a 37º C. Las células se lavaban - después tres veces con HBSS a 4º C y a cada sedimento se - añadían 100 µl de una solución de fragmentos $F(ab')_2$ anti-_ Ig murina marcados con I^{125} (Amersham). Una vez agitadas - las células, se incubaban 30 min. a 4º C. Después de aspi - rar completamente el último sobrenadante, el nivel de ra - dioactividad de los sedimentos se detectaba en un contador - gamma LKB.

Como control de fijación inespecífica se utilizaron linfocitos no sensibilizados con Ac monoclonal. La fija_

ción inespecífica fue restada de la radiactividad específica.

5.3.- Técnica de las rosetas linfocitos-célula tumoral

Conforme a los resultados de la Fig. 23, todos los Ac monoclonales fueron utilizados a una concentración final de 10 µg/ml.

En tubos de plástico (3 ml) se mezclaron 100 µl de linfocitos T a una concentración de $20x10^6$/ml, con 100 µl de cada una de las soluciones de Ac monoclonales a la concentración indicada y se incubaron 5 min. a 37º C. Lavadas las células tres veces en HBSS, se resuspendían en 100 µl del medio RPMI 1640 más 10% de FCS, a los que se añadieron 100 µl de células tumorales GRA1 o GRC3 a diversas concentraciones ($1x10^6$/ml, $2,5x10^6$/ml y $5x10^6$/ml) en el mismo medio, centrifugándose 5 min. a 600 rpm e incubándose posteriormente 60 min. a 4º C.

El porcentaje de rosetas positivas se determinó por medio de un hemocitómetro sobre un total de 300 células. Simultáneamente se incluyeron controles sin la adición de Ac Mo para controlar el grado de formación de rosetas espontáneas linfocito-célula tumoral.

C.- ROSETAS ESPONTANEAS TUMOR-TUMOR

Teniendo en cuenta que GRA1 y GRC3 eran células tumorales inducidas mediante inoculación tumoral alogénica

FIGURA 23: Estanderización de la concentración saturante de distintos anticuerpos monoclonales para - diferentes antígenos de linfocitos T humanos, medida por radiounión.

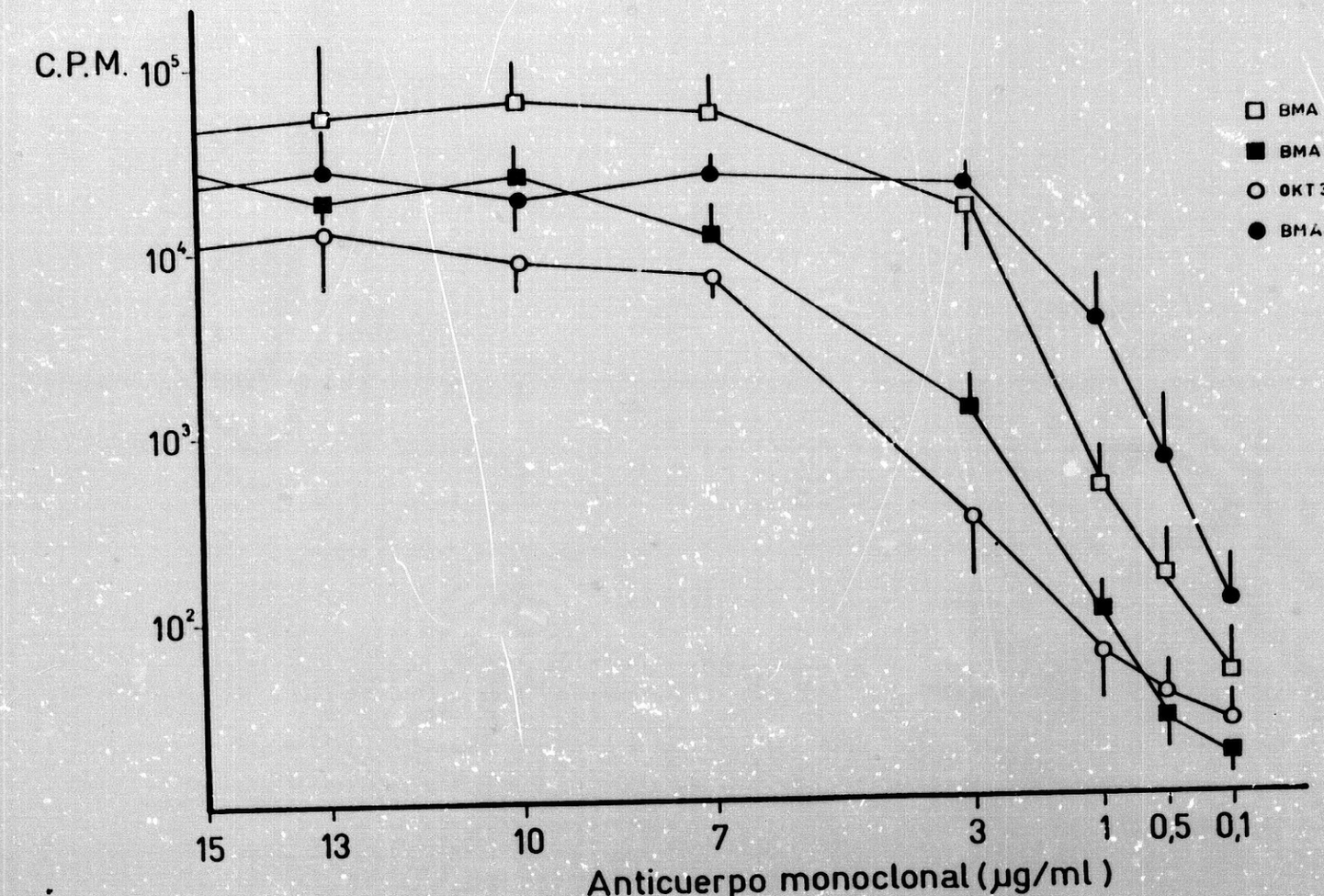

C.P.M.
10^5
10^4
10^3
10^2
BMA 0110
BMA 110
OKT 3
BMA 010
15
13
10
7
3
1
0,5
0,1
Anticuerpo monoclonal (µg/ml)

FIGURA 23

de células MCG3 en ratones BALB/c, era posible pensar que - pudiera existir algún tipo de reconocimiento específico entre ellas.

Para confirmar o descartar este supuesto, se incubaron 100 µl de células MCG3c a una concentración de $20x10^6$ por ml en RPMI 1640 más 10% de FCS, con 100 µl de células - GRA1 o GRC3 a una concentración de $1x10^6$/ml en el mismo medio, bien durante 30 min. a 37º C o bien 2 horas a 4º C. El número de rosetas formadas se controló de igual forma que - en el apartado anterior.

H.- DETECCION DE INMUNOGLOBULINAS DE MEMBRANA

Se utilizaron dos técnicas: la primera utilizando un anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con fluoresceina, y la segunda con anticuerpos anti-Ig de ratón fijados a bolitas de poliestireno.

1.- Determinación de Ig de membrana mediante anti-Ig fluoresceinada.

Empleamos la técnica descrita por Teofilopoulos y cols. (1974). A 50 µl de una suspensión de células MCG3c, - GRA1 y GRC3, con una concentración de $10x10^6$/ml, se añadieron 50 µl de anti-Ig murina marcada con fluoresceina a la - dilución de 1/5. Se incubaron 30 min. a 4º C en cámara oscura y acto seguido se lavaron dos veces en PBS más azida sódica 0,01 M, resuspendiéndose el sedimento en 100 µl de PBS.

El tanto por ciento de células con fluoresceina - en la membrana se visualizó en un microscopio de fluorescencia Reichert (Austria).

2.- Determinación de Ig de membrana mediante Ig fijada a bolitas de poliestireno

Las esferas de poliestireno con la anti-Ig se adquirieron comercialmente (Bio-Rad) y se siguieron las directrices del fabricante para su utilización.

Se mezclaron 50 µl de bolitas sin diluir con 100 µl de una suspensión de células tumorales (GRA1, GRC3 o - MCG3c), ajustadas a $2,5x10^6$/ml, centrifugándose la mezcla 5 min. a 1.000 rpm. Luego se incubaron los tubos 30 min. a - 4º C y se completó hasta un volumen de 750 µl con PBS frío, siendo resuspendidas las células mediante pipeteo.

Finalmente se contaron las células con bolitas sobre la membrana en un microscopio de contraste de fase - (Zeiss, Alemania).

I.- DETECCION DE INMUNOGLOBULINA INTRACITOPLASMATICA

Utilizamos una técnica de tinción indirecta con - antisuero marcado con peroxidasa.

Se vertía una gota de la suspensión celular correspondiente (MCG3c, GRA1 y GRC3) sobre un porta de vidrio, dejándose secar al aire. A continuación se fijaba la prepara-

ción durante 15 min. con metanol frío más H_2O_2 al 0,1%, para inhibir la peroxidasa endógena. Después de lavada con agua destilada, se incubaba con suero normal de conejo para bloquear los receptores Fc, durante 30 min. Una vez eliminado el suero de conejo del porta, se añadía un antisuero de cabra anti-Ig de ratón diluido 1/10 y se incubaba 90 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda. Finalizado este tiempo, se lavaba el porta dos veces con PBS, añadiéndose luego un segundo antisuero de conejo anti-Ig de cabra marcado con peroxidasa, diluido 1/50 y se incubaba 30 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda. La preparación era lavada de nuevo dos veces con PBS.

El revelado se lograba añadiendo al porta Diaminobencidina filtrada al 0,05% en agua destilada, más H_2O_2 al 0,1% durante 10 min., con lavado posterior en agua destilada y contrastando con Giemsa durante 1/2-1 min.

Finalmente los portas se montaban con DPX bajo un cubre y se leían en un microscopio de luz Zeiss, viendo el número de células con el citoplasma teñido sobre un total de 300. Simultáneamente se montaban portas sin el primer antisuero, como controles negativos.

J.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CELULAR CITOTOXICA Ac-DEPENDIENTE (CCAD) EN CELULAS MCG3c, GRA1 Y GRC3

Basándonos en la técnica de F. Gutiérrez y cols., utilizamos como células diana hematíes de pollo marcados con Cr^{51}.

Los eritrocitos de pollo se obtuvieron por punción venosa, siendo posteriormente lavados tres veces con PBS. Para el marcaje se incubaron $20x10^6$ de eritrocitos contenidos en 0,1 ml de RPMI 1640 más 10% de FCS con 100 µCi de cromato sódico (Amersham), durante una hora a 37º C. Luego se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en el mismo medio, a una concentración de $1x10^5$ eritrocitos/ml.

En tubos de plástico con fondo en U de 12x75 mm, se incubaron 1 ml de células diana con 1 ml de suero de conejo anti-hematíes de pollo (RACA), a una dilución final de 1/1000, que resultó ser la óptima según experimentos de titulación que se muestran en Resultados (Vid. Fig. 24), durante 30 min. a 37º C. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces en PBS y posteriormente se agregó a los correspondientes sedimentos 1 ml de RPMI más 10% de FCS conteniendo $2,5x10^6$ células tumorales/ml, $5x10^6$ células tumorales/ml y $10x10^6$ células tumorales/ml respectivamente (MCG3, GRA1 y GRC3), para obtener proporciones diana/efectoras de 1/25, 1/50, 1/75 y 1/100.

Los tubos eran incubados a 37º C en un incubador con atmósfera húmeda y 5% de CO_2 durante 6 horas. Cada proporción diana/efectora se probó por triplicado. Una vez terminada la incubación, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos y se separaron los sobrenadantes, midiéndose su radiactividad en un contador LKB autogamma.

El control de liberación máxima del isótopo se obtuvo lisando $1x10^5$ eritrocitos marcados, con 1 ml de agua -

FIGURA 24: Estandarización de la concentración óptima de RACA en ADCC frente a hematíes de pollo. (Proporción diana/efectora : 1/100).

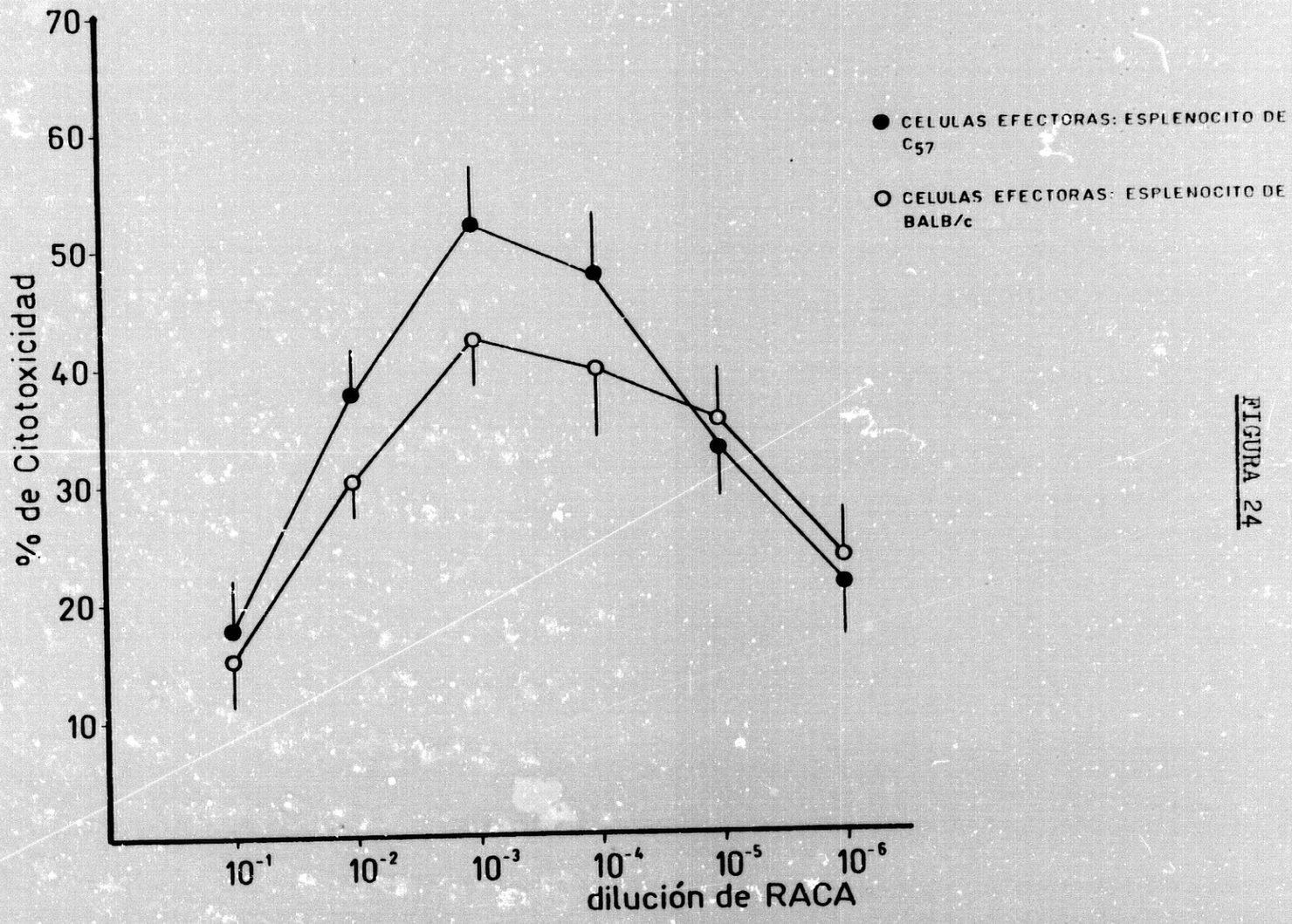

70
60
50
40
30
20
10
% de Citotoxicidad
10⁻¹
10⁻²
10⁻³
10⁻⁴
10⁻⁵
10⁻⁶
dilución de RACA
● CELULAS EFECTORAS: ESPLENOCITO DE C57
○ CELULAS EFECTORAS: ESPLENOCITO DE BALB/c

FIGURA 24

destilada. La liberación espontánea e inespecífica se monitorizaron con 4 tipos de controles, cada uno de ellos por triplicado: 1) $1x10^5$ hematíes marcados en 1 ml de medio de cultivo; 2) $1x10^5$ hematíes marcados más 1 ml de RACA en medio de cultivo a una dilución final de 1/1000; 3) $1x10^5$ hematíes marcados más 1 ml de las distintas células efectoras de cada una de las concentraciones ya indicadas; 4) $1x10^5$ hematíes marcados e incubados previamente con suero de conejo no inmune, diluido a 1/1000 (dilución final) más 1 ml de las distintas células efectoras de cada una de las concentraciones dichas.

El % de citotoxicidad específica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$CCAD = \frac{\text{Liber. experimental - Liber. espontánea}}{\text{Liber. máxima - Liber. espontánea}} \times 100$$

Como control positivo, y en paralelo, se probó la actividad "killer" en células esplénicas de ratones BALB/c.

K.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD "NATURAL KILLER" DE CELULAS MCG3c, GRA1 y GRC3.

Como células diana utilizamos tres líneas tumorales sensibles a actividad NK: P815-X2 (mastocitoma murino obtenido en la cepa DBA/2); YAC-1 (linfoma proveniente de la cepa Ajax); L5178Y/ES (linfoma originado en la cepa DBA/2). El método seguido fue el de Huttunen e Ilonen (1983)

modificado.

Las distintas células diana se ajustaron a una concentración de $2,5x10^6$/ml en RPMI 1640 más 10% de FCS, y se marcó 1 ml de cada una con 150 µCi de Cromato sódico (Amersham) en un baño a 37º C durante 1 hora, con agitación cada 10 min. Después del marcaje, las células se lavaron tres veces con HBSS y se ajustaron a $1x10^5$ células/ml de medio RPMI más 10% de FCS. La prueba de citotoxicidad se realizó en una microplaca de cultivo tisular con 96 pocillos (Nunc clon, Dinamarca), utilizando $1x10^4$ células diana por pocillo y diferentes concentraciones de células efectoras (MCG3, GRA1 y GRC3), para obtener proporciones diana/efector de 1/100, 1/50 y 1/25. Cada proporción diana/efectora se probó por triplicado.

Después de sendos períodos de incubación de 6 y 18 horas para cada tipo de células, se extrajeron de cada pocillo 150 µl de sobrenadante y se midió su radiactividad en un contador LKB autogamma. La liberación espontánea se determinó en 150 µl de sobrenadante de células diana incubadas sólo con medio, y la liberación máxima se midió lisando $1x10^4$ células marcadas con 250 µl de Nonidet P^{40} y tomando 150 µl del lisado.

El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó como en el caso de la CCAD. Como control positivo y en paralelo, se probó la actividad NK en células esplénicas de ratones BALB/c.

L.- ACTIVIDAD "NATURAL KILLER" Y ADCC EN CELULAS GRA1 Y GRC3 FRENTE A MCG3

Teniendo en cuenta que MCG3 había sido el tumor inmunizante determinante de la transformación neoplásica de GRA1 y GRC3, era necesario descartar algún tipo de actividad Natural Killer restringida de GRA1 y GRC3 frente a MCG3.

La metodología seguida fue la misma que en la técnicas generales descritas anteriormente de NK y ADCC. En este último caso utilizamos como anticuerpo sensibilizante BALB/c $\propto$ MCG3, a una dilución de 1/120.

M.- ACTIVIDAD FAGOCITICA EN MCG3, GRA1 Y GRC3

La actividad fagocítica en estas células se evaluó con la técnica de ingestión de partículas de látex (Kim y cols., 1979).

Una vez lavadas las células dos veces con HBSS, se resuspendieron a razón de $5x10^6$/ml en HBSS más 5% de FCS y a 1 ml de la suspensión celular se añadieron 100 ul de una solución de partículas de látex (1,1 u de diámetro) al 10%, diluidas al 1/1000 en solución salina (Sigma, USA). La mezcla se incubó 1 hora a 37º C en un rotador vertical a 30 rpm. Terminado este proceso, las células se lavaron dos veces en HBSS, resuspendiendo el sedimento en 0,2 ml de FCS.

En una serie de portas, se vertió una gota de cada suspensión, dejándose secar al aire, para posteriormente

fijarlas con alcohol y teñirlas con Giemsa durante 15 min.

El porcentaje de células con partículas ingeridas se objetivó microscópicamente. Como control positivo se probaron en paralelo macrófagos peritoneales de ratón y monocitos humanos activados.

Teniendo en cuenta la distinta capacidad fagocítica de las diferentes clases de fagocitos, tanto del sistema mieloide como del mononuclear fagocítico, en esta ocasión empleamos distintas clases de células fagocitarias como sistemas de control positivo (PMN humanos, monocitos humanos y macrófagos peritoneales de ratón).

N.- ESTUDIO CITOQUIMICO DE LAS CELULAS TUMORALES MCG3c, GRA1 Y GRC3.

Salvo en el caso de las Peroxidasas, Negro Sudán y PAS, en todas las demás técnicas se siguió la metodología de Pearse (1972), de acuerdo con las modificaciones de Suhaisrivartava y cols. (1983).

Para la citoquímica enzimática, las células en portas de cristal, una vez desecadas al aire, fueron fijadas con tampón cacodilato sódico 0,1 M pH 6,3, que llevaba añadidos glutaraldehido al 0,25% y sacarosa al 1%, durante 10-15 min. a 4º C. Después de la fijación, las células se lavaron en tampón cacodilato sódico 0,1 M con sacarosa al 1%.

1.- Tinción de Fosfatasa Acida.

La solución de tinción se preparó disoviendo en - 100 ml tampón acetato sódico 0,2 M pH 5,2; 20 mg de Naftol_ AS-BI fosfato (sal disódica) y 50 mg de la sal FAST BLUE BB (Sal Diazo-4'-amino-2'-5'-dietoxilbenzanilina de cloruro - zincico). Una vez agitada la mezcla, se filtró y se incubaron en ella las muestras durante 60 min a 37º C.

El efecto del ác. tartárico sobre la fosfatasa - ácida se probó añadiendo a la solución de tinción L(+) ácido tartárico a una concentración 0,05 M, con tiempos de incubación y temperatura exactamente igual que en el caso anterior.

2.- Tinción de Fosfatasa Alcalina.

La solución de tinción se preparó disolviendo en_ 100 ml de tampón Tris ClH 0,1 M pH 9, 20 mg de Naftil-AS-MX fosfato (sal disódica) y 50 mg de la sal FAST BLUE BB. Las_ muestras se incubaron en la solución, una vez agitada y filtrada, durante 1 hora a 37º C.

3.- Tinción de Alfa-Naftil-acetato esterasa.

Se preparó una solución de tinción, disolviendo - 20 mg de Alfa-Naftil-acetato en 0,5 ml de acetona, que se - disolvieron a continuación en 100 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 5,8. A la solución anterior se añadieron finalmente 50 mg de FAST BLUE BB. Las muestras se incubaron -

en esa solución final durante 30 min. a 37º C.

4.- Tinción de Naftol AS-D acetato esterasa.

La solución de incubación se preparó disolviendo 20 mg de Naftol AS-D acetato en 0,5 ml de acetona y luego éstos en 100 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,2. Subsecuentemente se añadieron 50 mg de FAST BLUE BB, agitándose la mezcla vigorosamente.

Las muestras se incubaron 30 min. a 37º C en esa solución, una vez filtrada.

5.- Tinción de Cloroacetato esterasa.

La solución de tinción se preparó disolviendo 20 mg de Naftol AS cloropropionato en 0,5 ml de acetona y añadiendo seguidamente 100 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 6,5 y 50 mg de FAST BLUE BB.

Las muestras se incubaron 60 min. a 37º C.

6.- Tinción de las Peroxidasas.

Seguimos la técnica de Graham y cols. (1965). Las muestras se fijaron en una mezcla de acetona-formaldehido tamponado pH 6,6 (PO_4HNa_2 20 mg / PO_4H_2K 100 mg / H_2O 30 ml Acetona 45 ml / Formaldehido 40% 25 ml), durante 15-20 segundos a temperatura ambiente.

La solución de tinción se preparó disolviendo 10 mg de 3-amino-9-etilcarbazol en 6 ml de dimetilsulfóxido, a los que se añadieron posteriormente 50 ml de tampón acetato 0,02 M pH 5-5,2 y 0,4 ml de H_2O_2 al 0,3%.

Las muestras, una vez lavadas, se incubaron durante 2'30'' en la solución teñidora filtrada, a temperatura ambiente. Una vez lavadas nuevamente se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 8 min.

7.- Tinción de Negro Sudan B.

Según técnica de Miale (1983). La fijación de las muestras se efectuó con formaldehido neutralizado al 4%, conteniendo Cl_2Ca al 1%, a 4º C durante 4 horas.

Para preparar la solución de tinción, se disolvieron 0,3 gr de Negro Sudan B en 100 ml de alcohol etílico absoluto, con agitación periódica durante dos días hasta la disolución final del colorante. La solución fue finalmente filtrada y 60 ml de ella se mezclaron con 40 ml de una solución tamponada, compuesta de 100 ml de H_2O destilada con 0,3 gr de $PO_4HNa_2.12H_2O$, a la que se habían añadiso 30 ml de alcohol etílico absoluto conteniendo 16 gr de fenol puro.

Los portas fueron sumergidos en esa mezcla teñidora final filtrada, durante 30 min., pasando a continuación a un lavado de varios minutos con alcohol etílico absoluto.

Finalmente, las muestras fueron contrateñidas en

Giemsa diluido 1/20 durante 40 min. y secadas al aire.

8.- Tinción del PAS.

Según Hotchkiss (1948). La fijación de las muestras se efectuó con una mezcla de etanol absoluto, acetona y ácido acético glacial (6/3/1) durante 1 hora a 4º C.

Una vez secadas las muestras, se incubaron 7 min. con una solución de ácido peryódico al 1% en agua destilada de preparación reciente, y a continuación, después de lavar y secar de nuevo los portas, se incubaron 1 min. con una mezcla de 0,5 ml de ác. clorhídrico y 0,6 ml de metabisulfito sódico al 40% diluido 1/10 en agua destilada.

Después de lavados y secados los portas, se incubaron finalmente durante 45 min. con el reactivo de Schiff (200 ml de agua destilada calentada a 100º C más 1 gr de pararosanilina base. Una vez enfriada la mezcla a 50º C, se añade 1 ml de ác. clorhídrico y cuando alcanza la temperatura ambiente 2 gr de metabisulfito sódico) en la oscuridad, previamente filtrado. Se lava con agua destilada 10 min. y se contrasta con hematoxilina de Harris durante 15 min.

Ñ.- CAPACIDAD FAGOCITICA DE IgG AGREGADA (IgGaa) EN CELULAS GRA1 Y GRC3.

Puesto que tanto A1 como C3 parecen tener IgG intracitoplasmática, nos pareció que no era prudente utilizar una técnica de inmunofluorescencia o de tinción inmunoenzi-

mática del citoplasma, para detectar la posible fagocitosis de IgG, teniendo en cuenta la posibilidad de una reacción - cruzada entre la inmunoglobulina sintetizada por la célula_ y la que pudiera interiorizar desde el medio externo. Por - ello, tomando como punto de partida la técnica de Zubler y_ cols. (1976) para la detección de inmunocomplejos circulantes, estandarizamos en nuestro laboratorio un sistema experimental para detectar el grado de aclaramiento de IgGaa en una solución que era capaz de llevar a cabo un número determinado de células fagocíticas, para después compararlo con_ nuestras células tumorales.

1.- Purificación de C1q humano.

De acuerdo con el protocolo establecido por Volanakis y Stroud en 1972, 40 ml de suero, obtenidos a partir_ de 150 ml de sangre coagulada a 4º C, se mezclaron a 37º C_ durante 10 min. con 10 µl de una solución de EDTA 0,1 M pH_ 7,5, pasando la mezcla seguidamente a baño de hielo y reajustando el pH a 7,5 con ClH 0,1 N.

Una vez estabilizada la temperatura de la muestra se agregaron 200 ml de una solución EDTA 0,005 M pH 7,5, dejándola incubar una hora con agitación (varilla de vidrio)_ periódica; después de lo cual se centrifugó la muestra a - 1.000 rpm durante 30 min. a 4º C. Finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante para resuspender posteriormente el sedimento proteico en 120 ml (20 ml/tubo) de una - solución EDTA 0,02 M pH 7,5. Esta nueva mezcla se centrifugó a 1.000 rpm durante 30 min. a 4º C. El paso anterior -

volvió a repetirse, con resuspensión final del sedimento total en 10 ml de una solución EDTA 0,01 M más ClNa 0,75 M, - pH 5 e incubación durante toda una noche. Al día siguiente, se centrifugó la muestra a 16.000 rpm a 4º C, por un período de 30 min. y el sobrenadante fue dializado dos veces consecutivas, en períodos de dos horas cada vez, frente a un - volumen suficiente (2 litros/dializado) de un tampón EDTA - 0,067 M, pH 5.

Terminada la diálisis, el contenido de la tripa - se centrifugó a 16.000 rpm (30 min. a 4º C), eliminándose - el sobrenadante después del centrifugado. Posteriormente, - se realizaron dos centrifugaciones más a 10.000 rpm (30 min a 4º C), añadiendo cada vez 20 ml del tampón de diálisis - sin resuspender el sedimento. El precipitado final se resuspendió con varilla de vidrio en 3 ml de una solución EDTA - 0,1 M más ClNa 0,3 M, pH 7,5, con estabilización subsecuente de dos horas a 4º C y centrifugación ulterior a 16.000 - rpm durante 30 min. a 4º C.

El rendimiento del último sobrenadante fue de - 300 µg/ml de proteina (concentración calculada a partir de la absorbancia de la muestra a 280 nm). La pureza del Clq - aislado se probó mediante inmunodifusión doble e inmunoelectroforesis con un antisuero total y otro específico.

La funcionalidad de la molécula, una vez marcada con I^{125}, fue comprobada mediante su capacidad para unirse a receptores Clq en células Raji y su grado de fijación a - IgG agregada.

2.- Marcaje de Clq con I^{125}.

Siguiendo la técnica de Heusser y cols. (1973), - utilizamos 0,75 ml de la solución de Clq (aproximadamente - 200 µg de proteina) y 500 µl de I^{125} (aproximadamente 5 µl_ para una actividad toral de 5 mCi en 50 µl). La temperatura de la prueba fue aproximadamente de 15º C.

Una vez mezclados los dos reactivos anteriores en un tubo de plástico de 10 ml, se añadieron secuencialmente_ 2 µl de una solución de lactoperoxidasa (2,5 mg/ml), 5 µl - de H_2O_2 al 30% diluida 10.000 veces en tampón veronal salino (VBS) y 5 µl de yoduro potásico (KI) a una concentración de 0,0054 mg/ml en tampón VBS, agitando la mezcla final y - dejando que la cinética de la reacción procediera durante - 15 minutos más; al cabo de los cuales fue frenada con 10 µl de KI a 5,4 mg/ml en VSB, más 10 µl de azida sódica (N_3Na), más 2 ml de VSB a 4º C. Se hicieron alícuotas de 100 µl, - congelándose en nitrógeno líquido. Cada una de las alícuo - tas fue resuspendida en 3 ml de VSB, siendo utilizada a esa dilución en las pruebas.

El control de radioioduración fue realizado mi - diendo la actividad total (en cuentas/minuto) de 5 µl de la solución marcada, frente a la actividad del mismo volumen - precipitado con 1 ml de tricloroacético (TCA) al 20%. En to dos los casos la eficacia del marcaje fue superior al 60%.

3.- Aislamiento de Polimorfonucleares de sangre periférica

Siguiendo a Jepsen y Skottun (1982), los granulocitos fueron aislados en gradientes discontinuos de Percoll (Pharmacia) en solución salina fisiológica: un gradiente superior de 1.075 gr/ml para separar células mononuclares y otro inferior de 1.096 gr/ml para separar polimorfonucleares, preparados conforme a la fórmula recomendada por el fabricante:

$$Vo = V \frac{P - 0,1Pi - 0,9}{Po - 1}$$

donde

Vo = Volumen de Percoll crudo
V = Volumen final deseado de la solución trabajo
P = Densidad de la solución final
Pi = Densidad del ClNa 1,5 M (1.058 gr/ml)
Po = Densidad del Percoll crudo (1.130 gr/ml)

La sangre periférica (30 ml) fue anticoagulada con heparina sin conservantes -- 20 U/ml -- (Sigma) y diluida a la mitad en solución de Krebs-Ringer. Una vez depositada la mezcla sanguínea sobre el primer gradiente, de forma que existiera una separación neta entre ambas fases, se centrifugaron las muestras a 300 g durante 20 minutos.

Tras el proceso de centrifugado, se obtenían dos capas celulares: la superior de células mononucleares y la inferior de polimorfonucleares, que fue la utilizada por nosotros, siendo desechada la primera. Las células fueron -

ajustadas a una concentración de $20x10^6$/ml en solución de - Krebs-Ringer.

4.- Titulación de la actividad fagocítica de IgG agregada en Polimorfonucleares humanos.

Con objeto de saber entre qué rangos de concentración de IgG debíamos estandarizar la curva fagocítica a utilizar con las células tumorales, agregamos por calentamiento a 63º C durante media hora IgG purificada (Miles Laboratories) a una concentración de 50 mg/ml, centrifugando después la muestra 1 hora a 2.000xg a temperatura ambiente. A_ partir de esa concentración obtuvimos las que íbamos a utilizar en la prueba, diluyendo en solución de Krebs-Ringer : 25 mg/ml, 20 mg/ml, 15 mg/ml, 10 mg/ml, 6 mg/ml, 3 mg/ml, - 1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,1 mg/ml (Fig. 25).

De cada una de las diluciones anteriores se dis - pensaron 50 µl en tubos microfuga de 1,8 ml y a continua - ción 100 µl de PMN a una concentración de $20x10^6$ células/ml incubándose durante una hora y media a 37º C en un rotador_ vertical a 30 rpm. Asímismo, se dispensaron como controles_ de fijación de Clq-I^{125}, 50 µl de cada una de las concentraciones de IgGaa, diluidas 1/3 en solución de Krebs-Ringer,_ incubándose en las mismas condiciones que las anteriores.

Finalizada la incubación, todos los tubos fueron_ centrifugados 10 min. a 800Xg, y de cada sobrenadante se tomaron 100 µl, que se dispensaron en tubos de plástico (12 x 75 ml) a los cuales se habían añadido previamente 50 µl de_

FIGURA 25: Curva de titulación de fagocitosis de IgG - agregada (IgGaa) por PMN humanos normales, - expresada como porcentaje de precipitación - especifica de Clq-I^{125}.(Cada punto representa la media de cinco determinaciones).

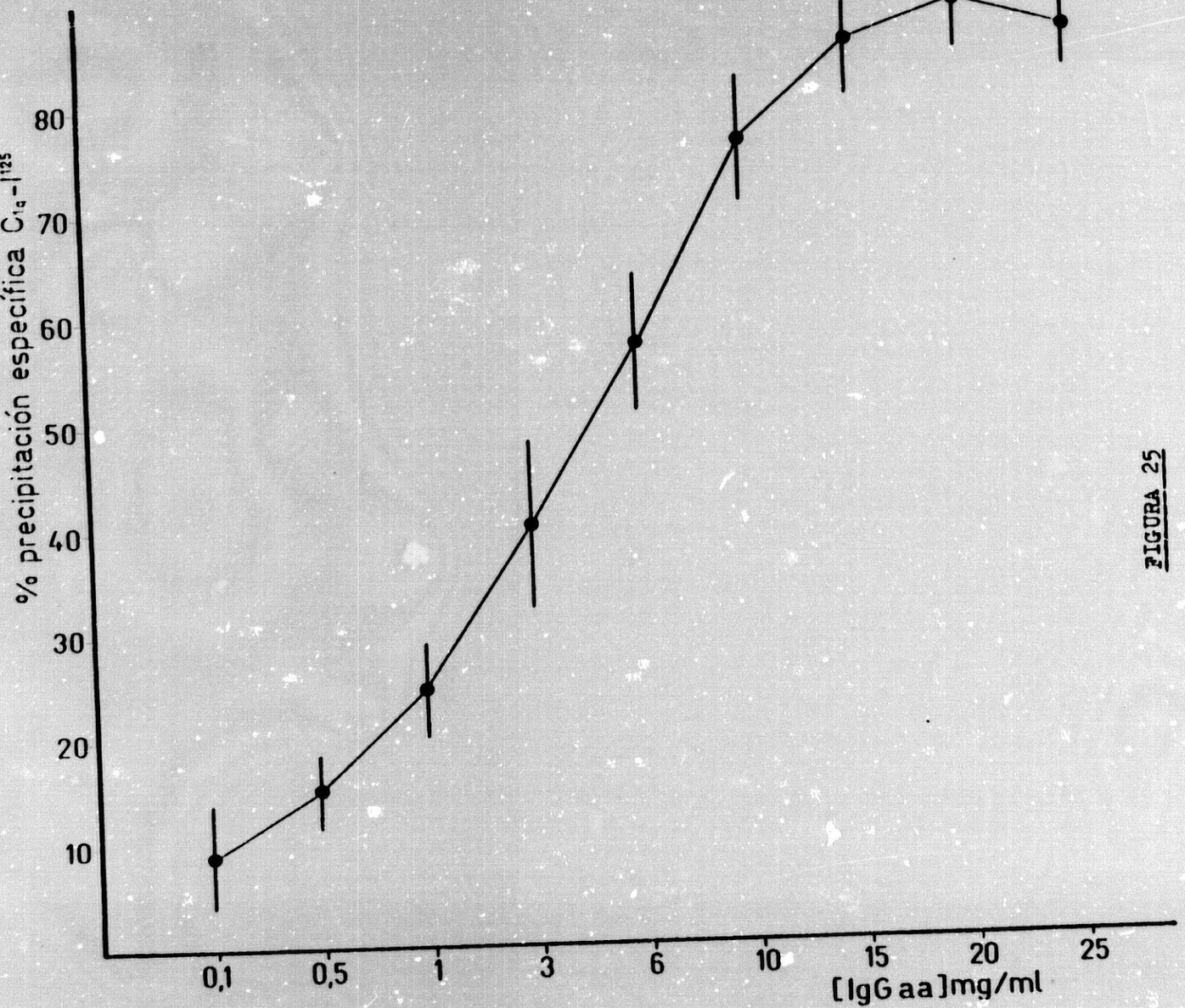

% precipitación específica C_{1q}-I^{125}
80
70
60
50
40
30
20
10
0,1
0,5
1
3
6
10
15
20
25
[IgG aa]mg/ml

FIGURA 25

suero humano normal inactivado (30 min. a 56º C) más 50 µl de EDTA 0,2 M.

Además se montó un control negativo con 100 µl de suero humano normal inactivado más 50 µl de EDTA 0,2 M y un control de actividad total con 150 µl de suero humano normal inactivado. Todos los tubos: mezclas problema y de fijación de $Clq\text{-}I^{125}$ más los controles de actividad total y negativo, se incubaron 30 min. a 37º C; añadiéndose a cada tubo posteriormente 50 µl de $Clq\text{-}I^{125}$ diluido y 1 ml de Polietilenglicol (PEG) al 3%, con una nueva incubación de 1 hora a 4º C y centrifugación final a 1.500Xg durante 20 min. Una vez eliminados los sobrenadantes, se cuantificó la actividad radiactiva de los precipitados en un contador gamma (LKB).

5.- Actividad fagocítica de A1, C3 Y MCG3.

Las células tumorales se ajustaron a $20x10^6$/ml y se probó la capacidad de fagocitosis a través del receptor Fc de las células A1 y C3. El tumor MCG3 fue utilizado como control negativo y granulocitos aislados de sangre periférica normal como control positivo.

Las condiciones del ensayo fueron exactamente las mismas utilizadas en las pruebas de titulación y estandarización de la curva del apartado anterior, salvo que no se utilizaron las concentraciones de 25 mg/ml y 20 mg/ml de IgGaa, al ser la prueba insensible a dichas concentraciones.

ruro de polivinilo (Flow) con fondo redondo, se dispensaron 100 ul de un antisuero de conejo frente a IgG de ratón, diluido a 1/1.500 en tampón de absorción (carbonato sódico + bicarbonato sódico pH 9,6), dejando incubar la placa 1 hora a 37º C y 24 horas más a 4º C, al cabo de las cuales los pocillos se lavaban 3 veces con tampón PBS más 0,5% de Tween 20 y otras tres adicionales con agua destilada, eliminando los sobrenadantes mediante succión con bomba de vacío.

Para monitorizar las posibles reacciones inespecíficas debidas a los reactivos empleados, se montaron paralelamente tres tipos de controles: 1) control de primer antisuero más segundo antisuero marcado con peroxidasa; 2) control de reacción entre muestra problema y segundo anticuerpo conjugado (en este caso, en los pocillos correspondientes sólo se añadía tampón de absorción sin el primer antisuero); 3) control de fijación inespecífica del conjugado al plástico (se eliminaban la fijación del primer antisuero y la de la muestra problema).

Una vez terminada la fase de absorción, los pocillos eran rellenados con 200 µl de la solución de bloqueo (PBS con albúmina sérica bovina al 1%), incubándose la placa 1 hora y media a 37º C, con lavado posterior según pauta indicada más arriba. A continuación, se añadían por duplicado a cada pocillo 100 µl de las muestras (preparaciones estándar, extractos tumorales y controles negativos o inespecíficos, o bien PBS-Tween en el caso de los controles de reactivos), con incubación subsecuente 1 hora y media a 37º C y al finalizar dicho período se repetía de nuevo el protoco

0.- DETECCION DE INMUNOGLOBULINAS EN LOS EXTRACTOS Y SOBRENADANTES DEL CULTIVO DE A1 Y C3 MEDIANTE ENZIMOINMUNOANALISIS.

Con esta prueba tratamos de saber si la IgG detectada en el citoplasma de A1 y C3 era secretada al medio externo.

Para establecer la curva estándar de la prueba, utilizamos distintas concentraciones (1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml y 1000 ng/ml) de IgG_1 monoclonal murina (anticuerpo monoclonal IOT8 suministrado por Immunotech). Como controles negativos utilizamos extractos celulares provenientes del lisado de $5x10^8$ células EL-4 (timoma obtenido en C57BL/6). Los extractos de MCG3 por una parte, y A1 y C3 por otra, se prepararon también a partir de $5x10^8$ y $5x10^7$ células respectivamente, mediante 6 ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido y posterior centrifugado para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes fueron dializados frente a PBS antes de ser probados.

Las células fueron mantenidas previamente a la prueba 24 horas en RPMI con 2-mercaptoetanol y aminoácidos no esenciales, pero sin suero fetal; no obstante, se montó también un control inespecífico con suero fetal. La modalidad de técnica utilizada fue un enzimoinmunoensayo tipo sandwich en fase sólida.

En cada pocillo de una microplaca flexible de clo

lo de lavado, de modo que una vez finalizado éste, se añadían a cada pocillo 100 µl de un antisuero de conejo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Bio-Rad), incubándose de nuevo otra hora y media a 37º C.

Después del lavado final, se rellenaban los pocillos con 200 µl de ortofenilendiamina (OPD), que actúa como sustrato de peroxidasa, dejando que la reacción procediera durante 30 min. a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La reacción se frenaba añadiendo a cada pocillo 50 µl de ác. sulfúrico 4 M. El color desarrollado en la reacción era cuantificado en un lector de placas microelisa automatizado Titertek multiscan (Flow) a una longitud de onda de 492 nm. Los resultados fueron introducidos posteriormente en un microprocesador (immunoassay analyzer - Photon) para obtener las curvas estándar y el cálculo automatizado de los resultados.

P.- <u>ACTIVIDAD BIOQUIMICA DE ARILSULFATASA EN EXTRACTOS DE A1, C3 Y MCG3.</u>

Siguiendo la técnica de Zucker-Franklin y cols. (1983), las células tumorales y distintas fracciones celulares (esplenocitos de BALB/c y polimorfonucleares y eosinófilos humanos) se lavaron 3 veces en solución salina al 0,85% en tubos de microfuga cónicos a una concentración por tubo de $2,5x10^6$ células, aspirándose completamente el sobrenadante después del último lavado. Los botones celulares se resuspendieron en 50 µl de agua destilada con agitación mecánica y se sometieron a una serie de seis ciclos de congela-

ción-descongelación en nitrógeno líquido, añadiéndose posteriormente a cada tubo 200 µl de la solución sustrato, compuesta por p-nitrocatecol sulfato 6,25 mM (Sigma) en tampón acetato 0,2 M pH 5,7. Al cabo de 1 hora de incubación a 37º C, la reacción se frenó con 250 µl de NaOH 5 M.

Finalmente, los detritus celulares se sedimentaron con centrifugación a 1.500 g durante 10 min. y los productos de la reacción, que en solución alcalina tienen un color naranja, se analizaron espectrofotométricamente a una D.O. de 515 nm.

Q.- DETECCION DE ANTIGENOS DE MEMBRANA EN MCG3, GRA1 Y GRC3 CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales empleados para este estudio fueron los siguientes: MAS-034 (MAC-1) (Sera-Lab), que reconoce un antígeno presente en macrófagos murinos; - NEI 020 (Ly 5.1) (New England Nuclear), que reconoce un antígeno distribuido en prácticamente todas las células del sistema linfoide, mieloide y monocítico, aunque con particular relevancia en células de tipo T, B y Natural Killer; - NEI 017 (Lyt 1.2) (New England Nuclear), que reacciona con un antígeno de superficie de células helper/inductoras; - NEI 006 (Lyt 2.2) (New England Nuclear), que reacciona con un antígeno de membrana de células supresor/citotóxico; - 28-13-3S (anti H-2K^{b}) (Bionetics), que reconoce el determinante H-2.39 específico de los haplotipos H-2^{b} y H-2^{f}; - 31-3-4S (anti H-2^{d}) (Bionetics), que reconoce el determinante H-2.31 privado del haplotipo H-2^{d}; 28-16-8S (anti I-A^{b})

CEPA MURINA	Thy 1,alelo	Lyt 1,alelo	Lyt 2,alelo	Lyb 2,alelo	Tla,alelo	Ly 5,alelo	Ly 9.2,alelo
A	1,2	1,2	2,2	2,2	a	5,1	9,1
AKR	1,1	1,2	2,1	2,3	b	5,1	9,1
BALB/cJ	1,2	1,2	2,2	2,2	c*	5,1	9,1
BALB/cBy	1,2	1,2	2,2	2,2	c*	5,1	9,1
CBA/J	1,2	1,1	2,1	2,1	b	5,1	9,1
CBA/N	1,2	1,1	2,1	2,2	b	5,1	9,1
CE	1,2	1,2	2,1	2,3	b	NA	9,1
C3H/An & C3H/HeJ	1,2	1,1	2,1	2,2	b	5,1	9,1
C3Hf/Bi	1,2	1,1	2,1	2,1	b	5,1	9,1
C57BL/6	1,2	1,2	2,2	2,2	b	5,1	9,2
C57BL/10	1,2	1,2	2,2	2,2	b	5,1	9,2
C58	1,2	1,2	2,1	2,1	a	5,1	9,2
DBA/2	1,2	1,1	2,1	2,1	c*	5,1	9,1
SJL	1,2	1,2	2,2	2,3	a	5,2	9,1
SWR	1,2	1,2	2,2	2,1	a	5,1	9,1
129	1,2	1,2	2,2	2,2	c*	5,1	9,1

Formas alélicas de algunos antígenos linfocitarios en las cepas murinas endogámicas más comunes.

(Bionetics), dirigido frente al determinante Ia m8, común y específico para los haplotipos H-2^b y H-2^d; M5/114 (anti - I-A^b e I-E^b) (Hybritech), que define un determinante compartido por las subregiones I-A e I-E de los haplotipos H-2^b, H-2^d y H-2^k; 26-7-11S (anti I-A^k) (Bionetics), que reconoce un determinante privado para la región I del haplotipo H-2^k; 34-5-3S (anti I-A^b) (Bionetics), que detecta un determinante público de la región I compartido por varios haplotipos; 34-1-2S (anti H-2K^d, anti H-2D^d) (Bionetics), que define un determinante antigénico público común a varios haplotipos; 34-5-8S (anti H-2D^d) (Bionetics), que reacciona con el determinante H-2.4 privado para el haplotipo H-2^d. No obstante, parece reaccionar también con un determinante de H-2K^b; 16-3-22N (anti H-2K^k) (Bionetics), que define un determinante privado (H-2.23) para el haplotipo H-2^k. Las características de todos estos anticuerpos se resumen en la Tabla - VIII.

1.- Citotoxicidad directa con Anticuerpos Monoclonales mediada por Complemento.

La técnica utilizada fue básicamente la descrita por Van Wauwe y Goossens (1981). En tubos de plástico de 3 ml se incubaron durante 5 min. a 37º C, 50 ul de cada una de las suspensiones celulares tumorales, o bien de las suspensiones celulares controles ($5x10^6$ células/ml) con 50 ul de cada una de las diluciones de los diferentes anticuerpos monoclonales (NEI 020, NEI 017 y NEI 006 a 1/50; 28-13-3S, 31-3-4S y 28-16-8S a 1/32; M5/114 a 1/100; MAS-034 no se - utilizó en esta técnica porque en las pruebas de titulación

TABLA VIII

Anticuerpos monoclonales utilizables para detectar antígenos de superficie en las células tumorales MCG_3, GRA_1 y GRC_3.

HIBRIDOMA PRODUCTOR	ISOTIPO DE Ig	REACTIVIDAD PRIMARIA	REACCIONES CRUZADAS	ESPECIFICIDADES RECONOCIDAS
28-13-3S	IgMk	$I\text{-}A^k$	ninguna	Ia,2
28-16-8S	IgMk	$I\text{-}A^b$	$I\text{-}A^d$	Ia,8
34- 5-3S	IgG_{2ak}	$I\text{-}A^d$	$I\text{-}A^b$,H-2p,q	No identificadas
28-13-3S	IgM_k	$H\text{-}2K^b$	H-2f	H-2, 39
3[illegible] 3-4S	IgM	$H\text{-}2K^d$	ninguna	H-2, 31
34- 1-2S	IgG_{2ak}	$H\text{-}2K^d$ $H\text{-}2D^d$	$H\text{-}2K^b$ H-2 p,q,r,s	No identificadas
34- 5-8S	IgG_{2ak}	$H\text{-}2D^d$	$H\text{-}2K^b$?	H-2, 4
16- 3-22N	IgG_{2ak}	$H\text{-}2K^k$	ninguna	H-2, 23
$M_{S/114}$	IgG_{2b}	I^b	$I^{d,k}$	No identificadas,
MA3D24	IgG	-	-	Reconoce un determinante presente en macrófagos murinos.
NEI_{020}	IgG_{2a}	-	-	Detecta un determinante presente en todas las células del systema hematopoyético murino (Ly5.1)
NE_{1017}	IgG_{2b}	-	-	Se fija a un determinante presente en células T de carácter Helper (Lyt1.2)
NEI_{006}	IgM	-	-	Reconoce un determinante presente en células T de tipo supresor/citotóxico (Lyt.2.2)

resultó no ser fijador del Complemento.

A continuación se añadieron a cada tubo 10 µl de suero normal de conejo como fuente de Complemento, incubándose de nuevo los tubos a 37º C durante 45 min. Una vez terminada la incubación, se añadieron a cada tubo 5 µl de una solución de eosina al 3% y 3 minutos más tarde 100 µl de formaldehido al 35% pH 7,2 para frenar la reacción y estabilizar las células.

El porcentaje de células muertas se determinó en cámara de Neubauer bajo visualización microscópica de contraste de fase con un objetivo 40X. Todos los recuentos se hicieron por triplicado, contándose al menos 300 células en cada caso. Se desecharon las muestras que en los controles de citotoxicidad inespecífica (células más Complemento) presentaron una mortalidad superior al 5%. Además, en la prueba se incluyeron timocitos de C57BL/6, timocitos de BALB/c, timocitos de CBA, células del timoma EL-4 y del linfoma B - LSTRA como elementos de control positivo para los distintos anticuerpos monoclonales.

2.- <u>Prueba de roseteo indirecto para detección de anticuerpos fijados a membranas celulares.</u>

Algunos de los Ac Mo mostraron reactividad débil, tanto en las pruebas de titulación como en los sistemas de control positivos utilizados en la técnica anterior, lo que nos hizo sospechar la poca fiabilidad de los resultados obtenidos con la prueba anterior. Así pues, montamos una nue-

va técnica de roseteo con esferas de poliestireno.

Todas las células (problemas y control) se suspendieron a una concentración de $5x10^6$/ml y se incubaron en las mismas condiciones que en el caso anterior con los distintos Ac Mo. Terminada la incubación, las células se lavaron 3 veces en RPMI 1.640 sin FCS, añadiéndose luego a cada botón celular 100 ul de RPMI sin FCS y 50 µl de inmunoglobulina de conejo anti-Ig de ratón acoplada a esferas de poliestireno (Bio-Rad). Después de agitarse la mezcla, se centrifugó a 600 rpm durante 5 min., con incubación posterior a 4º C durante 30 min. El porcentaje de rosetas formadas se determinó en cámara de Neubauer con microscopio de contraste de fase. Cada muestra se montó por triplicado.

Esta prueba se realizó en tres condiciones experimentales diferentes:

a) Con las células cultivadas sin ningún tratamiento previo.

b) Después de tratar las células con Neuraminidasa.

c) Posteriormente a la estimulación de las células durante 72 horas con 10 ng/ml de PMA (acetatomiristato de forbol).

3.- <u>Enzimoinmunoanálisis cuantitativo para antígenos de superficie.</u>

Aunque la prueba IARR resulta ser más sensible y

segura que la de citotoxicidad directa mediada por Complemento, es evidente que para la formación de rosetas se necesita cierta densidad antigénica en la membrana que pueda ser reconocida por un Ac Mo determinado. Por ello, las técnicas IARR no permiten asegurar que un resultado negativo no sea debido a una expresión débil del antígeno correspondiente en la superficie celular.

Para eliminar esta posibilidad, ensayamos una técnica de ELISA cuantitativa (Kennet, 1980) equivalente a la de radiobinding o la de fluoroinmunoensayo para antígenos de superficie. La elección de esta técnica frente a las otras dos, residía en el hecho de que podíamos obtener los datos automatizados y normalizados respecto de un sistema estándar interno del espectrofotómetro que sirve de referencia. Este método de cálculo hace que los resultados sean más fiables.

Cada tipo de células tumorales (A1, C3 y MCG3) y controles positivos (timocitos de C57BL/6, esplenocitos de BALB/c, timocitos de BALB/c y esplenocitos de C57BL/6) se ajustó a una concentración de $2x10^6$/ml en PBS, después de ser lavados 3 veces en el mismo tampón. A cada pocillo de una placa microtiter de fondo plano, previamente activada con una solución de polilisina (Sigma) a 1 mg/100ml en PBS (50 µl/pocillo) durante 1/2 hora a 37º C, se añadieron 50 µl (10^5 células/pocillo) de las suspensiones celulares correspondientes, centrifugándose las placas a 2000 rpm durante 5 min. Luego, se dispensaron 50 µl/pocillo de una solución fría de glutaraldehido al 0,5% en PBS, incubándose las

placas 15 min. a temperatura ambiente con 3 lavados posteriores por inmersión y decantado en PBS. Para bloquear el glutaraldehido, se incubaron las placas con una solución de glicina 100 mM y albúmina sérica bovina al 0,1% 30 min. más a temperatura ambiente y luego se lavaron 3 veces en PBS, según hemos comentado ya.

Posteriormente, se dispensaron en cada pocillo 50 µl de la dilución de cada Ac Mo (26.7.11S 1/50; 34.5.3S 1/100; 31.3.4S 1/50; 34.1.2S 1/100; 34.5.8S 1/50; 16.3.22N 1/100; 28.16.8S 1/100; 28.13.3S 1/50; NEI 020 1/500; NEI 006 1/500; NEI 017 1/500; MAS 034 1/100 y M5/114 1/1000), con incubación subsiguiente a 37º C durante una hora y media. Después de tres lavados adicionales con PBS, se añadieron 100 µl de los correspondientes antisueros marcados con peroxidasa (cabra anti-IgG de ratón a 1/15.000 --Bio-Rad--, conejo anti-IgM de ratón a 1/2.500 --Behring--, y cabra anti-IgG de rata a 1/3.000 --Cappel--), incubándose de nuevo las placas una hora y media a 37º C.

Una vez lavados los pocillos 3 veces en PBS, se dispensaron 200 µl de la solución de sustrato (OPD) y al cabo de 30 min. se frenó la reacción con 5 µl de FNa 1 M. Las absorbancias se leyeron en un microanalizador automatizado (Titertek multiskan) a doble longitud de onda: 1ª 492 nm y 2ª 620 nm.

Como en el caso anterior, las células fueron tratadas con neuraminidasa o con PMA para desbloquear un posible camuflaje antigénico o inducir la expresión de antígenos en la superficie.

RESULTADOS

RESULTADOS

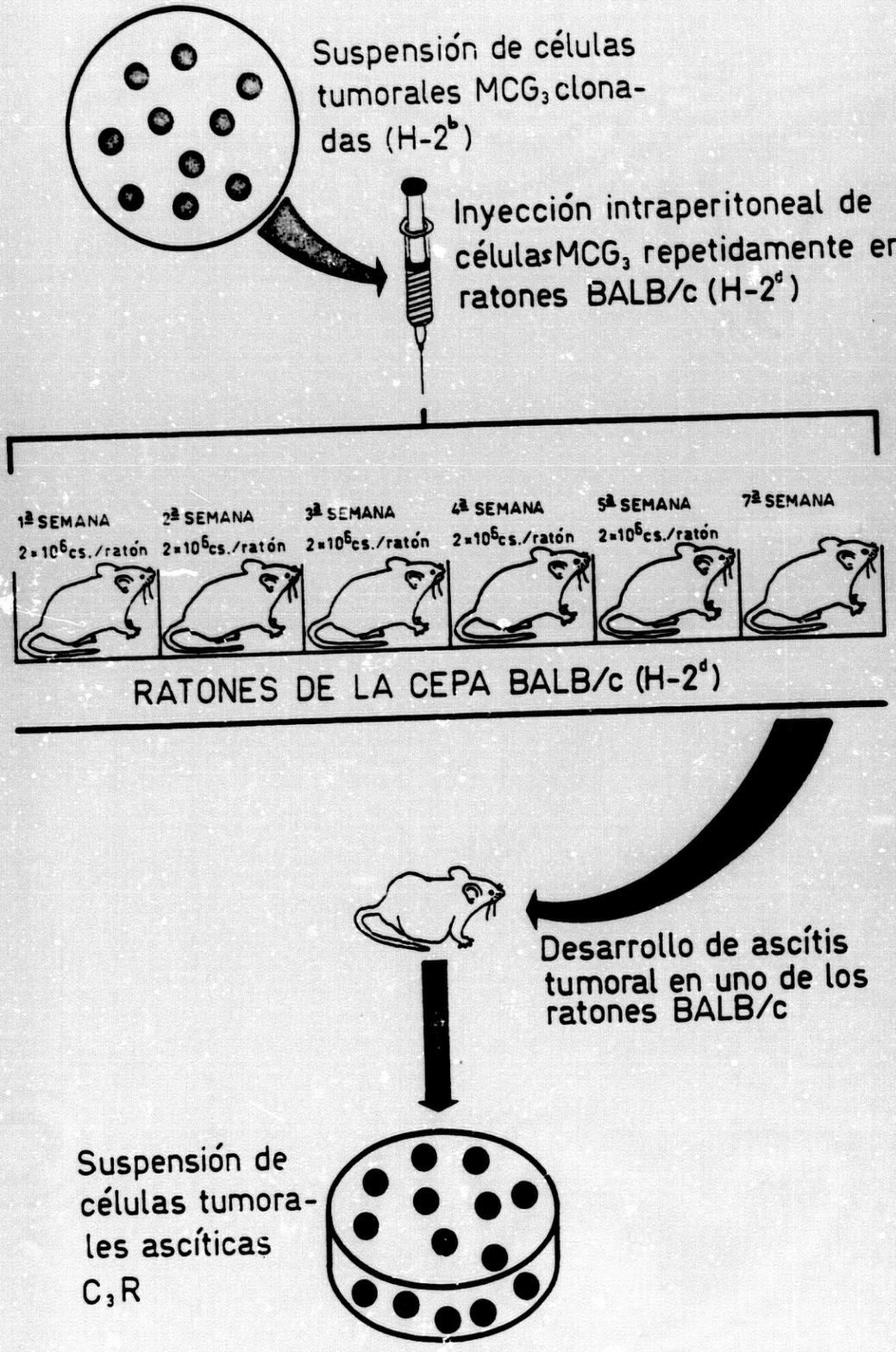
I.- CLONAJE DE CELULAS TUMORALES MCG3

Partiendo de cultivos en fase de crecimiento exponencial, las células MCG3 se clonaron por dilución límite en placas microtiter de 96 pocillos con fondo plano, según se ha explicado en la Sección de Métodos. A los 21 días de crecimiento, se eligió el clono del pocillo D8 para ser clonado de nuevo con la misma técnica, y al cabo de 14 días más, el subclono B6 fue expandido primero en placas de 24 pocillos y finalmente en frascos de cultivo de 25 cm^2. Estas células subclonadas fueron las utilizadas para su inoculación en ratones BALB/c.

II.- INOCULACION TUMORAL ALOGENICA

La inyección de células tumorales MCG3 intraperitonealmente, repetida cada semana hasta un total de 5, ocasionó la muerte en 12 de los 15 animales de experimentación (BALB/c). No obstante, un ratón de los tres supervivientes desarrolló entre la 6ª y 7ª semanas una ascitis voluminosa, cuyas células se extrajeron para estudio ulterior. Para valorar la inmunocompetencia del animal, nos servimos del fenómeno de la inmunidad antitumoral concomitante: al comienzo de la 6ª semana, cuando el ratón presentaba un estadío de ascitis incipiente, le inyectamos en el lomo, subcutáneamente, $2x10^6$ células de MCG3. A pesar de la ascitis progresiva, el implante celular subcutáneo fue rechazado. Los elementos celulares de esa ascitis fueron denominados C3Ra. En la Fig. 26 se describe el proceso seguido en la inoculación de MCG3 (células) en BALB/c (ratones).

Figura 26


Suspensión de células tumorales MCG3 clonadas (H-2b)
Inyección intraperitoneal de células MCG3 repetidamente en ratones BALB/c (H-2d)
1ª SEMANA 2×10⁶cs./ratón
2ª SEMANA 2×10⁶cs./ratón
3ª SEMANA 2×10⁶cs./ratón
4ª SEMANA 2×10⁶cs./ratón
5ª SEMANA 2×10⁶cs./ratón
7ª SEMANA
RATONES DE LA CEPA BALB/c (H-2d)
Desarrollo de ascítis tumoral en uno de los ratones BALB/c
Suspensión de células tumorales ascíticas C3R

III.- ESTUDIO DEL HAPLOTIPO H-2 EN CELULAS C3R ASCITICAS

Cuando probamos las células ascíticas C3R frente a una batería de antisueros con especificidades antiH-2^b, antiH-2^d y antiH-2^k, observamos que tanto los sueros antiH-2^b como los antiH-2^d reaccionaban positivamente con las células C3R y, salvo en un caso, atribuido en principio a reacción cruzada con H-2^d, los antisueros antiH-2^k presentaron reacciones negativas.

En la Tabla IX se describen los antisueros empleados y los porcentajes de positividad obtenidos en cada caso.

IV.- ESTUDIO DEL HAPLOTIPO H-2 EN CELULAS C3R CULTIVADAS

Teniendo en cuenta que la presencia de células ascíticas con antígenos de superficie H-2^d podía deberse, entre otras posibilidades, a la infiltración de células macrofágicas o linfoides del huésped, se procedió al cultivo de una parte de los elementos celulares ascíticos para eliminar las células infiltrantes si ése era el caso.

Conforme a la metodología ya descrita y una vez estabilizados los cultivos tras varios pases in vitro, volvimos a probar de nuevo las células con los mismos antisueros que en el caso de sus congéneres ascíticas. Contra lo esperado, las células C3R crecidas in vitro sólo reaccionaban con los antisueros antiH-2^d y salvo uno de ellos (CBA $\propto$ C57BL/6), los sueros antiH-2^b presentaban reacciones negativas (menos del 30% de inhibición en la captación de

TABLA **IX**

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 EN CELULAS TUMORALES C3R[(a)] MEDIANTE ANTISUEROS POLIESPECIFICOS

	CPM[(b)] : $\bar{X}$±DS	% inhibición[(c)]
Células	32056±2369	-
Complemento	32691±772	-
BALB/c ∝ CBA	30437±2051	(7%)
C57 ∝ B10BR	1464±122	(95%)
CBA ∝ BALB/c	1872±26	(94%)
B10 ∝ B10D2	1586±137	(95%)
(BALB/c X CBA) ∝ C57BL/6	976±37	(97%)
(CBA X C57BL/6) ∝ BALB/c	443±36	(99%)
(BALB/c X C57BL/6) ∝ CBA	28286±2318	(13%)
CBA ∝ C57BL/6	436±26	(98%)

(a) Células de fluido ascítico

(b) Las CPM representan la media de cinco experimentos para cada antisuero.

(c) El % de inhibición se obtuvo directamente a partir de las medias: $\frac{CMC' - CMAs}{CMC'} \times 100$, donde CMC'= Cuentas medias de Complemento y CMAs son las Cuentas medias de los antisueros.

timidina radiomarcada). Como en el caso anterior, la positividad de CBA C57BL/6 se interpretó como una reacción cruzada (Vid. Tabla X).

Estos mismos resultados se repitieron cuando las células se probaron frente a antisueros monoespecíficos para H-2^b y H-2^d. Solamente aquellos antisueros con especificidad H-2^b privada, pública o con doble especificidad (b/d), reaccionaron con las células C3R cultivadas, tal como se puede ver en la Tabla XI.

V.- ANTIGENOS Thy-1 Y ESPECIFICO DE TUMOR EN CELULAS C3R

Un paso ulterior consistió en probar las células C3R ascíticas y cultivadas frente al antisuero anti-Thy 1 (Thy 1 es un antígeno de diferenciación característico de las células T murinas) y frente a un anticuerpo monoclonal con la misma especificidad.

En el caso de las células ascíticas, aunque el antisuero policlonal presentó una reacción negativa, el anticuerpo monoclonal indicaba sin lugar a dudas la presencia en la ascitis de células con el antígeno Thy 1 en la membrana. Sin embargo, al probar estos dos antisueros frente a C3R cultivadas, la reacción fue persistentemente negativa (Vid. Tabla XII).

Algo parecido ocurrió con el suero BALB/c α MCG3 cuando lo enfrentamos a células C3R: las ascíticas eran reconocidas por el antisuero, pero no las cultivadas. Cuando

TABLA X

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 EN CELULAS TUMORALES C3R[(a)]
MEDIANTE ANTISUEROS POLIESPECIFICOS

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	34625±1666	-
Complemento	31430±1618	-
BALB/c ∝ CBA	29963±1918	(5%)
C57 ∝ B10BR	N.D.	N.D.
CBA ∝ BALB/c	266±24	(99%)
B10 ∝ B10D2	2839±120	(91%)
(BALB/c X CBA) ∝ C57BL/6	30782±2580	(2%)
(CBA X C57BL/6) ∝ BALB/c	166±10	(99%)
(BALB/c X C57BL/6) ∝ CBA	27974±295	(11%)
CBA ∝ C57BL/6	436±26	(98%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XI

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 EN CELULAS TUMORALES C3R[a]
MEDIANTE ANTISUEROS MONOESPECIFICOS

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	29512±627	-
Complemento	30835±763	-
D - 29	727±52	(97%)
D - 31	1107±82	(96%)
D - 13	1118±23	(96%)
D - 3	965±37	(97%)
D - 2	30491±2077	(1%)
D - 33	26526±2038	(14%)
D - 5	30345±1539	(2%)
D - 35	1879±115	(94%)
D - 36	3853±240	(87%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XII

DETECCION DE ANTIGENOS DE DIFERENCIACION EN CELULAS TUMORALES C3R

		CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células ascíticas	Células	32223±3103	-
	Complemento	34318±3012	-
	Thy-1.2	32697±1033	(5%)
	Thy-1.2 (monoclonal)	2345±212	(91%)
Células cultivad.	Células	27744±1563	-
	Complemento	27691±2212	-
	Thy-1.2	26540±1617	(4%)
	Thy-1.2 (monoclonal)	27730±1495	(0%)

absorbimos el antisuero BALB/c ∝ MCG3 con distintas concentraciones de células esplénicas de B10 y lo enfrentamos posteriormente con C3R ascíticas, la positividad de la reacción seguía manteniéndose, lo que sugería no sólo la presencia de células MCG3 en la ascitis, sino también que el antisuero reconocía un antígeno específico de MCG3 no presente en sus correlatos celulares normales (Vid. Tabla XIII).

VI.- CARACTERIZACION DE ANTIGENOS H-2 DE SUPERFICIE EN CELULAS MCG3

A.- CON ANTISUEROS POLIESPECIFICOS.

Células MCG3 del mismo clono que las empleadas en el protocolo de inoculación tumoral alogénica, fueron expandidas en cultivo y posteriormente enfrentadas a diversos antisueros poliespecíficos (Vid. Tabla XIV) para determinar los antígenos H-2 en su membrana.

Todos los antisueros anti$H\text{-}2^b$ presentaron reacciones claramente positivas, con porcentajes de inhibición en la captación de timidina superiores al 90%. Dos de los antisueros, BALB/c ∝ CBA ($\propto H\text{-}2^k$) y CBA ∝ BALB/c ($\propto H\text{-}2^d$), producían también un alto grado de inhibición, posiblemente, como en el caso de las células C3R, por reacción cruzada con $H\text{-}2^b$.

B.- CON ANTISUEROS MONOESPECIFICOS.

En esta ocasión, no se produjo ninguna reacción -

TABLA XIII

DETECCION DE ANTIGENOS DE MEMBRANA ESPECIFICOS DE TUMOR EN CELULAS TUMORALES C3R

		CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células ascíticas	Células	28337±856	-
	Complemento	25945±1232	-
	BALB/c ∝ MCG3	2150±208	(92%)
Células cultivadas	Células	25448±2340	-
	Complemento	25232±2469	-
	BALB/c ∝ MCG3	19758±1268	(22%)
Absorciones[a]	Células	31416±3106	-
	Complemento	31040±3014	-
	BALB/c ∝ MCG3[b]	14386±1313	(54%)
	BALB/c ∝ MCG3[c]	12297±985	(60%)
	BALB/c ∝ MCG3[d]	9252±627	(70%)

(a) Células ascíticas. BALB/c ∝ MCG3 absorbido con células de B10.

(b) Absorbido con $8x10^7$ cél. B10.

(c) Absorbido con $4x10^7$ cél. B10.

(d) Absorbido con $2x10^7$ cél. B10.

TABLA XIV

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 EN CELULAS TUMORALES MCG3[(a)] MEDIANTE ANTISUEROS POLIESPECIFICOS

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	36340±1045	-
Complemento	31736±1456	-
BALB/c ∝ CBA	2031±136	(94%)
C57 ∝ B10BR	31408±1020	(1%)
CBA ∝ BALB/c	231±11	(99%)
B10 ∝ B10D2	29797±2008	(6%)
(BALB/c X CBA) ∝ C57BL/6	245±4	(99%)
(CBA X C57BL/6) ∝ BALB/c	29883±1771	(6%)
CBA ∝ C57BL/6	72±2	(99%)

(a) Células cultivadas.

anómala, siendo únicamente positivos (grado de inhibición - en la captación de timidina superior al 50%) aquellos sue - ros dirigidos contra especificidades $H\text{-}2^b$ (Vid. Tabla XV).

C.- CON SUEROS ANTI-Ia.

En todos los casos las reacciones de los antisue- ros con células MCG3 fueron negativas, con medias de inhibi ción por debajo del 20% (Vid. Tabla XVI).

VII.- ANTIGENOS DE DIFERENCIACION EN CELULAS TUMORALES MCG3

Se trataba de comprobar la presencia del antígeno característico de la línea celular T murina Thy-1 y los re- sultados, tanto con un antisuero policlonal como con otro - de tipo monoclonal frente a esa especificidad, ofrecieron - en ambos casos inhibiciones por encima del 80%(Tabla XVII).

VIII.- ANTIGENOS ESPECIFICOS DE TUMOR EN MCG3

La incubación de células MCG3 con el antisuero - BALB/c $\propto$ MCG3, daba lugar a una inhibición prácticamente to tal de la captación de timidina, inhibición que seguía man- teniéndose casi al mismo nivel cuando el antisuero se absor bía con células normales de B10 (Tablas XVIII y XIX).

IX.- CARACTERIZACION DE ANTIGENOS H-2 DE SUPERFICIE EN CE - LULAS GRC3 (C3)

Tanto con los antisueros poliespecíficos como con

TABLA XV

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 EN CELULAS TUMORALES MCG3[(a)] MEDIANTE ANTISUEROS MONOESPECIFICOS

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	32842±952	-
Complemento	30665±1477	-
D - 4	28311±2374	(8%)
D - 31	22994±1135	(25%)
D - 2	759±68	(97%)
D - 33	361±27	(99%)
D - 35	3801±319	(88%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XVI

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 (Ia) EN CELULAS TUMORALES MCG3[(a)] MEDIANTE SUEROS ANTI-Ia

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	32842±952	-
Complemento	30665±1477	-
ATL ∝ ATH	25765±1539	(16%)
(ATH X D2) ∝ ATL	31419±1360	(0%)
(B10K X ATL) ∝ HTT	28573±1000	(7%)
(ATL X B10) ∝ ATH	29095±1292	(5%)
ATH ∝ ATL	25899±823	(15%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XVII

DETECCION DE ANTIGENOS DE DIFERENCIACION
EN CELULAS TUMORALES MCG3[a]

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	32976±2216	-
Complemento	40613±968	-
Thy-1.2	4251±382	(89%)
Thy-1.2 (monoclonal)	6247±605	(84%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XVIII

DETECCION DE ANTIGENOS ESPECIFICOS DE TUMOR EN CELULAS TUMORALES MCG3 (a)

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	34349±1207	-
Complemento	37369±2335	-
α MCG3 (BALB/c α MCG3)	209±15	(99%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XIX

DETECCION DE ANTIGENOS ESPECIFICOS DE TUMOR MCG3
MEDIANTE SUERO ANTI-MCG3 ABSORBIDO,
EN CELULAS TUMORALES MCG3(a)

	CPM : X±DS	% inhibición
Células	36481±2417	-
Complemento	38325±1436	-
∝ MCG3 (BALB/c ∝ MCG3)	2179±115	(94%)

(a) Células cultivadas.

los monoespecíficos frente a H-2^d, se produjeron reacciones positivas con índices de inhibición por encima del 80% y - del 60% respectivamente. Los antisueros monoespecíficos utilizados con estas células, solamente contenían especificidades privadas para H-2^d de BALB/c o H-2^b de C57BL/10 (Vid. - Tablas XX y XXI).

La detección de antígenos H-2 de clase II resultó negativa con todos los antisueros probados (Tabla XXII).

X.- ANTIGENOS DE DIFERENCIACION (Thy-1) Y ESPECIFICOS DE - TUMOR (BALB/c ∝ MCG3) EN CELULAS GRC3.

El antisuero anti-Thy 1 policlonal, así como el - monoclonal de la misma especificidad, rindieron resultados negativos (menos del 10% de inhibición) ante GRC3 (Vid. Tabla XXIII), siendo la reactividad prácticamente inexistente en el caso del antígeno específico de tumor MCG3, tanto si se utilizaba en forma original como absorbido (Tabla XXIV).

XI.- ANTIGENOS H-2 DE SUPERFICIE EN CELULAS GRA1 (A1)

Estas células se comportaron frente a los mismos sueros poliespecíficos y monoespecíficos antiH-2^b y anti - H-2^d de idéntico modo que sus homólogas GRC3 (Vid. Tablas - XXV y XXVI).

Las reacciones con antisueros frente a antígenos de clase II evidenciaron la ausencia en estas células de este tipo de antígenos (Tabla XXVII).

TABLA XX

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 EN CELULAS TUMORALES GRC3[(a)]
MEDIANTE ANTISUEROS POLIESPECIFICOS

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	81901±5256	-
Complemento	82760±3358	-
(CBA X C57BL/6) ∝ BALB/c	3268±300	(89%)
(BALB/c X CBA) ∝ C57BL/6	80379±5979	(3%)
CBA ∝ BALB/c	14483±660	(83%)

(a) Células cultivadas.

TABLA **XXI**

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 EN CELULAS TUMORALES GRC3[(a)]
MEDIANTE ANTISUEROS MONOESPECIFICOS

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	32850±4032	-
Complemento	87567±7341	-
D - 31	32432±2335	(63%)
D - 33	71332±4889	(18%)
D - 2	79295±1588	(9%)
D - 4	30641±1323	(65%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XXII

DETECCION DE Ag DE MEMBRANA H-2 (Ia) EN CELULAS TUMORALES GRC3[(a)] MEDIANTE SUEROS ANTI-Ia

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	82850±4032	-
Complemento	87567±7341	-
ATL ∝ ATH	73656±4536	(16%)
(ATH X D2) ∝ ATL	76354±3710	(13%)
(B10K X ATL) ∝ HTT	80251±5533	(8%)
(ATL X B10) ∝ ATH	77234±7115	(12%)
ATH ∝ ATL	90982±3968	(0%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XXIII

DETECCION DE ANTIGENOS DE DIFERENCIACION
EN CELULAS TUMORALES GRC3 (a)

	CPM : $\bar{X}$±DS	% inhibición
Células	86740±6287	-
Complemento	86489±3517	-
Thy-1.2	79156±5901	(8%)
Thy-1.2 (monoclonal)	84248±6239	(3%)

(a) Células cultivadas.

TABLA XXIV

DETECCION DE ANTIGENOS ESPECIFICOS DE TUMOR MCG3 MEDIANTE SUERO ANTI-MCG3 EN CELULAS TUMORALES A1 (a)

		CPM : $\bar{X} \pm DS$	% inhibición
Sin absorber	Células	87700±7630	-
	Complemento	83583±5587	-
	BALB/c ∝ MCG3	81279±5219	(3%)
Absorbido	Células	80262±1126	-
	Complemento	81389±3516	-
	BALB/c ∝ MCG3	83461±5324	(0%)

(a) Células cultivadas.