DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y CIENCIAS MORFOLOGICAS. FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY AND MORPHOLOGICAL SCIENCES. SCHOOL OF MEDICINE AND DENTISTRY
48940 Leioa. VIZCAYA. SPAIN

Tel. (34) 4-464 88 00 Ext. 2733
Fax (34) 4-464 89 66

Juan Arechaga Martinez, Catedratico de Biologia Celular de la Universidad del Pais Vasco,

CERTIFICA

que el proyecto de tesis doctoral titulado "Estudio del fenomeno de inhibicion de la proliferacion celular en linfocitos B normales y transformados" que presenta el licenciado Don Antonio Torres Montaner, ha sido realizado bajo mi direccion y considero que reune las condiciones necesarias para optar al titulo de Doctor en Medicina y Cirugia.

Y para que a instancias del interesado firmo en Leioa, Vizcaya, a 27 de Abril de 1991

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN Medicina

Curso de 19 90 a 19 91 Folio 119 vº Número 239

Reunido en el dia de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Antonio Torres Montalvo, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente habia elegido: "Estudio del fenómeno de inhibición de la proliferación celular en fibroblastos B normales y transformados".

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de APTO CUM LAUDE por unanimidad

Granada 5 de Julio de 19 91

El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE,

Fdo.: Guillermo SANCHEZ SALGADO

EL VOCAL

Fdo.: José René [illegible]

EL VOCAL,

Fdo: Mª Luisa de Pablos

EL VOCAL,

Fdo.: José M. Grana Lopez

~~EL VOCAL.~~
EL SECRETARIO

Fdo.: Pascual Vicente Crespo

FIRMA DEL GRADUANDO,

Antonio Torres

Esta tesis está dedicada a todas aquellas personas que la suerte juntó durante un curso en el Carmen de la Victoria, esos a quienes el murciano llama los históricos del Carmen, y especialmente a este último, esperando poder ofrecerle un testimonio de que el año vivido en la Victoria no fué un año vivido en la derrota. No olvido a algunas personas con las que he convivido más fugazmente en el Carmen, ni siquiera a la monja con quien no tuve ni un encuentro fugaz, quizás solo porque tuvo la delicadeza de no perturbar a un doctorando que se hallaba enfrascado en la realización de esta tesis. También a José Vidal, confidente de inquietudes científicas y a su esposa Maria Teresa.

Quiero expresar mi agradecimiento a los Departamentos de Bioquimica-Inmunologia, Anatomia Patológica y Medicina Nuclear de la Facultad de Medicina de Granada cuya cooperación desinteresada ha sido fundamental para la realización de esta tesis, así como al Dr. Garrido, jefe del Servicio de Inmunologia de la Residencia de la Seguridad Social de Granada.

También a otras personas que no menciono porque la lista seria muy larga, pero que no por ello debo un menor reconocimiento.

INDICE.

1.1 INTRODUCCION. 1

1.2 Supresión inespecifica por células T. 10

1.3 Supresión especifica de carrier. 14

1.4 Supresión de la respuesta a conjugados hapteno-carrier. 14

1.5 Supresión secundaria de la respuesta a conjugados hapteno-carrier. 15

1.6 Supresión alotipica. 17

1.7 Supresión idiotipica. 19

1.8 Supresión antígeno-especifica. 20

1.9 Factor supresor Ts1. 22

1.10 Restricciones genéticas del factor supresor inductor. 23

1.11 Células presentadoras de factor TsF1. 24

1.12 Factor supresor Ts2 y células Ts2. 26

1.13 Marcadores de Ts2F. 29

1.14 Restricción genética de Ts2F. 29

1.15 Célula presentadora de Ts2F y restricción genética de su función. 30

1.16 Caracterización de la célula presentadora. 32

1.17 Células Ts3. 32

1.18 Sensibilidad de Ts3 a ciclofosfamida. 34

1.19 Restricción genética de la interacción Ts2-Ts3. 35

1.20 Factor Ts3. 35

1.21 Caracterización bioquimica de Ts3F. 36

1.22 Restricciones genéticas de Ts3F. 36

1.23 Abilidad de Ts3F para mediar supresión inespecifica. 38

1.24 Sensibilidad a ciclofosfamida de la célula presentadora (de hapteno, acoplada a hapteno). 38

1.25 Precisiones sobre algunas irregularidades en el tipo de restricción genética de Ts3F. 39

1.26 Comentario sobre el papel de las diferentes células presentadoras de factor o presentadoras de antígeno y su influencia en el tipo de restricción genética. 39

1.27 Diferencias entre determinantes I-J. 40

1.28 Otras células del circuito supresor. 43

1.29 Supresión e idiotipos. 45

1.30 Macrófagos y supresión. 51

1.31 Células B supresoras. 54

1.32 Objetivos. 64

2. MATERIAL Y METODOS. 67

2.1 Técnica hapteno-gelatina para la separación de linfocitos B específicos de hapteno. 67

2.2 Determinación de células formadoras de anticuerpos por la técnica de la proteina A. 76

2.3 Autorradiografia. 79

2.4 Citometria de flujo. 82

2.5 Enriquecimiento de células B. 83

2.6 Depleción de macrófagos. 84

2.7 Animales y lineas celulares. 84

2.8 Condiciones de cultivo. 85

2.9 Mitógenos. 85

2.10 Irradiación de células. 86

2.11 Estadistica. 86

RESULTADOS. 87

1ª parte.

3.1 Efecto supresor de células preincubadas e irradiadas. 87

3.2 Efecto supresor de células no irradiadas. 90

3.3 Efecto de células no respondedoras a LPS. 91

3.4 Periodo de preincubación necesario para conferir abilidad supresora. 93

3.5 Implicación de células supresoras B inducidas por LPS en inhibición dependiente de densidad de proliferación inducida por LPS. 94

2ª parte.

4.1 Análisis del fenómeno de inhibición dependiente de densidad en cultivos estimulados por LPS. 96

4.2 El aumento relativo de proliferación a densidades bajas es debido a un mayor número de ciclos proliferativos. 97

4.3 Mecanismos inespecíficos de supresión que es necesario descartar. 99

4.4 Corolario: verificación de algunas de las hipótesis propuestas sobre el mecanismo de acción de las células B supresoras. 113

3ª parte.

5.1 Supresión de proliferación mediada por células de tumores linfoides de estirpe B. 115

5.2 Acción supresora de células tumorales sobre la población esplénica normal. 116

5.3 Acción de células tumorales irradiadas sobre el crecimiento de la propia población tumoral. 117

5.4 Comparación de la inducción de inhibición en la propia población tumoral y en la población esplénica normal. 117

5.5 Influencia del consumo de nutrientes en el crecimiento tumoral in vitro. 119

6. DISCUSION. 123

7. CONCLUSIONES. 139

ABREVIATURAS.

PBS = Solución salina tamponada con fosfato. BSS = Solución salina balanceada. TNP = trinitrofenilo. DNP = dinitrofenilo. NP = 4-hidroxi-3-nitrofenil-acetil. DNP-KLH = conjugado DNP con la proteina hemocianina de lapa. HGG = gammaglobulina humana. BGG = gammaglobulina bovina. aHGG = gammaglobulina humana agregada. dHGG = HGG deagregada. HRC = glóbulos rojos de caballo. SRBC = glóbulos rojos de cordero. CS = reacción de hipersensibilidad cutánea. Th = célula T ayudadora (helper). Ts = célula T supresora. TcR = receptor de la célula T. Vα = región variable de cadena alfa del receptor de la célula T. Vβ = región variable cadena beta del TcR. TGF = factor T de crecimiento o "transforming growth factor". TRF = factor sustitutorio de células T o "T cell replacing factor". IL = interleucina. MLR = reacción de cultivo linfocitario mixto. MHC,CMH = complejo mayor de histocompatibilidad. H-2 = la región del complejo mayor de histocompatibilidad del ratón, equivalente al HLA en humanos. Thy1.1, Thy1.2 = alelos en ratón del antígeno theta de la célula T. CY = ciclofosfamida. APC = célula presentadora de antígeno. FPC = célula presentadora de factor. PHA = fitohemaglutinina (mitógeno de la célula T). Con A = concanavalina A. LPS = lipopolisacárido de Escherichia Coli. SCA = estafilococus aureus cepa A Cowan. PGE2 = prostaglandina E2. MI = mononucleosis infecciosa. Células NK

= células "natural killers". DTH = hipersensibilidad de tipo retardado. Igh = locus para genes de inmunoglobulinas. PFC = células formadoras de placas (células secretoras de anticuerpos detectables por halo de hemólisis. EBV = virus de Epstein-Bar.

INTRODUCCION

1.1 Aunque los inmunólogos tienden a considerar el sistema inmune como un campo autónomo dentro de la biología es posible que la regulación del crecimiento celular en este sistema no se lleve a cabo de manera muy diferente a otros tejidos o sistemas del organismo. También es posible que el sistema inmune haya tenido que desarrollar mecanismos reguladores mucho más complejos que otros sistemas dada la extraordinaria riqueza de sus unidades celulares dotadas de receptores individualizados preformados que las capacitan para responder a un número practicamente ilimitado de posibles antígenos. Esas respuestas parece que deberian, por tanto, ser reguladas también a un nivel clonal, de ahí la complejidad del problema de la inmunoregulación, problema que si por un lado atañe al control del crecimiento celular en general, por otro enfrenta las peculiaridades del sistema inmune que parecen demandar soluciones con un mayor nivel de sofisticación.

Quizás por esto, se tiende a considerar el tema de la inmunoregulación de manera aislada y desconectada de la regulación del crecimiento celular en general, ya que se

parte de la idea de la posición especialisima que tiene el sistema inmune en el organismo y sobre todo de su extraordinaria complejidad solo superada por el sistema nervioso. Por ello, quizás, tan solo en el sistema inmune se ha concebido la existencia de un compartimento celular separado con la misión específica de controlar el crecimiento de las otras células de este sistema.

Pese a los grandes esfuerzos invertidos en el tema de la inmunoregulación, es ésta todavia una de las areas más confusas de la inmunologia. Así, aunque se cumplen 21 años del descubrimiento de las células supresoras por Gherson y Kondo (1) y a pesar de que se ha atribuido a estas células la responsabilidad de casi todos los fenómenos de regulación o desregulación observados, tanto en el campo experimental como en la patología humana, se ha manifestado en los últimos años una corriente de escepticismo que ha puesto en cuestión, no al fenómeno regulatorio en sí, pero sí la existencia de células supresoras como una subpoblación independiente. Portavoz destacado de esta corriente ha sido el profesor G. Möller quien en una controvertida editorial del Scandinavian Journal of Immunology (2) ha sintetizado las inconsistencias más importantes del concepto corrientemente aceptado de una subpoblación supresora independiente.

Las objeciones aducidas por G. Möller se refieren a los siguientes puntos a los que se ha llamado los cinco "no" de

la supresión. Al abordar estos puntos vamos a aportar también el punto de vista de autores que han contraatacado los argumentos de G. Möller con lo que tendremos una visión de los términos en que esta polémica se está desarrollando. Después de esto, procuraremos describir someramente los diferentes aspectos del fenómeno supresor en inmunología. Esos puntos conflictivos, objeto de debate son los siguientes:

1/ No se conocen marcadores específicos de células supresoras.

Esta crítica de G. Möller continúa siendo válida. Las células T pueden ser $CD4^+$ o $CD8^+$ (o en el ratón Lyt1, aunque actualmente se usa más el marcador equivalente L3T4, y Lyt2) marcadores de células "helper" y citotóxicas/supresoras, respectivamente. Las CD4, a su vez, se dividen en Th1 y Th2. Las primeras producen IL-2 y gamma-interferón. Las segundas producen IL-4. Como veremos se ha considerado que las supresoras inductoras son $CD4^+$ y las efectoras $CD8^+$ pero hay numerosos ejemplos de circuitos supresores que implican solamente a una célula CD4 o incluso $CD4^-$ $CD8^-$ (3). Además, como vemos, CD8 es compartido por supresoras y citotóxicas.

2/ Intimamente ligado a la crítica anterior está la rareza de clones de células supresoras. Tada et al (4) refieren en el Forum sobre supresoras organizado por el Instituto Pasteur haber generado varios clones de células "helper", todas ellas

L3T4 y Lyt2$^-$ mediante estimulación con antígeno + células presentadoras de antígeno y propagación con IL-2. Algunos de estos clones tenian actividad supresora en lugar de helper. Estos clones solamente producian gamma-interferón pero éste no daba cuenta de su actividad supresora. La supresión se ejercía sobre otros clones T "helper" y estaba restringida por H-2.

También refieren haber obtenido clones CD8$^+$ con actividad supresora y sin actividad citotóxica. Uno de ellos produce un factor supresor específico de antígeno.

A despecho de las afirmaciones anteriores no cesan las contradicciones en el campo de la supresión. Así, otros participantes (3) en el aludido Forum del Pasteur reconocen haber pasado tres años sin conseguir generar clones supresores, habiendo finalmente obtenido un clon específico anti-HGG (gammaglobulina humana). Este clon, que es CD4+ y dependiente de IL-2, tiene una acción bivalente: "helper" cuando es transferido a baja densidad celular, y supresor inductor in vivo a alta densidad.

Para explicar esto, esos autores recurren a la hipótesis de que las células supresoras deben suprimirse entre sí por encima de una densidad crítica, de donde resulta la dificultad de su clonación in vitro. Aquí encontramos suscitado un punto, el de la densidad ligada al efecto supresor, que vamos a tratar en esta tesis.

Un efecto ambivalente, también dependiente de densidad, ha sido descrito por Loblay y Basten (5). Encontraron que al transferir a un animal irradiado números progresivamente crecientes de células primadas a carrier (donantes primados a carrier HGG y además primados a HRC) junto con un número fijo de células primadas a hapteno (donantes primados a DNP-KLH), había una progresiva reducción en el número de células formadoras de placas (PFC) anti-hapteno (testando con DNP-HGG). La inhibición era antígeno-específica ya que la respuesta a HRC no estaba inhibida. Explicaciones triviales como que las células B fueran limitantes fueron excluidas ya que aumentando éstas no se modificaba el efecto. Al atribuir dicho efecto a células supresoras, los autores razonan que existiendo en la población primada a HGG células "helper" y células supresoras para este carrier, el efecto de éstas últimas es dependiente del número absoluto de ellas, más que de la proporción entre células "helper" y supresoras. Ahora bién, lo paradójico es que el donante, teniendo muchas más células supresoras que las que fueron transferidas al animal irradiado, sea capaz de montar una respuesta a HGG (adviertase que también responde a HRC) (como se verá más adelante en nuestros experimentos con células B supresoras también demostramos que el efecto supresor es dependiente del número absoluto de células).

Los autores no pueden explicar esta paradoja, que en

cualquier caso remite a puntos de vista opuestos al concepto de células supresoras como subpoblación única, reminiscentes de la antigua idea de que la supresión podia resultar de "demasiada ayuda" (6,7).

3/Ausencia de recombinación del receptor T en células supresoras.

En el estudio de factores supresores específicos de antígeno se usaron hibridomas para producir grandes cantidades de esos factores. Cuando los genes del receptor T de éstos fueron analizados se encontró que, contrariamente a lineas T "helper", no tenían el gen recombinado (8). Esta es otra de las grandes paradojas que acechan el tema de la supresión. Posteriormente han aparecido descripciones de gen TcR recombinado en lineas T supresoras (9,10). En cualquier caso, puesto que esta recombinación no es universal, puede pensarse que no tiene ninguna importancia para la función supresora. Algunos autores (11) arguyen frente a esto que los hibridomas supresores suelen mantenerse en cultivos por periodos largos por lo que solo un pequeño tanto por ciento de las células siguen produciendo TsF y éstas son las que expresan el rceptor. Weiner (12) ha demostrado esto pero de nuevo la particularidad del caso no permite superar la critica de Möller.

De todas formas, se ha visto que factores de una serie de hibridomas se unian a anticuerpos contra el receptor T (13).

La cadena capaz de unir antígeno reaccionaba con un anticuerpo anti-cadena alfa, mientras que la que no une antígeno se une a anticuerpos anti-cadena beta. Green y Zheng (11) han obtenido un hibridoma de fenotipo T "helper" con actividad supresora inductora específica para un polipeptido sintético. Los péptidos capaces de estimular células T via TcR eran también dianas del factor supresor. Este factor llevaba determinantes del TcR. Por otra parte demostraron que se podia impedir la traducción de cadenas TcR con oligonucleotidos antisentido correspondientes a Vα TcR pero no a Vβ TcR. Esto es sugestivo de que Vα tenga un papel en la codificación de moléculas reguladoras antígeno-específicas, es decir, factores Ts. Puesto que la estructura quimica de estos factores es distinta de TcR, el producto de este gen podria ser alterado a nivel de RNA o proteina. De este modo, aunque TcR tiene afinidad por antígeno en combinación con productos de MHC, algunas moléculas TcR (es decir, TsF) podrian reconocer al antígeno solo y estas serian las que formarian los factores reguladores.

Hay que subrayar, sin embargo, que este estudio se ha realizado en un hibridoma supresor inductor de fenotipo T "helper" y alguno de los participantes en el mencionado Forum sobre supresoras sostiene que T_h no pueden ser inductoras de T_s ya que T_s tiene un umbral de activación más bajo que T_h (14).Esto enfatiza la necesidad de estudiar mejor las

posibles diferencias en activación de T_s y T_h.

En esta última linea es muy importante el trabajo de Krzych et al (15) con la proteina betagalactosidasa de E.Coli. Partiendo la molécula en fragmentos peptídicos demuestran que existen peptidos que estimulan supresión (o células supresoras) mientras otros estimulan ayuda (o células "helper"), distinguiendo por tanto determinantes inductores de supresión y determinantes inductores de ayuda. Existen fragmentos peptídicos que estimulan a la vez células supresoras y helper, postulándose que solamente cuando un fragmento peptídico contiene una combinación de epitopos para reconocimiento por T_h, T_s y B dará origen a un efecto regulador.

4/El enigma I-J.

Algunos investigadores (16,17) creyeron haber encontrado en el antígeno I-J un marcador específico de células supresoras T y de factores supresores. El gen correspondiente fué mapeado con los métodos de la genética clásica en región MHC. Se produjo, por tanto, un gran revuelo cuando los métodos de hibridación molecular demostraron que no existía tal gen en la región MHC (18). También se vió, posteriormente, que los antígenos I-J son expresados en diferentes tipos celulares, tales como T "helper", células adherentes no T no B y algunas células NK (19,20).

Se han realizado investigaciones para conciliar esos

contradictorios hallazgos, de las que parece deducirse que I-J está involucrado en el reconocimiento de moléculas propias para la cooperación celular mediada por células T. Anticuerpos monoclonales anti-I-J^k inhibian la reacción de cultivo linfocitario mixto singeneico y alogénico cuando las células T respondedoras (pero no las estimuladoras) son tratadas con el anticuerpo (21). Anticuerpos anti-I-J pueden inhibir la respuesta proliferativa inducida por antígeno y la función "helper" (22).

La expresión de estas moléculas adopta un patrón muy complejo, estando influida no solo por genes H-2 sino también por genes de fondo, resultando al parecer en el reconocimiento de Ia asociado a productos de IgV_h. Como todos los genes que participan en el reconocimiento de lo propio éste tiene una gran plasticidad, dependiendo su expresión del ambiente tímico encontrado en la ontogénesis. Esto quizás explica que aparezca ligado a región H-2 aunque no se halle fisicamente en esa región (21).

5/No se han identificado genes que codifiquen para factores supresores antígeno-específicos.

A este argumento, los defensores del punto de vista tradicional sobre las supresoras oponen un razonamiento circular, a saber, cuando estos genes sean descubiertos este argumento será superfluo.

A continuación vamos a describir los principales aspectos de la fenomenologia de la supresión.

1.2 SUPRESION INESPECIFICA POR CELULAS T.

Células T supresoras pueden ser activadas policlonalmente por diversos medios: mitógenos T como concanavalina A (23), fitohemaglutinina (24), reacción de cultivo linfocitario mixto (25), o incluso se ha descrito que se generan tras simple cultivo in vitro (26).

Estas células inhiben la respuesta a mitógenos, antígenos o la reacción de cultivo linfocitario mixto de manera no restringida por MHC, excepto quizás las generadas por cultivo linfocitario mixto (27).

Knab y Jeannet (28) estudiaron supresión inducida por Con A utilizando un tiempo corto (16 horas) de incubación in vitro en presencia de ConA y transferencia a cultivos que eran estimulados de nuevo con ConA. Este diseño experimental es similar al que nosotros hemos utilizado en algunos experimentos en un sistema B existiendo también ciertas semejanzas en los resultados. En su caso, las células preincubadas sin ConA potencian la respuesta lo que no ocurre en nuestros experimentos empleando estimulación con LPS. Sin embargo, hay que señalar que cuando se compara esta potenciación a la causada por células frescas (no

preincubadas) se observa de hecho una respuesta disminuida en los cultivos conteniendo células preincubadas lo que es similar a lo observado por nosotros. En concordancia también con nuestros resultados está su observación de que el efecto supresor es resistente a irradiación.

Un resultado colateral de este trabajo es que la respuesta de las células no aumenta por el simple hecho de ser preincubadas como habian comunicado Bresnihan y Jasin (29) y que les llevó a postular la existencia de células supresoras de vida corta. Esta contradicción podria deberse simplemente al tiempo de preincubación, quizás excesivamente corto para detectar este efecto.

Podemos clasificar también dentro de este apartado la supresión lograda a través de la activación de células T autoreactivas. Con el método estandar de estimulación con antígeno y células presentadoras y propagación en IL-2 usado para generar clones "helper", aparecen ocasionalmente clones que se mantienen por simple estimulación con células singeneicas irradiadas y por tanto son autoreactivos. Uno de estos clonos es MS202 (30). Este clon tiene una intensa actividad estimulatoria para células B y T singeneicas en ausencia de antígeno. No presenta, en cambio, capacidad para estimular a células B o T alogénicas. Su fenotipo es L3T4, $Ly2^-$, $I\text{-}J^k$, y su elemento de restricción es $I\text{-}A^k$. La inyección intraperitoneal de 10^7 células de este clono junto con

antigeno suprimia la respuesta primaria y secundaria a este antígeno o a otros antígenos distintos. Se vió que el mecanismo de supresión era a través de la inducción de células supresoras ya que las células esplénicas obtenidas de los animales así tratados transferidas a otros cultivos tenían efecto supresor inespecífico pero restringido por MHC. La supresión es mediada por células T, $Ly1^+$, L3T4, $Ly2^-$, negativas para alelos Ia^k e $I\text{-}J^k$. Cuando células Ts inducidas por MS202 en F1 se añaden a células parentales B (C3H o B6) primadas a DNP y a células "helper" F1 primadas a carrier (KLH) se suprime la respuesta de las células B de C3H (MS202 fué inducido en C3H) pero no la respuesta de B6. Por supuesto, las células "helper" F1 colaboran satisfactoriamente con cualquiera de las B parentales.
Cuando se usan T "helper" primadas a carrier (KLH) obtenidas de quimeras F1->C3H y F1->B6 y son cocultivadas con células B F1 primadas a DNP las "helper" quiméricas colaboran igualmente bién con células B que codominantemente expresan ambos alelos de clase II parentales. Cuando a esta mezcla se añade Ts de F1 se suprime la respuesta de F1 B + T "helper" restringida por $H\text{-}2^k$ procedente de F1 C3H mientras Ts son incapaces de suprimir la respuesta inducida por T "helper" de la quimera F1 B6. Esto demuestra que la célula diana de la supresión es la célula T "helper" restringida por MHC (30). Este es uno de los circuitos supresores más simples descritos

hasta la fecha. No sabemos si las células supresoras inducidas por MS202 son asimismo autoreactivas. Con todo no es ineludible la necesidad de postular una célula supresora independiente para explicar estos resultados. En efecto, podria ocurrir que la activación adicional proporcionada por nuevas células activadas añadidas al cultivo generara una señal negativa (este efecto seria particularmente vigoroso si esas células "supresoras" añadidas fueran también autoreactivas con lo que darian lugar a una especie de respuesta secundaria al ser transferidas). Un mecanismo de este tipo seria posible si las señales "helper" quedaran rápidamente saturadas mientras las supresoras, tal vez generadas por las propias células "helper" actuaran en proporción directa al número absoluto de células y el factor supresor tuviera un efecto acumulativo. En otras palabras si en las células T existiera un mecanismo supresor dependiente de densidad análogo al que hemos demostrado en esta tesis para células B. Hay que puntualizar, de todas formas, que para que una hipótesis como esta última diera razón de la restricción H-2 de este tipo de supresión deberia cumplirse el requisito de que las células transferidas fueran autoreactivas gracias a lo cual experimentarian al ser añadidas al cultivo una activación adicional que resultaria en supresión. De este modo la supresión dependeria del reconocimiento de productos H-2.

1.3 SUPRESION ESPECIFICA DE "CARRIER".

El efecto "carrier" se caracteriza porque los animales primados con un conjugado hapteno-carrier, p. ej. DNP-BGG darán una respuesta secundaria al hapteno si son reestimulados con el mismo conjugado hapteno-carrier pero no si son reestimulados con el mismo hapteno en un "carrier" diferente. Cuando se estudia el efecto "carrier" en un sistema adoptivo, esto es, un animal irradiado (usado como tubo de ensayo) al que se transfieren células primadas a hapteno y células primadas a carrier separadamente, se comprueba que el efecto "carrier" puede ser soslayado. El animal puede montar una respuesta al hapteno administrado en un "carrier" diferente, siempre que se transfieran células primadas a este "carrier" a ese animal además de las células primadas a hapteno.

1.4 SUPRESION DE LA RESPUESTA A CONJUGADO HAPTENO-CARRIER.

Loblay et al (31) transfirieron células de ratones primados separadamente a HGG y a DNP-KLH a recipientes singeneicos irradiados ($5x10^6$ células de cada tipo) Estos fueron inmunizados con DNP-HGG y, de acuerdo con las reglas del efecto carrier, se produce una respuesta anti-DNP que se midió 7 dias más tarde en células esplénicas.

El grupo de ratones así tratados sirvió de grupo control. En otro grupo, los recipientes irradiados recibieron además de las células primadas a DNP-KLH y a HGG (separadamente), células de ratones que habian sido inmunizados 7-14 dias antes con HGG precipitada con alúmina y gérmenes bordetella pertusis ($2x10^9$). El número de células de este tipo transferidas fué $25x10^6$. En este último grupo se observó una supresión de la respuesta a DNP del 80%. La supresión es mediada por células T y es específica de "carrier". Estos investigadores concluyeron que células T supresoras fueron generadas en paralelo con células T "helper".

1.5 SUPRESION SECUNDARIA DE LA RESPUESTA A CONJUGADO HAPTENO-CARRIER

Los animales inmunizados con HGG precipitada con alúmina y bordetella pertusis recibieron 4 ó más semanas después HGG deagregada intraperitoneal (previamente habian demostrado que en esta forma HGG induce preferentemente células supresoras). Cuando se transfieren células de animales así tratados a animales preparados según las condiciones del experimento anterior (recipientes que reciben células primadas a hapteno y células primadas a carrier), la

supresión es mayor y más rápida que la causada por transferencia de células esplénicas de animales que habian sido tratados únicamente con HGG precipitada con alúmina. Es decir, la supresión tiene las caracteristicas de una respuesta secundaria. Según esos autores este experimento demuestra la existencia de células de memoria supresoras.

En este último experimento, se usan para transferir a controles células primadas a carrier de animales que solamente reciben la segunda inyección inmunizante, es decir, HGG deagregada intraperitoneal 3 dias antes de transferencia. El grupo control está formado por animales irradiados que reciben, aparte de las células primadas a hapteno y de las células primadas a carrier ($5x10^6$ células primadas a DNP y $5x10^6$ células primadas a HGG), números progresivamente crecientes de células de animales inyectados con dHGG 3 dias antes y otro grupo recibe todo lo anterior excepto que estas últimas células transferidas lo son de animales tratados con aHGG y 4 ó más semanas después con dHGG. En estos últimos se observa, como hemos dicho, supresión con las caracteristicas de una respuesta secundaria. Curiosamente, en los controles empieza a aparecer supresión también tal como se va aumentando el número de células (de animales tratados con dHGG transferidas).

Este hecho puede verse retrospectivamente como ejemplo de una de las paradojas observadas en la fenomenologia de la

supresión, a saber, que en una población que, presumiblemente, contiene células "helper" y células supresoras, los efectos supresores se hacen predominantes cuando la concentración celular aumenta.

Los mismos autores ofrecieron, posteriormente (5), un ejemplo más claro, de esta paradoja. Animales irradiados fueron inyectados con $5x10^6$ células esplénicas primadas a DNP-KLH junto con números crecientes de células de animales primados a HGG que habian sido primados también a HRC. Los animales irradiados fueron entonces inmunizados con DNP-HGG, midiéndose la respuesta 7 dias más tarde. Se vió que la respuesta anti-DNP era progresivamente inhibida al aumentar el número de células primadas a carrier transferidas mientras que la respuesta a HRC alcanzaba un tope máximo y se estabilizaba. El efecto era, pues, antígeno-específico. De nuevo encontramos un efecto supresor dependiente de densidad y/o exceso de ayuda ya que las numerosas células "helper" especificas de HGG deberán agruparse junto a las células B anti-DNP. Loblay y Basten se ven forzados a admitir que dado que el cociente "helper":supresoras en la población carrier-específica transferida debe mantenerse constante, la supresión depende del número absoluto de células supresoras transferidas y no en la relación "helper"-supresoras.

1.6 SUPRESION ALOTIPICA E IDIOTIPICA.

Cuando un ratón F1 recién nacido es inyectado con anticuerpo contra inmunoglobulina de uno de los tipos parentales, la producción de ese tipo de inmunoglobulinas se suprime y persiste suprimida hasta la edad adulta (32).

Si células esplénicas de ratones F1 normales y F1 suprimidos son conjuntamente inyectadas en un recipiente irradiado se producirá supresión alotípica lo que demuestra que la población suprimida impide a la población normal la expresión de uno de los alotipos. El grupo de Herzenberg demostró que la supresión alotipica estaba mediada por células T (33).

Benaroch y Bordenave (34) han conseguido inducir supresión alotipica por medio de células T con actividad anti-alotípica. La educación de las células T se realizó por inyección i.v. de linfocitos autólogos recubiertos con alotipo. También se ha conseguido inyectando ratones hibridos formados por cruce de cepas Igh congénicas con células T de una de las cepas parentales. Ratones recién nacidos $Igh^{a/b}$ recibieron células T de Balb\c o BC8, ambos Igh^{a}, produciendose supresión de $IgG2a^{b}$ en una cierta proporción de ratones. Si los donantes de células T eran sensibilizados previamente con esplenocitos singeneicos acoplados a $IgG2a^{b}$ o con células B de una cepa Igh^{b}, entonces se producia supresión alotípica en el 100% de los casos. También era posible producirla por este procedimiento en ratones $Igh^{b/b}$.

Se vió que dos células T eran necesarias, con fenotipos CD4+ CD8- y CD4- CD8+ (35). La supresión puede ser revertida por tratamiento con un monoclonal de rata anti-CD8, lo que demuestra: 1/ que los linfocitos de fenotipo CD8+ son esenciales para mantener la supresión y 2/ que la supresión no se debe a delección clonal de células B productoras de $IgG2a^b$. Tras la cancelación de la supresión, llama la atención el alto nivel subsecuente de $IgG2a^b$ (alrededor de 0,5 mg/ml de suero).

Al contrario que en muchos otros tipos de supresión, la inhibición de producción de $IgG2a^b$ es completa. No se ha conseguido producir similar supresión de otros isotipos como IgM^b, $IgG2b^b$ o IgA^b, lo que es sorprendente sobre todo en el caso de $IgG2b^b$ ya que hay gran homologia entre los genes correspondientes a $IgG2a^b$ e $IgG2b^b$. En este sistema no se sabe si las células que mantienen la supresión son originales del donante o del recipiente. Por último, existe la posibilidad, dada la exclusividad del fenómeno, circunscrito a IgG2a que se trate de una reacción fortuita, resultante de reacción cruzada con una función T desconocida.

1.7 SUPRESION IDIOTIPICA.

Un animal puede ser tratado con un anticuerpo anti-idiotipo a raiz de lo cual cuando ese animal haga una respuesta contra

un antígeno determinado, los anticuerpos correspondientes a ese antigeno portadores del idiotipo en cuestión estarán ausentes. Este fenómeno está mediado también por células T supresoras.

1.8 SUPRESION ANTIGENO-ESPECIFICA.

En el sistema NP, Weinberger et al demostraron por primera vez la existencia de dos poblaciones de células T supresoras que aparecian tras inmunización por via i.v. con células singeneicas acopladas al hapteno NP. Tres dias antes de esta inyección los animales eran pretratados con ciclofosfamida. Siete dias después de dicha inmunización ambas poblaciones coexisten en el bazo de los animales inmunizados. Para ponerlas de manifiesto, los esplenocitos eran transferidos a recipientes "naive" que, a continuación eran inmunizados con NP-BCG en CFA. Seis dias después se media respuesta de sensibilidad cutánea (SC) de estos animales tras inyección de NP-BSA en PBS. La inhibición causada por la transferencia de células esplénicas tolerizadas (asi se llaman también las de los animales que han sufrido el procedimiento descrito conducente a la aparición de actividad supresora) se detecta al comparar la respuesta CS de estos animales con la de aquellos que han recibido células esplénicas procedentes de animales a los que no se inyectó NP acoplado a células

singeneicas.

Este protocolo detecta lo que se conoce como supresión de fase inductora, ya que las células supresoras son transferidas antes de "primar". El protocolo para detección de fase efectora es idéntico excepto que las células tolerizadas son transferidas 6 dias más tarde, inmediatamente antes de la segunda inyección de NP (antigen-challenge).

Se observó que las células responsables de la supresión eran células T y que habia dos subpoblaciones que actuaban en cada una de estas fases. La Ts1 o Ts_1, así llamada por actuar en fase inductora, adhería a placas de plastico recubiertas de antígeno NP. La Ts2 o Ts_2 actúa en fase efectora y adhiere a placas recubiertas de idiotipo, es decir, es antiidiotipica.

La administración de ciclofosfamida (20 mg/kg) antes de la inyección de células acopladas a hapteno impide la aparición de actividad supresora en bazo. La inyección aislada de células Ts1 no incita por si sola la formación de células Ts_2. Sin embargo se observa aparición de actividad supresora efectora cuando se dan células Ts_1 junto a celulas singeneicas-NP. Weinberger et al(36) deducen de este hecho que en presencia de células singeneicas-NP, la población Ts1 induce a una célula resistente a ciclofosfamida a madurar y manifestar actividad supresora efectora. De esta forma empezó a establecerse la existencia de interacciones secuenciales en el mecanismo de supresión, lo que se conoce como circuito

supresor.

1.9 FACTOR SUPRESOR TS1 (TsF1). SU CAPACIDAD DE INDUCCION DE CELULAS TS2.

El grupo anteriormente citado ha preparado (37) hibridomas T monoclonales correspondientes a las distintas poblaciones supresoras. El hibridoma B6-29, procedente de la cepa C57Bl/6 ($H\text{-}2^b$, Igh^b) y los hibridomas CKB-17 y CKB-39, procedentes de CKB ($H\text{-}2^k$, Igh^b) fueron preparados hibridando células NP-especificas de dichas cepas con células tumorales BW5147. Los sobrenadantes de estos hibridomas fueron inyectados i.v.(0,3-0,4ml) durante 4 dias a animales primados con NP-O-Su. 6 dias después se les inoculó NP-O-Su por via subcutánea y se midió respuesta CS. Los animales control recibieron sobrenadante de BW5147. Se demostró que los sobrenadantes de estos hibridomas son capaces de suprimir la respuesta CS cuando se dan en fase inductora. La actividad supresora era absorbida por columnas anti-idiotipo, anti-IJ y por antigeno NP. La absorción era especifica ya que columnas anti-IJ^b absorbian factor procedente de B6 mientras que columnas anti-IJ^k absorbian factores derivados de CKB. Cuando los factores se daban en fase efectora (el dia de "challenge" con antigeno o un dia antes) no habia supresión.

Por otra parte, si se transferian células esplénicas de animales primados a NP que habian recibido los sobrenadantes

a animales primados 6 dias antes que a continuación eran de nuevo inoculados con NP para provocar respuesta CS, se obtenía inhibición de esta respuesta. Esta inhibición, producida en fase efectora, demostraba que los sobrenadantes habian inducido células supresoras efectoras Ts2.0 (37). Paralelamente, el factor TsF1 puede generar células Ts, cuando se da al comienzo de un cultivo in vitro a células esplénicas estimuladas con NP-carrier.

1.10 RESTRICCIONES GENETICAS DEL FACTOR SUPRESOR INDUCTOR TsF1.

El uso de factores permite estudiar restricciones genéticas en el circuito supresor que son imposibles de determinar usando células a causa del efecto alogénico superpuesto.

Los sobrenadantes o factores TsF1 inducian supresión en animales singeneicos con la cepa de la que deriva el factor o bien en animales incompatibles en región H-2 pero compatibles en región Igh. Así, B6-29 TsF1 derivado de B6 ($H\text{-}2^b$,Igh^b) suprime a B6 o a B10.BR ($H\text{-}2^k$,Igh^b) mientras CKB-17 y CKB-39 derivados de CKB ($H\text{-}2^k$,Igh^b) suprimen a CKB y B10.BR pero no al Igh congénico C3H ($H\text{-}2^k$,Igh^j) (38). Otros experimentos permitieron delimitar la necesidad de homologia Igh a la región Igh-V (38).

Se vió que la aparente restricción por Igh de la función de TsF1 era una restricción pseudogenética ya que este factor podia funcionar en recipientes incompatibles en Igh generando

células $Ts_{\bullet}$. Sin embargo, para observar la actividad supresora de las células $Ts_{\bullet}$ éstas deben ser transferidas de nuevo a una cepa compatible en Igh con la cepa que produjo el factor. Así, sobrenadantes de CKB-17 y CKB-39 dados a Igh-incompatible pero H-2 compatible C3H ($H\text{-}2^{k}$,Igh^{j}) fallan en suprimir la respuesta, pero cuando esplenocitos de C3H que han recibido estos sobrenadantes son transferidos a recipientes CKB ($H\text{-}2^{k}$,Igh^{b}) o B10.BR ($H\text{-}2^{k}$,Igh^{b}) durante fase efectora, se produce supresión. No ocurre, sin embargo, supresión cuando son transferidos a ratones singeneicos C3H. La restricción pseudogenética parece reflejar un requisito de homologia entre células supresoras de 2° orden, portadoras de receptores anti-idiotipicos y otra población Ts3 que funciona más tarde en el circuito supresor. La interacción entre $Ts_{\bullet}$ y Ts3 no solamente está restringida por Igh como reflejan los anteriores experimentos sino también por H-2. Así, las células $Ts_{\bullet}$ inducidas en C3H ($H\text{-}2^{k}$,Igh^{j}) no funcionan al ser transferidas a B6 o CWB ($H\text{-}2^{b}$,Igh^{b}). Además, cuando CKB-17 o CKB-39 fueron dados a C57Bl/6 ($H\text{-}2^{b}$,Igh^{b}) para generar células $Ts_{\bullet}$, la actividad supresora solo se observó cuando las células $Ts_{\bullet}$ fueron transferidas a H-2 e Igh-compatible C57Bl/6. (38)

1.11 CELULAS PRESENTADORAS DE FACTOR TsF1.

Los experimentos anteriores indican que la restricción Igh

está determinada por el genotipo Igh del donante de TsF1 lo que sugiere que las células Ts2 son específicas para determinantes de la región de unión al antígeno de tipo idiotipico controlados por Igh y presentes en TsF1 mientras que la restricción H-2 de la célula Ts2 está determinada por el genotipo del huesped (recipiente), no por el donante de TsF1. Esto condujo a la hipótesis, confirmada más tarde, de que la restricción H-2 de Ts2 es debida a que las células del huesped o recipiente de factor TsF1 son las que presentan dicho factor.

Los siguientes experimentos (39) confirman esta hipótesis: TsF1 de origen en CKB ($H\text{-}2^k$) soluble o pulsado en células presentadoras fué inyectado en (B6xC3H)F1 ($H\text{-}2^b/H\text{-}2^k$). Las células Ts2 de estos hibridos generadas por TsF1 soluble suprimen respuestas a NP-O-Su en C57Bl/6 ($H\text{-}2^b$) o en B10.BR ($H\text{-}2^k$). No suprimen a terceros lo que no parece deberse a rechazo ya que la respuesta se mide a las 24 horas. Además la misma población F1 suprime a recipientes parentales capaces de reconocer determinantes alogénicos H-2. Las células Ts2 inducidas por TsF1 de CKB pulsado en células de B6xC3H también suprimen a cualquiera de los recipientes parentales, pero cuando las Ts2 son generadas por TsF1 de CKB pulsado en células parentales C57Bl/6 ($H\text{-}2^b$) solamente pueden causar supresión en recipientes $H\text{-}2^b$.La misma población de (B6xC3)F1 Ts2 era incapaz de suprimir a

recipientes B10.BR ($H\text{-}2^k$).

A la inversa, cuando los ratones F1 fueron inyectados con TsF1 pulsado en células de B10.BR, las células Ts2 generadas podian funcionar en cepa $H\text{-}2^k$B10.BR pero no en cepas $H\text{-}2^b$.

Dentro del complejo H-2 otros experimentos permiten circunscribir la restricción a la región I-J. Así, cuando se generan células Ts2 en B6A F1 ($H\text{-}2^b/H\text{-}2^k$) por inyección de TsF1 de CKB pulsado en B6A F1, 3R ó 5R, se comprueba que: 1/ las Ts2 generadas por TsF1 pulsado en B6A F1 funcionan en cepas $H\text{-}2^b$ o $H\text{-}2^k$. 2/ Ts2 generadas por TsF1 pulsado en 3R solo funcionan en cepas $H\text{-}2^b$. 3/ Las Ts2 inducidas por TsF1 pulsado en 5R solo funcionan en cepas $H\text{-}2^k$. Por lo tanto, el fenotipo I-J de las células usadas para presentar TsF1 determina la restricción genética de la población Ts2. El genotipo H-2 de la fuente de TsF1 no influencia la restricción. Se infiere también de estos experimentos que los heterozigotos H-2 tienen la capacidad de generar dos poblaciones Ts2.

Las células presentadoras de factor son células adherentes que expresan I-J (aunque los autores que las describen refieren que solamente en 4 de 7 experimentos observaron alguna evidencia de lisis usando un suero anti-I-J (39).

1.12 FACTOR SUPRESOR TS2 Y CELULAS Ts2.

Hemos visto antes que en la población Ts2 se reconocieron

receptores anti-idiotipicos. Esto permitió (37) purificar esta población por adherencia a placas revestidas con idiotipo,en este caso anti-NP y posteriormente fusionar esta población con timoma BW5147. Los clones producidos se testaron con anti-IJ, seleccionandose los clones productores de factores supresores que,por tanto, corresponden a la población Ts2. Los sobrenadantes de estos hibridomas inhiben la respuesta de sensibilidad de contacto de modo antigeno especifico. Mientras los factores Ts1F inhiben si se administran en la fase de inducción (el dia antes o el dia de "priming", los Ts2F inhiben cuando se dan en fase efectora (el dia de "challenge con antigeno o el dia anterior).

Otra diferencia importante entre Ts1F y Ts2F es que el primero es capaz de inducir la aparición de células Ts2 (para demostrarlo se inyectan 0,4ml de Ts1F durante 4 dias a ratones no primados y en dia 6 se transfieren $4x10^7$ esplenocitos de estos ratones a recipientes singeneicos primados con NP). Los sobrenadantes de hibridomas conteniendo Ts2F no inducen una sucesiva población supresora cuando se testan de este modo (37).

También es interesante señalar la diferencia existente entre estos factores respecto a su efecto inhibidor sobre células formadoras de placas (PFC) in vitro. Ts1F inhibe este tipo de respuestas cuando se añade al comienzo (dias 0,1) del cultivo in vitro (40). Al parecer actua a traves de la inducción de

células supresoras de 2º orden. Las células supresoras de 2º orden,Ts2, inhiben si se añaden al final del cultivo pero solo si previamente han pasado por un periodo de subcultivo in vitro de unos 4 dias. Este subcultivo debe realizarse en presencia de Ts1F si el animal no ha sido tolerizado (no ha recibido células singeneicas-hapteno) o no ha recibido Ts1F (40). Si el animal ha sido sometido a tratamientos inductores de células Ts2 parece ser que el subcultivo in vitro en ausencia de Ts1F es necesario para permitir la maduración y diferenciación de estas células (41).

Una de las paradojas más notables del modelo de circuito supresor NP sobre la que,a titulo personal, deseo llamar la atención lo constituye el hecho de que aunque Ts1F tiene capacidad para inhibir respuesta PFC dado en fase inductora mediante generación de células Ts2, y a pesar de que éstas últimas también son capaces de inhibir respuesta PFC al ser añadidas en fase efectora, no se haya descrito similar efecto supresor mediado directamente por Ts2F. Este efecto deberia producirse si como se supone Ts2F es el mediador de las acciones de las células Ts2. Un efecto inhibidor de la respuesta PFC in vitro en fase efectora se ha comprobado en el caso de Ts3F (40).

Es importante resaltar que la supresión de células formadoras de placas afecta de modo casi exclusivo a las células B positivas para idiotipo. Así, aunque el porcentaje de células

B idiotipo positivas se redujo de 50% a 6% en ratones inmunizados a NP-Ficol recipientes de células supresoras, la magnitud total de la respuesta no se afectó significativamente (42). Por lo tanto se puede hablar de otro tipo de supresión no especifica afectando a clones idiotipo negativos que se desenmascara al inhibirse los clones idiotipo positivos. Este fenómeno podria deberse a competencia por células T "helper" entre ambos tipos de clonos tal como sugieren estos autores pero a la vista de hallazgos de otros autores sobre la existencia de supresión mediada por células B este fenómeno puede constituir un buen ejemplo de la existencia de este tipo de supresión.

1.13 MARCADORES DE Ts2F.

Los factores Ts2F son depleccionados de actividad supresora por paso por columnas anti-IJ especificas para la cepa productora del factor. Asimismo columnas idiotipo absorbian la actividad supresora (37).

1.14 RESTRICCION GENETICA DE Ts2F.

Estos factores están restringidos tanto por genes H-2 como por genes Igh. Así, factores procedentes de CKB ($H\text{-}2^k, Igh^b$) suprimen a cepas CKB o B10.BR ($H\text{-}2^k, Igh^b$) pero no suprimen a la cepa Igh congénica C3H ($H\text{-}2^k, Igh^j$) o a la H-2 congénica CWB ($H\text{-}2^b, Igh^b$). Cuando se realizó un mapeo intra H-2 de esta

restricción se vió que la región responsable era la I-J (37).

1.15 CELULAS PRESENTADORAS DE Ts2F Y RESTRICCION GENETICA DE SU FUNCION

La actividad funcional de Ts2F depende de su presentación por células accesorias. El papel de las células accesorias en el tipo de restricción genética exhibido por Ts2F ha sido aclarado por Usui et al (43). Estos autores pulsaron Ts2F de origen B6 ($H\text{-}2^b$,Igh^b) o CKB ($H\text{-}2^k$,Igh^b) en células 3R ($I\text{-}J^b$), 5R ($I\text{-}J^k$) o B6A(F1) ($I\text{-}J^k$,$I\text{-}J^b$). Las células pulsadas ($4x10^7$) fueron transferidas i.v. inmediatamente antes de "challenge" con antigeno a recipientes 3R ó 5R previamente primados a NP. Se observó que el Ts2F de B6 pulsado en 3R funciona tanto en 3R como en 5R. En cambio si es pulsado en 5R no funciona ni en 3R ni en 5R. Cuando es pulsado en B6A(F1) funciona en ambos. A la inversa el originado en CKB funciona cuando es pulsado en 5R tanto en 3R como en 5R. Se pudo concluir que se requiere homologia en región I-J entre la célula origen del Ts2F (o el Ts2F) y la célula presentadora de este factor. En segundo lugar, se comprueba que no existe requisito de homologia entre la célula presentadora de Ts2F y los recipientes en que se desarrollan las fases siguientes de la supresión (donantes de células Ts3). Una vez la restricción I-J es satisfecha entre Ts2F y su célula presentadora, ésta ultima puede suprimir a recipientes I-J incompatibles.

Para analizar el sitio de restricción Igh se diseñó el siguiente experimento: B6 ($I\text{-}J^b, Igh^b$) y el Igh congénico B6.Igh^n ($I\text{-}J^b, Igh^n$) fueron primados con NP-O-Su. Después de 5 dias estos ratones recibieron $4x10^7$ células B6 o B6.Igh^n pulsadas con Ts2F de origen B6 o con sobrenadante control BW. El Ts2F usado es, por tanto, idéntico a las células presentadoras de ambas cepas en región I-J pero distinto en región Igh de la cepa B6.Igh^n. De esta forma si existiera un requisito de identidad en ambas regiones, las células de B6.Igh^n pulsadas con Ts2F de B6 no funcionarian en ninguna de las dos cepas. Lo que ocurrió fué que células de B6.Igh^n pulsadas con Ts2F de B6 funcionaron en la cepa B6 pero no en la B6.Igh^n. Esto demuestra que se requiere homologia Igh entre la célula productora del factor y la célula respondedora (no con la célula presentadora ya que B6.Igh^n puede presentar el factor de origen B6 a B6). Experimentos adicionales mostraron que dentro de Igh la restricción podia circunscribirse a la región Igh-V.

Los resultados muestran que la restricción IJ implica interacciones con una población accesoria que presenta Ts2F en tanto que la restricción Igh de Ts2F aparece presumiblemente dirigida a receptores idiotipicos expresados en la población Ts3. Esto implica que dos pasos son necesarios en la activación de Ts3 mediada por Ts2F: en primer lugar Ts2F debe unirse a las células accesorias

presumiblemente via determinantes IJ. Las células accesorias que han unido Ts2F entonces activarian a las células Ts3 via una interacción idiotipo-antiidiotipo que es restringida por Igh-V.

1.16 CARACTERIZACION DE LAS CELULAS PRESENTADORAS.

Se comprobó que 10^4 células adherentes eran suficientes para presentar eficazmente Ts2F. Por el contrario, 10^7 células no adherentes no eran capaces de inducir supresión.

Las células adherentes pueden contener macrófagos y células dendriticas. $3x10^5$ células dendriticas no eran capaces de presentar el factor mientras $8x10^4$ macrófagos lo presentaban eficazmente.

Las células adherentes eran resistentes a tratamiento con suero anti-theta y complemento.

Ratones a los que se habia dado 100mg/kg de ciclofosfamida 1 ó 2 dias antes de la preparación de la población esplénica adherente o incluso 20mg 2 dias antes no eran capaces de presentar el factor. La irradiación (500R) inmediatamente antes del pulso con Ts2F también deterioraba la función de presentación.

1.17 CELULAS Ts3.

Sunday et al (44) han identificado una tercera población en el circuito supresor NP. Estos investigadores mezclaron

células de ganglio linfático (LN) de animales primados a NP 6 dias antes a células tolerizadas (supresoras) o a células control. La mezcla era transferida a recipientes "naive" singeneicos via i.v. a los que se administraba 1 hora después NP-O-Su en pata trasera para testar respuesta CS. Las células LN preinmunes tratadas con suero normal de ratón o con suero anti-IJ y complemento, transferidas junto a células control eran capaces de producir niveles altos de respuesta CS a NP. Esta respuesta era abolida cuando estas células se inyectaban junto con células tolerizadas. Las células tolerizadas, sin embargo, no suprimian a las de ganglio linfático si éstas eran tratadas previamente a la mezcla con suero anti-IJ y complemento. Además se vió que si se añadia a la mezcla de $4x10^7$ células LN preinmunes tratadas con anti-IJ + C y $4x10^7$ células tolerizadas, $1x10^7$ células LN preinmunes no tratadas, se reconstituia el efecto supresor. No habia reconstitución cuando éstas últimas eran tratadas con suero anti-theta + C. De acuerdo con los autores citados esto demostraba que una población presente en ganglio linfático es necesaria para que se manifieste la actividad supresora de las células Ts2. Esta nueva célula, llamada Ts3, es de linaje T y porta determinantes IJ. Por otra parte, esta célula requiere para cumplir su cometido una doble fuente de estimulación: debe ser primada con antigeno y además recibir una señal procedente de la célula Ts2.

En respuestas PFC in vitro Sherr et al (45) observaron que si se añaden células Ts2 a cultivos singeneicos que han sido tratados con suero anti-IJ + C, las células Ts2 son incapaces de suprimir la respuesta. Esto significa, que como es el caso en respuestas CS, una población IJ positiva presente en la población respondedora es necesaria para que tenga lugar la acción supresora inducida por Ts2. Experimentos de reconstitución permitieron demostrar que esta población debe haber sido primada con antigeno, es una célula T y adhiere a hapteno NP, siendo inactivada por suero anti-idiotipico + C, es decir, porta determinantes idiotipicos. Los mismos autores demostraron que es Lyt 1^-, Lyt 2^+. Esto proporciona una importante distinción con la célula Ts1 que también posee determinantes idiotipicos pero que es de fenotipo Lyt 1^+.

1.18 SENSIBILIDAD DE Ts3 A CICLOFOSFAMIDA (CY).

Se inmunizaron ratones a dia 0 con NP-O-Su y 1 dia más tarde se les administraron 50 ó 20 mgs de CY o suero salino a controles. El dia 6 recibieron células tolerizadas a NP o bien células control, testándose a continuación (1 hora después) respuesta CS. La respuesta no se influia por la administración de CY. Sin embargo, las células supresoras podian abolir la respuesta en ratones a los que no se habia dado CY pero no en los que recibieron CY.

Las células preinmunes LN capaces de reconstituir actividad

supresora carecian de esta abilidad tras tratamiento con CY.

1.19 RESTRICCION GENETICA DE LA INTERACCION Ts2-Ts3.

Para evaluarla, ratones inmunizados a NP y tratados en dia 1 con CY, recibieron por via i.v. células Ts2 junto a células Ts3 (células de ganglio linfático) de diferentes cepas de ratones. La reconstitución de actividad supresora requeria homologia en genes H-2 e Igh.

1.20 FACTOR Ts3 (Ts3F).

Se han obtenido hibridomas secretores correspondientes a la población Ts3 (46). El sobrenadante de hibridoma B6-Ts3-8 es uno de ellos y fué estudiado por Sherr et al (40). Este factor inhibe PFC anti-NP cuando se añade en fase efectora de un cultivo in vitro. Tanto Ts1F como Ts3F inhiben cuando se añaden en fase inductora pero solamente Ts3F inhibe en fase efectora. In vivo, en cambio, en respuestas CS, Ts3F es operativo solamente en fase efectora. Al igual que Ts1F, Ts3F une antigeno y porta determinantes IJ. Se distinguen por su cinética de inhibición asi como por la propiedad de Ts1F de inducir células Ts2 in vivo o in vitro. Por otra parte, Ts3F pero no Ts1F es capaz de inhibir a células respondedoras tratadas con suero anti-IJ + C. Este tratamiento elimina las poblaciones efectoras Ts2 y Ts3. Además, Ts3F puede suprimir la respuesta de células B directamente ya que es efectivo en

eliminar respuesta frente a antigeno timo-independiente NP-BA en cultivos respondedores tratados con anti-theta + C. Esto sugiere que este factor es la molécula efectora del circuito supresor NP aunque no excluye la posibilidad de que una célula aceptora sea requerida para unir el factor y manifestación de actividad supresora. Esta, evidentemente, no expresaria determinantes IJ o Thy 1.2.

1.21 CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE Ts3F.

Tras pasar el sobrenadante de B6-Ts3-8 por una columna NP-BSA y elución ácida se obtiene el factor purificado. Este se reduce con 5mM DTT (ditiotreitol). Parte de este vuelve a pasarse por el inmunoabsorbente. La parte que ahora se une contiene contiene la cadena antigeno-especifica que por si sola es incapaz de producir supresión. Reconstituida con el filtrado, que contiene la cadena portadora de determinantes IJ, se recupera la actividad supresora (40).

1.22 RESTRICCIONES GENETICAS DE Ts3F.

La restricción IJ ocurre entre Ts3F y las células acopladas a hapteno.

Las caracteristicas de la restriccion genetica exhibida por este factor fueron principalmente dilucidadas por Aoki et al (47) en respuestas CS. Estos autores median respuestas de sensibilidad cutánea usando como antigeno final subcutáneo células singeneicas acopladas a hapteno NP en ratones

previamente primados con NP-O-Su. La preparación células-hapteno induce tumefacción especifica (solo en animales primados con hapteno). Ratones hibridos B6A (F1) (IJ^b/IJ^k) eran primados y tratados con ciclofosfamida 24 horas después (20mg/kg) para evitar generación de células Ts3. Para la obtención de respuesta CS (fase de "challenge") se usaba preparación de células-hapteno de las cepas B6A (F1), 3R (IJ^b) o 5R (IJ^k). Todas ellas producian tumefacción. Las respuestas inducidas por B6A-NP podian ser inhibidas dando Ts3F de origen B6 (IJ^b) o de origen CKB (IJ^k). Las inducidas por 3R-NP solamente eran inhibidas por Ts3F de origen IJ^b. Las inducidas por 5R solamente por Ts3F de origen IJ^k. Esto sugeria que: 1/ la restricción IJ tiene lugar entre la célula presentadora de hapteno y el Ts3F, y 2/ antigeno y determinantes IJ deben ser reconocidos en la misma célula. La restricción Igh ocurre entre Ts3F y el recipiente.

En un protocolo experimental similar al anterior se usaron ratones Igh congénicos B6 y B.C-8. Cada uno de ellos recibió como iyección subcutánea desencadenante NP acoplado a células singeneicas o del otro grupo y Ts3F de origen B6 o control. La actividad supresora del factor se observaba solamente en recipientes B6 (tanto si CS era provocada por NP-B6 como si lo era por NP-B.C-8). Ninguna de ambas respuestas podia ser inhibida en recipientes B.C-8. Esto demostraba que la restricción Igh tenia lugar entre Ts3F y el recipiente aunque

no conocemos la naturaleza de las células del recipiente responsables de dicha restricción. Otros experimentos permitieron delimitar la el control de restricción Igh a Igh-V.

1.23 ABILIDAD DE Ts3F PARA MEDIAR SUPRESION INESPECIFICA

Se demuestra que Ts3F es capaz de mediar supresión inespecifica administrando Ts3F a B10.BR ($H\text{-}2^k$) primado con B6 ($H\text{-}2^b$) (respuesta alogénica) y midiendo CS tras inocular subcutaneamente células B6 solas o acopladas a NP. La administración del factor especifico para NP previene la respuesta alogenica, la cual no se afecta en el caso de que se use como antigeno células B6 no acopladas.

1.24 SENSIBILIDAD A LA CICLOFOSFAMIDA DE LA CELULA ACOPLADA A HAPTENO (CELULA PRESENTADORA)

Si los dadores de células que subsecuentemente son acopladas a hateno NP, son previamente tratados con ciclofosfamida (2 dias antes, 20mg/kg) se impide la interacción de esas células con Ts3F de forma que éste no puede llevar a cabo su efecto supresor. Sin embargo este tratamiento no interfiere con la respuesta CS. Para explicar esta diferencia los autores

postulan la existencia de una población presentadora de hapteno no sensible a ciclofosfamida operativa en la respuesta CS y otra población presentadora sensible a ciclofosfamida y que es responsable de la supresión. (Otras explicaciones alternativas, distintas de la propuesta por estos autores y que no presuponen la existencia de células independientes para las vias respondedora y supresora son igualmente plausibles. El efecto de la ciclofosfamida podria limitarse a impedir la expresión de los determinantes IJ pero no los Ia en una célula capaz de activar simultáneamente ambos circuitos. Podria distinguirse entre estas posibilidades separando las células presentadoras marcadas con anti-Ia o anti-IJ en un "cell sorter" antes y después de tratamiento con ciclofosfamida).

1.25 PRECISIONES SOBRE ALGUNAS IRREGULARIDADES EN EL TIPO DE RESTRICCION GENETICA DE Ts3F.

La restricción por Igh demostrada en respuestas de sensibilidad de contacto no parece tener un paralelismo en el sistema PFC in vitro (48). También, como veremos más adelante, cuando se usa Ts3F para armar a la célula T aceptora no hay restricción Igh (49)

1.26 COMENTARIO SOBRE EL PAPEL DE LAS DIFERENTES CELULAS

PRESENTADORAS DE FACTOR (FPC) O PRESENTADORAS DE ANTIGENO Y SU INFLUENCIA EN EL TIPO DE RESTRICCION GENETICA.

En la revisión de Benacerraf (50) sobre el circuito supresor NP se postula un modelo en el que las células presentadoras de factor actúan secuencialmente operando como soporte del factor correspondiente en su acción en cadena. Ts2F es presentado por una célula que debe ser homóloga con Ts2F en región IJ. No es imprescindible, en cambio, la homologia IJ entre Ts1F y la célula presentadora de este factor, sino que la especificidad IJ de esta última determina el tipo de restricción IJ subsecuente, es decir, las siguientes células del circuito supresor deberán encajar (ser homólogas) con el IJ de esta primera célula presentadora.

En dicha revisión se postula también una célula presentadora de factor Ts3. Sin embargo, no se aporta en la documentación revisada evidencia experimental que avale la existencia de esta célula. Además, los experimentos mencionados anteriormente muestran que la restricción IJ de Ts3F ocurre entre este factor y una célula presentadora de antigeno (no de factor) mientras que la célula responsable de la restricción Igh no ha podido ser determinada.

1.27 DIFERENCIAS ENTRE DETERMINANTES IJ.

Las interacciones mediadas por IJ entre células T y células presentadoras de antigeno (APC) o de factor (FPC) sugieren

que estas distintas células deben poseer determinantes IJ diferentes y complementarios. Schrader (51) fué el primero en postular que los anticuerpos usados para detectar determinantes IJ contendrian también anticuerpos anti-idiotipicos contra las especificidades presentes en anticuerpos anti-IJ. De esta forma, estos anticuerpos no permiten distinguir células portadoras de determinantes IJ de células que expresan receptores idiotipicos anti IJ propio (anti-self IJ). Kawasaki et al (52) consideran que los determinantes en células Ts representan receptores para el IJ propio presente en macrófagos singeneicos (APC,FPC). A estas últimas moléculas las denominan moléculas interactivas IJ (IJ interacting molecules) y a las primeras, propias de células T, determinantes del receptor (receptor determinants). Estos autores prepararon anticuerpos monoclonales anti-Ts-IJ^k y anti-Ts-IJ^d. Después prepararon anticuerpos anti-idiotipo IJ^k y anti-idiotipo IJ^d (dirigidos contra epitopos presentes en anticuerpos anti-Ts). Con estos últimos anticuerpos trataban las células adherentes que habian de ser usadas para acoplarles hapteno NP y posteriormente inyectadas s.c. con objeto de inducir células Ts3. A los 6 dias, células de ganglio linfático de los ratones asi tratados eran transferidas a recipientes singeneicos previamente primados con NP-O-Su y tratados con CY (para depleccionar de células Ts3). A fin de activar las células Ts3 transferidas esos

ratones recibieron también Ts2F. Los ratones que recibian Ts2F junto con células Ts3 manifestaban supresión. Sin embargo, el tratamiento de las células presentadoras de antigeno antes de acoplamiento a éste con suero anti-idiotipo IJ^k o IJ^d impide la aparición de supresión en las respectivas cepas de ratones. Esto demuestra que el tratamiento de las APC con anti-idiotipo IJ impide la inducción de células Ts3. Lo mismo ocurre cuando se usa una linea de macrófago que expresa IJ como APC.

En otro experimento células adherentes recibieron tratamiento con este antisuero o no antes de ser acopladas a hapteno y ser inyectadas i.v. a recipientes singeneicos. A los 5-6 dias las células esplénicas de éstos fueron transferidas a nuevos recipientes singeneicos via i.v. los cuales recibieron 1 hora después antígeno por via s.c. para determinar respuesta de sensibilidad cutánea. Este protocolo detecta la inducción de células Ts1, observándose que el tratamiento aludido con anti-idiotipo IJ impide la inducción de éstas.

Finalmente se demostró que el tratamiento con este antisuero de células adherentes antes de ser pulsadas con factor Ts1 evita la activación de células Ts2 normalmente causada por este procedimiento. Estos hallazgos permiten concluir que tanto las células presentadoras de antígeno (necesarias para inducción de Ts1 y Ts3 como las células presentadoras de Ts1F poseen determinantes IJ de tipo idiotipico (complementario o

imagen en espejo de los presentes en células Ts).
También se vió en el curso de estos experimentos que los reactivos anti-Ia no interferian con inducción de células Ts.

1.28 OTRAS CELULAS DEL CIRCUITO SUPRESOR.

La comparación del factor TsF3 del sistema NP con TsF del sistema picryl-oxazolona demostró la equivalencia de estos factores y su común operatividad a través de una nueva célula T, llamada célula T aceptora.
Incubando fatores supresores de uno u otro sistema con células T de nódulos linfáticos y bazo de ratones inmunizados a oxazolona, purificadas por fibra de nylon (nylon wool) y mezclando las células así armadas (T aceptoras) con células presentadoras de hapteno (células singeneicas-hapteno), se produce un inhibidor inespecífico. Cuando células inmunes se incuban en el sobrenadante conteniendo este inhibidor se tornan incapaces de transferir pasivamente sensibilidad de contacto. Si se arma a la célula T aceptora con una mezcla de ambos TsF su actividad puede ser inducida con el hapteno mixto NP-oxazolona dado junto a una fuente de moléculas IJ. Para que se produzca liberación del inhibidor se requiere identidad a nivel H-2 entre las células presentadoras de hapteno y la cepa origen del factor. No influía, en cambio, la ausencia de identidad entre estas células en región Igh.

En estos experimentos (49) se usó únicamente Balb/c como fuente de células T aceptoras . Balb/c es H-2^d, Igh^a, distinto en ambas regiones tanto a las células presentadoras de hapteno como a la cepa origen del factor por lo que el fenotipo de la célula aceptora es irrelevante.

La acción in vivo de Ts3F si está restringida por Igh, al contrario de la acción via T aceptora. Por otra parte las células T aceptoras son ineficaces tanto si proceden de un animal timectomizado, lo que es lógico por tratarse de células T, como si proceden de un animal tratado con ciclofosfamida (200mg/kg, 2 dias antes de inmunización) lo cual es dificil de explicar ya que en experimentos in v vo anteriormente descritos Ts3F podia inhibir a ratones tratados con ciclofosfamida (esta se consideraba que actuaba en una secuencia anterior a Ts3F impidiendo la activación de la célula Ts3). Asherson (49) atribuye esta contradicción a las diferentes dosis de ciclofosfamida usadas en estos experimentos o bien al uso in vivo de un mecanismo alternativo en esta fase final del circuito supresor a través del macrófago, de modo que la inactivación de la célula T aceptora no implicaría desaparición de la actividad supresora.

La ausencia de una via única bien definida en el circuito supresor es uno de los puntos débiles de este modelo, ya que la multiplicidad de vias supresoras postuladas hace pensar

que algunos de los pasos caracterizados experimentalmente sean artefactos in vitro. Esto no sería sorprendente sobre todo si consideramos que en otros sistemas el circuito supresor es muy simple (como más adelante veremos). En este mismo modelo, Asherson apunta que aunque Ts1 y Ts2 forman parte del circuito supresor, es probable que existan otros procedimientos para activar a las células Ts3. En particular la necesidad de Ts2 anti-idiotipicas puede ser soslayada si hay suficiente antígeno para activar Ts3. De modo similar, este autor explica la discrepancia en cuanto a restricción genética que ocurre cuando se inyecta Ts3F in vivo o cuando se usa este para armar a la T aceptora: en el primer caso la restricción es por IJ y por [illegible] mientras que en el último no hay restricción por Igh. Puesto que la restricción por Igh se atribuye a interacciones idiotipo-antiidiotipo, este autor cree que al haber usado células-hapteno para detectar células T aceptoras no hay necesidad de reacciones anti-idiotipicas lo que no sería el caso in vivo cuando la cantidad de antígeno puede ser limitante.

1.29 SUPRESION E IDIOTIPOS.

Como vemos la interacción idiotipo-antiidiotipo está intimamente entrelazada con el mecanismo de supresión. Por ello vamos a examinar brevemente este concepto.

Los anticuerpos contienen determinantes antigénicos

isotipicos que caracterizan las cadenas pesadas de las diferentes clases de anticuerpos. Se hallan presentes en todos los miembros normales de una especie.

Los determinantes alotipicos, en cambio, son producto de formas alélicas de un gen y por tanto pueden ser diferentes en distintos individuos. Se expresan codominantemente pero cada linfocito B secreta solo una de las formas parentales. Este fenómeno recibe el nombre de exclusión alélica.

Los idiotipos son determinantes privativos de determinadas moléculas de anticuerpo. Se identifican por la producción de anticuerpos contra otro anticuerpo que estaba dirigido a un antígeno determinado tras absorber con determinantes isotípicos y alotípicos. Los determinantes reconocidos por esos anticuerpos se hallan generalmente en el sitio de unión con antígeno. No todos los idiotipos, sin embargo, se hallan en este lugar ya que no siempre se impide la unión idiotipo-antiidiotipo al incubar el primer anticuerpo con antigeno.

Aunque la respuesta a un determinado antigeno suele dar lugar a una mezcla de anticuerpos que difieren ligeramente en el sitio de unión a antigeno, en algunas cepas de ratones se produce un tipo de anticuerpo predominante. Puesto que éste se produce en todos los miembros de una cepa en respuesta a dicho antígeno, el idiotipo en cuestión es un rasgo hereditario. Estos idiotipos son llamados mayores o públicos. Los idiotipos tienen gran relevancia en conexión con el

fenómeno de supresión inmune ya que según la teoria del network de Jerne la respuesta inmune está regulada por una red de idiotipos y antiidiotipos. Esto se comprueba en el caso de supresión antigeno especifica donde las distintas células del circuito supresor portan secuencialmente determinantes idiotipicos, antiidiotipicos, y de nuevo idiotipicos.

También en el campo mucho menos estudiado de la supresión B se ha avanzado la idea de que las células B supresoras corresponden a la subpoblación que secreta anticuerpos capaces de reconocer a inmunoglobulinas de membrana de otras élulas B. Este punto será discutido más adelante.

nto el papel de los idiotipos en la supresión mediada por ce.ulas T como la abilidad, exclusiva de las células T supresoras de unirse a antigeno directamente sin necesidad de reconocimiento asociativo con productos del CMH, sugirieron que las células T usaban inmunoglobulinas como receptor de membrana. Sin embargo esta hipótesis ha sido refutada ya que el examen del receptor T que ha podido ser aislado no revela identidad con inmunoglobulinas. Además, el análisis de numerosas lineas e hibridomas T positivos para idiotipo demostró la ausencia de recombinación de genes de inmunoglobulinas.

Una cuestión importante es si los receptores T reconocen el mismo repertorio de determinantes idiotipicos presentes en

inmunoglobulinas. Este problema se abordó en el sistema NP. Para ello se purificaron células Ts2 por adherencia a plástico recubierto con: a/ anticuerpos anti-NP^b purificados por afinidad b/ anticuerpo monoclonal anti-NP de clase IgM (alotipo Igh^b) y cadena ligera lambda 1, c/ el mismo monoclonal con cadena ligera lambda 2 d/ el mismo con cadena ligera kappa.

Los anticuerpos con cadenas ligeras lambda 1 y lambda 2 expresaban el mismo gen V_h pero diferentes genes J_h. Las células asi separadas fueron testadas para supresión resultando que la supresión fué detectada en la población adherente a anticuerpo anti-NP^b y a anticuerpo monoclonal con cadena ligera lambda 2 y en menor proporción en la población no adherente a este último. Esto demostraba que la población Ts2 es heterogénea con una fracción mayor capaz de reconocer el idiotipo presente en el monoclonal con lambda 2. El anticuerpo portador de lambda 1 expresa el idiotipo NP^b predominante en suero y comparte V_h y determinantes idiotipicos menores con el monoclonal con lambda 2. Por tanto Ts2 reconocen solo una fracción menor de los determinantes idiotipicos presentes en suero, es decir, los determinantes idiotipicos de las células T están relacionados pero no son idénticos a los de las células B (50).

El mayor interrogante es por qué las células T expresan

idiotipos similares o relacionados a los de las células B sin usar genes de inmunoglobulinas. Se ha adelantado la hipótesis de que sus idiotipos están dictados por el ambiente Igh presente durante el desarrollo, de manera similar a como el timo enseña a las células T el tipo de restricciones genéticas con productos del CMH que exhibirán en la época adulta. Esta hipótesis se ha testado en el sistema ABA (azobenzenearsonato) que como el sistema NP exhibe un circuito supresor con interacción secuencial entre células idiotipicas y antiidiotipicas.

En primer lugar (53) se hizo que las células T se desarrollaran en ausencia de células B y sus productos. Esto se consiguió por inyección repetida desde el nacimiento de antisuero de conejo anti-IgM de ratón. Este tratamiento elimina células B con Ig de membrana, abole la respuesta a LPS y deprime los niveles séricos de Ig.

Las células Ts1 o factores Ts1 procedentes de animales así tratados fallar en inducir supresión en ratones singeneicos no tratados. A su vez células Ts1 o factores Ts1 de animales no tratados carecen de efecto supresor en los tratados.

Un hallazgo inesperado fué que los animales tratados desarrollan su propio repertorio idiotipico. Así, Ts1F de ratones tratados suprimia respuesta ABA en ratones singeneicos tratados y también en algunas cepas Igh congénicas. La supresión era antigeno especifica pero no

sujeta a restricción H-2.

En la cepa C.AL-20 la respuesta anti-ABA presenta predominantemente el idiotipo CRI(A) y un componente minoritario con idiotipo CRI(C). En Ts1F de C.AL-20 se expresa solo el idiotipo predominante CRI(A) sin que se haya detectado el CRI(C). En cambio Ts1F de Balb/c exhibe idiotipo CRI(C). Pues bien, en los ratones tratados con anti-IgM de una u otra cepa se produce un cambio al idiotipo minoritario (predominante en la otra cepa).

Otra manera de abordar este problema consistió en transferir células T de animales adultos a animales irradiados Igh congénicos. Se reconstituyeron ratones congénicos Igh-1^b con células T de B6 Igh-1^n. Los factores Ts1 derivados de los animales reconstituidos pueden suprimir tanto en donantes singeneicos Igh-1^n como en ratones congénicos Igh-1^b pero no en cepas Igh-1^a. Puesto que Ts1F producido en los ratones quiméricos tiene funcionalidad dual se postula que dos Ts1F son producidos por las células T del donante B6 Igh-1^n y que estas contienen dos poblaciones distintas: una que retiene su restricción Igh-1^n y otra representativa de una población no expandida precursora de la que muestra la restricciónIgh-1^b. Sin embargo, el mecanismo por el que las células T reconocen nuevos elementos de restricción no se conoce. Es probable que sea debido a la presencia de células B o de sus productos pero todavia carecemos de prueba experimental directa (53).

1.30 MACROFAGOS Y SUPRESION.

La actividad supresora de los macrófagos ha sido puesta en evidencia en numerosos sistemas. En sistemas que miden citotoxicidad contra lineas xenogénicas in vitro se vió p. ej. que la eliminación de las células adherentes a plástico ocasionaba un aumento de la actividad citotóxica (54) lo que se atribuyó a supresión de la fase sensibilizante por macrófagos. También la actividad citotóxica inducida in vitro contra una linea alogénica mediada por células T se encontró que aumentaba tras eliminación de la población total (linfos de sangre periférica humana) de las células adherentes a fibra de vidrio (55). Las condiciones del experimento sugerian que las células supresoras se generaban durante cultivo in vitro y efectivamente, células mantenidas en cultivo y añadidas a los cultivos respondedores eran supresoras. No inhibian si previamente eran deplecionadas de células adherentes a plástico o fraccionadas por columnas de nylon. Las células recuperadas de las columnas de nylon (tras ser retenidas por ellas) si eran inhibitorias: podian suprimir a la población total pero no a una población a su vez deplecionada de células adherentes a nylon, aunque si a una población deplecionada solamente de células adherentes a

plástico. Esto sugiere, que en este sistema, son necesarias dos células supresoras, una parece ser un macrófago por su adherencia a plástico, la otra no fagocítica, no adherente a plástico pero si adherente a fibra de nylon.

Revisando la literatura sobre supresión causada por macrófagos hemos encontrado un nuevo ejemplo de lo que podriamos llamar paradoja de la densidad a la que nos hemos referido ya anteriormente (5). Laughter et al (56) trabajando en reacción MLR en humanos encuentran que hay una proporción óptima entre células respondedoras y células estimulantes. En las condiciones de su experimento se situó el número óptimmo de células estimulantes en $2x10^5$. Por supuesto, las células estimulantes eran irradiadas. Si se aumentaba el número de células irradiadas añadidas hasta $8x10^5$, tanto si estas eran autólogas con las respondedoras como con las estimulantes, disminuia la incorporación de timidina inducida por MLR. Si esas células añadidas provenian de una población pasada por fibra de vidrio o por Sephadex-G10, o tratada con cicloheximida, no habia inhibición. Hoy sabemos que los dos primeros tratamientos no solo depleccionan de macrófagos sino también de células activadas.

Se ha reconocido actividad supresora a muchas moléculas derivadas de macrófagos. Estas incluyen: prostaglandinas (57), iones oxigeno reactivos (58) y una variedad de factores no bién caracterizados bioquimicamente producidos en

respuesta a virus, micobacterias y otros estimulos (59,60). La reacción a uno de esos estímulos, paredes bacterianas de estreptococos grupo A se asocia al posterior desarrollo de poliartritis en ratas. En el complejo de reacciones que aparecen conjuntamente hay una depresión de la respuesta inmune evidenciada por la inhibición de la respuesta de células esplénicas de estos animales a mitógenos ConA y PHA que se detecta ya a las 18 horas de la inyección de paredes bacterianas (61). La separación de las células adherentes de la poblacion esplénica restituye el nivel normal de respuesta, lo cual resulta paradójico ya que en los controles disminuye la respuesta puesto que la respuesta a esos mitógenos requiere la presencia de células accesorias. Las células adherentes de ratas así inyectadas cocultivadas con no adherentes de controles suprimen la respuesta (no se testó el efecto de las células no adherentes). La supresión era transferida por sobrenadantes. Se demostró que TGF-ß, que es capaz de inhibir proliferación de timocitos dependiente de IL-1, era responsable de la supresión ya que anticuerpos contra esa molécula bloqueaban la actividad supresora de los sobrenadantes. No tenian efecto bloqueante el tratamiento de los sobrenadantes con indometacina, superoxidodismutasa y/o catalasa, que contrarrestan la acción de PGE_2 o de radicales oxigeno respectivamente, los cuales también son inducidos por estimulación de macrófagos con paredes bacterianas. Sin

embargo, el anticuerpo anti-TGF-β no bloqueaba totalmente, aún a alta concentración la actividad supresora por lo que otros factores supresores deben, además, estar involucrados. Muchas otras enfermedades inflamatorias, como artritis reumatoide (62,63), lepra (64) y tuberculosis exhiben inmunidad celular deprimida que, a veces se ha atribuido a una población adherente (65).

1.31 CELULAS B SUPRESORAS.

Se sabe con certeza que la función "helper" corre a cargo de células T, quizás por ello se asume que todos los fenómenos de inmunoregulación dependen también de células T. No es extraño, por lo tanto, que la gran mayoria de trabajos sobre supresión hayan girado en torno a células T. Mucha menos atención se ha prestado a la supresión mediada por células B. Sin embargo, células B supresoras han sido demostradas en una gran variedad de situaciones que revisaremos a continuación.

Supresión mediada por lineas celulares B.

La observación clinica sugiere la existencia de supresión mediada por tumores linfoides. Así p. ej. se ha descrito hipogammaglobulinemia en pacientes con mieloma, macroglobulinemia, linfomas malignos y leucemia crónica (66,67). En mononucleosis infecciosa se observa, en cambio,

hipergammaglobulinemia (68) pero esto puede deberse a que el virus de Epstein-Bar, agente causal de MI, es un activador policlonal B. En los raros casos fatales de MI, sin embargo, se ha observado agammaglobulinemia (69). Hay comunicaciones indicando un aumento de actividad supresora en sangre periferica de pacientes con linfomas malignos B (70), e incluso en casos benignos de MI (71,72).

Tsukuda y Klein han estudiado la capacidad de una serie de lineas de linfomas B y lineas B transformadas por EBV (Burkitt) para inducir supresión in vitro (73). Encontraron que todas esas lineas pero no las lineas de leucemia mieloide HL-60 y K562 inhibian la respuesta en PFC de células esplénicas normales estimuladas con pokeweer mitogen (PWM). Células singenicas o alogénicas eran igualmente inhibidas. Según ellos, la inhibición era debida en parte a factores solubles supresores y en parte a la inducción de células T supresoras por cocultivo con las lineas tumorales. Debe señalarse que la inhibición por células T parece menos potente que la debida a tumores. Además algunos controles de células T no inducidas por tumores también tenían un ligero efecto supresor. No se aclara por otra parte en esta comunicación si estas células T control han sido mantenidas in vitro durante el mismo tiempo que las células en cocultivo con el tumor lo que teniendo en cuenta comunicaciones que describen aparición de células T supresoras por simple

cultivo in vitro puede ser importante.

Se ha visto que lineas linfoides establecidas in vitro producen una serie de sustancias similares a algunos mediadores de inmunidad celular producidos por linfocitos normales. Estos incluyen factor inhibidor de la migración de macrófagos, linfotoxina, factor quimiotáctico y "skin-reactive factor" (74-77). Esas sustancias no actúan directamente sobre linfocitos. Otros mediadores solubles se sabe que modifican y/o regulan la respuesta inmune (78).

Algunas lineas linfoides producen una substancia/s capaces de inhibir sintesis de DNA en linfocitos estimulados con mitógenos (79-83). Por otra parte, estimulación del crecimiento de linfocitos por sobrenadantes de lineas linfoides en crecimiento también puede ocurrir.

Vesole et al (84) estudiaron una serie de linfomas que secretaban en cultivo factores inhibidores y factores mitogénicos y potenciadores de la respuesta a otros mitógenos. Cuando se usaba sobrenadante completo ambos efectos podian anularse mutuamente y así quedar enmascarados. Ambas actividades pudieron ser separadas por fraccionamiento en Sephadex G-100. Llama la atención en este trabajo que la linea Raji no secrete factores inhibidores ya que en un trabajo de Tsukuda y Klein (73) se demuestra que células irradiadas de este tumor tienen capacidad supresora.

Supresión inducida por fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (conA) en lineas de leucemia linfocítica crónica B y en linfocitos B.

Farkas et al han demostrado que células B supresoras podian ser generadas por estimulación de linfocitos B purificados a partir de sangre periférica humana con PHA-P o conA. Estas células B inhibian reacción de cultivo linfocitario mixto y sintesis de DNA inducida por PHA en células esplénicas (85). Posteriormente (86) los mismos autores mostraron que células B supresoras aparecían estimulando con PHA-P o conA in vitro células de leucemia linfocítica crónica. Ambos mitógenos debian ser usados a alta concentración (conA a 50-100 ug/ml). Se testó inhibición de la respuesta MLR (reacción de cultivo linfocitario mixto), aunque debe advertirse que las células supresoras eran alogénicas tanto a las células respondedoras como a las estimuladoras. También se testó inhibición de síntesis de DNA inducida por PHA en cultivos de células esplénicas que asimismo estaba inhibida aunque en grado menor que MLR.

Se observó también que las células B de leucemia linfocítica crónica, que no mostraban actividad supresora cuando ésta se testaba al ser extraidas las células, antes de cultivo, adquirian capacidad supresora tras un tiempo de cultivo. En 7 de 9 casos desarrollaron esta capacidad a las 2 semanas de

cultivo. La aparición de supresión estaba ligada a su abilidad para proliferar ya que las células que permanecieron vivas en los cultivos pero sin proliferar no actuaban como supresoras. Las células B leucémicas exhibian mitosis y formas blásticas pero no diferenciación a células plasmáticas. En este caso la inhibición se testó también sobre una respuesta MLR siendo las células supresoras alogénicas a respondedoras y estimuladoras.

Supresión inducida por linfoquinas que actuan sobre células B

La producción de anticuerpos por los linfocitos B requiere el concurso de actividad accesoria que es mediada por linfoquinas (IL-1 producida por macrófagos y otras producidas por linfocitos T en un principio designadas T cell replacing factor (TRF)).

Linfocitos B de ratones atimicos ("nude") montan una respuesta en PFC muy debil frente a eritrocitos de cordero (SRBC). Las PFC producidas se incrementan al añadir a las células B estimuladas por antígeno TRF o IL-1. Este incremento es mucho más notable al añadir a la vez ambas linfoquinas (87). El hecho de que TRF tenía un efecto sinergistico mayor si era añadido a las 40 horas de iniciado el cultivo hizo pensar que TRF se inactivaba durante el

cultivo in vitro. Así, se observa que añadiendo IL-1 a tiempo 0 y TRF simultaneamente o bién a dias 1, 2 ó 3 y midiendo PFC anti-SRBC en dias 4 y 5, hay un máximo de PFC en los cultivos con TRF añadido en dia 2. La adición en dia 3 desplaza el pico en 1 dia, mientras la adición en tiempo 0 ó a las 24 horas no cambia la cinética pero resulta en menor número de PFC (87).

Por el sencillo método de añadir TRF a tiempo 0 y después en dia 2, Gilbert y Hoffmann demostraron que no se potenciaba la respuesta de modo equiparable al que tenia lugar al añadir TRF únicamente en dia 2. Por lo tanto la presunción de que el efecto sinergístico disminuia por inactivación de TRF durante el cultivo era injustificable. Estos autores examinaron entonces la posibilidad de que TRF, IL-1 o una combinación de los dos indujeran células supresoras durante los 2 primeros dias de cultivo.

Células esplénicas de ratones atímicos fueron incubadas con estas linfoquinas durante 2 dias, lavadas y añadidas a un cultivo de células esplénicas de ratones atímicos frescas que eran estimuladas por SRBC y linfoquinas en condiciones óptimas (IL-1 en dia 0 y TRF en dia 2). La preincubación de células esplénicas con una combinación de IL-1 y TRF pero no con cualquiera de estas linfoquinas aisladas dió origen a la aparición de células supresoras, evidenciadas por su capacidad de inhibir PFC de los cultivos frescos. El análisis

fenotípico mostró que se trataba de células B supresoras. En el tiempo en que estos estudios fueron realizados se sabia ya que TRF no era un componente puro. Se sabia que contenia IL-2 y otras linfoquinas (actualmente se sabe que son IL-4 y IL-5)(88). Gracias a la existencia de hibridomas que secretan IL-2 pudo testarse el efecto generador de células supresoras de esta interleuquina viéndose que era incapaz de generarlas. En cambio, el sobrenadante de una linea celular que secreta DL(TRF) (actualmente IL-5) si era capaz, según estos autores, de generar células supresoras.

Otra linfoquina a la que se ha atribuido capacidad de generación de células B supresoras es IL-4. Estudiando la proliferación de células B activadas, inducida por IL-4 y IL-2, Defrance et al (89) observaron que, en general, IL-2 provocaba niveles más altos de incorporación de timidina que IL-4. Lo curioso era que la respuesta de células preactivadas (por anti-IgM o SAC) a estas dos linfoquinas, dadas conjuntamente, era menor que la respuesta a IL-2 sola (con tal que las linfoquinas se den a concentraciones optimas). Los cultivos contenian > 95% células B y células T apenas detectables.

Cuando los blastos B, obtenidos por preincubación con anti-IgM o SAC (staphilococus aureus strain Cowan) eran tratados durante otras 24 horas con o sin IL-4 (recombinante) y entonces recultivados durante otras 72 horas con IL-2,

también tenia lugar una reducción de la proliferación por efecto del tratamiento con IL-4.

Si en lugar de blastos B purificados, se usaban linfocitos B en reposo que eran preincubados con o sin IL-4 antes de posterior tratamiento con IL-2 y anti-IgM, se mantenia la capacidad normal de respuesta. Sin embargo, la adición de IL-4 durante este segundo periodo de cultivo reducia la proliferación.

Esto indica que el efecto inhibidor requiere de una acción combinada de IL-4 con otra señal suministrada en el proceso de activación por anti-IgM o SAC.

El hecho de que la preincubación con IL-4 de blastos B sea efectiva en reducir respuesta proliferativa sugiere que su acción está mediada por células supresoras ya que tras el periodo de preincubación la suspensión celular es lavada y posteriormente se añade únicamente IL-2. Por otra parte, los experimentos usando linfocitos B en reposo muestran que si bién IL-4 no tiene efecto supresor en estas condiciones, sí lo tiene cuando en el segundo periodo de cultivo se añade una señal activadora adecuada (anti-IgM). Entonces la supresión ocurre inmediatamente, lo que sugiere que no se requiere un periodo de expansión del "pool" de células supresoras.

Un hallazgo adicional interesante en este sistema es que IL-4 (o las células supresoras inducidas por IL-4) suprime únicamente la proliferación celular pero no la diferenciación

(la producción de anticuerpos no está deprimida). Finalmente hay que decir que la subpoblación B susceptible a la acción de IL-4 es la $CD25^+$. Las células $CD25^-$ no proliferan en respuesta a IL-4, IL-2 o una combinación de ambas (89).

Supresión inducida por LPS y fenómeno de inhibición dependiente de densidad en células esplénicas estimuladas por LPS.

Hoffmann et al (90) observaron que LPS dado simultáneamente con el antígeno eritrocitos de cordero (SRBC) estimulaba la producción de anticuerpos anti-SRBC en cultivos de células esplénicas procedentes de ratones timectomizados e irradiados o de ratones atímicos (nude) pero deprimia la respuesta a SRBC en cultivos de esplenocitos procedentes de ratones normales. La adición de LPS después de administrar el antígeno potencia la respuesta pero solo si LPS no ha sido administrado previamente. Esta diferencia de comportamiento según hubiera o no células T presentes en el cultivo les hizo pensar que LPS interferia con la cooperación T-B, bién haciendo a las células B incapaces de recibir señales "helper" de las células T, bién impidiendo la asociación de componentes celulares que cooperan en la respuesta a SRBC. Más tarde el mismo grupo describió la inducción de células supresoras B inducidas por LPS (91) con lo que retrospectivamente puede darse a sus anteriores hallazgos

una interpretación distinta de la ofrecida en su dia. En efecto, no parece legitimo implicar a las células T (o a la cooperación T-B) por el hecho de que no se obtenga supresión en ratones atímicos ya que SRBC es un antígeno timo-dependiente. La posible supresión de la respuesta a esta clase de antígenos no puede detectarse en ratones atímicos ya que éstos solamente pueden originar una respuesta policlonal, como la inducida por LPS, frente a esos antígenos. Por otra parte, se veia en las gráficas que esa respuesta policlonal a SRBC era menor que la respuesta específica de los ratones normales inducida por el antígeno solo. Esto podría deberse a una mayor eficacia de la estimulación de células B a través de la acción de células T "helper" que a través del estimulo suministrado por LPS, pero podria igualmente deberse a la presencia simultanea en los cultivos de esplenocitos de ratones atímicos de células supresoras y células proliferantes. En este último caso, las células supresoras B inhibirian directamente a otras células B sin intervención de células T.

OBJETIVOS.

El principal objetivo de esta tesis ha sido demostrar la realidad de un circuito supresor constituido por células B activadas de forma policlonal que inhiben la respuesta proliferativa de otras células B o de las propias células B activadas. El agente usado para activar policlonalmente ha sido lipopolisacárido de Escherichia Coli (LPS). Hasta la fecha se ha demostrado que las células B supresoras inducidas por LPS inhiben la respuesta de células esplénicas totales a antígenos como eritrocitos de cordero (SRBC) pero no se ha investigado si la propia respuesta proliferativa inducida por el mitógeno es susceptible de inhibición por estas células. Tampoco se conocen bién las condiciones que favorecen la aparición de estas células. El papel de algunos factores, como la densidad de cultivo, es por el momento oscuro. En una comunicación (91), la producción de anticuerpos frente a SRBC fué incrementada o inhibida por LPS dependiendo de la concentración de cultivo y de la cepa de ratón usada. En las cepas con baja respuesta a LPS, éste mitógeno estimulaba la respuesta de los cultivos sembrados a baja densidad, pero el aumento de la concentración de cultivo determinaba que LPS actuara inhibiendo la respuesta.

La existencia de una relación inversa entre concentración de cultivo y magnitud de la respuesta a LPS habia sido reconocida anteriormente (92) aunque la significación de este

hallazgo no fué explorada. Se vió que proliferación y producción de anticuerpos cuando se computaban por célula sembrada eran menores en los cultivos sembrados a mayor concentración. Aunque explicaciones triviales como mayor consumo de nutrientes en los cultivos a mayor concentración o efectos de contacto podrian dar cuenta de este fenómeno, una atractiva posibilidad era que las células B supresoras fueran responsables del mismo. Por supuesto se requeriria que las células supresoras B fueran capaces de inhibir la respuesta policlonal a LPS. Así pués, en esta tesis hemos intentado examinar la existencia de un circuito supresor extremadamente simple, formado por células B activadas por LPS que inhibieran la proliferación inducida por el propio LPS, y también examinar si este circuito supresor podia dar cuenta del fenómeno de inhibición de proliferación dependiente de densidad. Pensamos que este tipo de supresión, aparte de que pueda operar en la regulación de algunas respuestas inmunes, puede ser análogo al de otros sistemas, distintos del sistema inmune, ya que en estos no se han descrito subpoblaciones con la misión de regular a otros componentes celulares, y por tanto, cualquier regulación deberia hacerse dentro de una población homóloga. De hecho, un mecanismo homeostático de inhibición dependiente de densidad se halla presente en cultivos de fibroblastos y su perdida correlaciona estrechamente con el establecimiento de

la transformación neoplásica.

Esto último nos conduce al tercer objetivo de esta tesis: el estudio del fenómeno de inhibición de proliferación dependiente de densidad en tumores linfoides. Hemos intentado comprobar si, como es el caso en los fibroblastos transformados, los linfocitos tumorales han sufrido la perdida de este mecanismo de inhibición.

MATERIAL Y METODOS.

2.1 TECNICA GELATINA-HAPTENO PARA SEPARACION DE LINFOCITOS B ESPECIFICOS DE HAPTENO (93).

Acoplamiento del hapteno (TNP) a gelatina.

Material:

Gelatina (Difco), TNBS (2,4,6,Trinitrobencenosulfónico trihidrato,$(NO_2)_3\ C_6\ H_2\ SO_3\ H.\ 3H_2\ O$) (Fluka AG), carbonato sódico ($CO_3\ Na_2$), bolsa de diálisis, PBS, ácido acético.

Procedimiento:

Preparar buffer carbonato: Utilizamos 25 cc de carbonato sódico 0,2 M.

$$0,2 = \frac{\text{peso/p.m.carbonato(106)}}{0,025\ l} \qquad \text{peso}=0,53\text{grs}$$

530 miligramos de carbonato sódico se disolvieron en 25 cc de agua ajustando pH a 9 de forma que no se altere la molaridad.

Se disuelve la gelatina en este buffer a concentración final aproximada del 10% (en nuestro caso 2,3 grs de gelatina

fueron disueltos en 25 cc de buffer carbonato).

Calentar para disolver añadiendo bolitas de vidrio para evitar ebullición demasiado vigorosa. Una vez disuelto dejarlo en estufa a 37° C.

Pesar 25 mgs de TNBS y añadir a la solución de gelatina. Dejar reaccionar a 37° C durante 1 hora aproximadamente en la oscuridad. Después dializar contra agua destilada hasta que desaparezca el color amarillo. La diálisis debe llevarse a cabo a 37° C. La cantidad de TNBS utilizada puede ser mayor.

A continuación se puede liofilizar para después disolver 2,5 grs de gelatina-TNP polvo en 100 cc de PBS.

Nosotros obviamos este paso por lo cual medimos el volumen final de la suspensión gel tina-TNP tras diálisis que resultó ser 40 ml. Puesto que habiamos partido de 2,3 grs de gelatina nuestra solución contenia 2,3/40=57,5 mgs/ml. Esta concentración debe ser diluida 2,3 veces (57,5/25=2,3) para llegar a una concentración de 25 mgs/ml (2,5%). Por tanto 10 ml de nuestra solución hapteno-gelatina fueron llevados a un volumen total de 23 ml con PBS.

Recubrimiento (coating) de placas de Petri con hapteno-gelatina.

La solución anterior puede guardarse en frigorifico con lo

cual gelifica o usarse inmediatamente. La preparación gelificada se calentará brevemente en estufa para que funda. Una vez en estado liquido se vierte en placas de petri estériles (de 5 cms de diámetro). Se vierten aproximadamente 1-1,5 ml por placa con pipeta estéril procurando que se distribuya uniformemente y sin formación de menisco (con pipeta pasteur estéril se quita liquido del borde si es necesario para eliminar el menisco). Todo esto debe llevarse a cabo en cámara fria y tratando de maximizar las condiciones de esterilidad. Finalmente las placas petri se colocan en posición horizontal dejando transcurrir un tiempo para que se produzca la gelificación.

Después se lava con PBS hasta que desaparezca el color amarillo. Se hace a continuación un lavado con ácido acético 0,1 M durante 15 minutos y de nuevo varios lavados con PBS hasta que no haya trazas de color amarillo en el liquido de lavado. Tras esto pueden dejarse las placas petri en PBS hasta el momento de añadir las células normalmente al dia siguiente.

Preparación de suspensiones celulares.

Material:

Buffer de lisis de glóbulos rojos. Hemos usado

alternativamente con análogos resultados una solución 0,15 M de cloruro amónico en 50 mM Tris-clorhidrico pH 7, ó bien el suministrado por Ortho Diagnostic Systems que contiene: Cloruro amónico 8,26 gr/litro. Bicarbonato potásico 1g/litro. EDTA tetrasódico 0,37g/litro.

Buffer de baja fuerza iónica. Contiene 55,5 grs D-glucosa anhidra. 61 grs D-glucosa monohidrato. 111 ml PBS. 1000 ml agua bidestilada.

Pipetas pasteur con algodón en la punta previamente esterilizadas.

Medio de cultivo, PBS.

Procedimiento.

Se efectúa disociación de bazos de varios ratones en buffer de lisis de glóbulos rojos. Se centrifuga y se desecha el buffer procurando que quede el mínimo posible.

Se resuspenden las células en tampón de baja fuerza ionica. Esta suspensión se filtra en pipetas pasteur estériles con algodón en su interior situado inmediatamente por encima de la constricción. Esto elimina las células muertas las cuales parece ser que secretan algún producto que favorece la adhesión inespecífica de los linfocitos a la gelatina.

Las células esplénicas se separan del tampón de baja fuerza iónica por centrifugación y se resuspenden en PBS.
Simultáneamente se prepara una suspensión de células del timo de los mismos animales en medio de cultivo.

Separación de linfocitos B específicos de hapteno.

La suspensión celular obtenida anteriormente se ajusta aproximadamente a $33x10^6$ células/ml en PBS. Se añade 1 ml de esta suspensión a cada placa de petri preparada como se ha descrito en cámara fria, incubándose durante 15 minutos con agitacion continua si se dispone de plataforma adecuada o bién manualmente cada 5 minutos. Después se invierten las placas petri para arrojar la suspensión celular y se lava 5 veces con PBS con objeto de desechar las células no adheridas. Se deja al final un pequeño volumen de PBS y se llevan las placas de petri a la estufa a 37° C. En tan solo 2 ó 3 minutos el gel funde recogiéndose en tubos cónicos de centrífuga, recuperándose las células por centrifugación. Normalmente no se ve a simple vista el sedimento celular por lo que debe eliminarse el sobrenadante con pipeta pasteur dejando tan solo en el tubo un volumen de 0,2-0,3 ml. De éste se toman 10 ul para contaje celular.
Para el estudio de la cinética de producción de anticuerpos anti-hapteno por estimulación con LPS, éstos linfocitos

específicos fueron añadidos en volumenes de 10 ul ó 30 ul a pocillos de cultivo conteniendo 10^6 timocitos como células "filler" en 200 ul de medio de cultivo con LPS a concentración de 100 ug/ml.

Técnicas para la determinación de células productoras de anticuerpo (células formadoras de placas).

Preparación de glóbulos rojos de cordero acoplados a TNP (94).

Material: eritrocitos de cordero, tampón caccdilato, TNP (trinitrobencenosulfónico), glicina, PBS o salino.
Tampón cacodilato: 60 grs cacodilato sódico/1000 ml H_2O.
Preparamos 20 ml. Necesitamos 1000/60=x/20, x=1,2 grs.
Puesto que teniamos cacodilato trihidrato (p.m.=214), debemos hacer una corrección 160/1,2=214/x, x=1,6 grs.
Disolvemos 1,6 grs en 20 ml H_2O destilada, ajustando al mismo tiempo el pH a 7 con ClH concentrado.
Lavar los glóbulos rojos de cordero 3x o hasta que no aparezcan trazas de hemólisis, en PBS o suero salino.
TNP (TNBS): 10 a 40 mgs por 1 ml de glóbulos. Hemos escogido una cantidad baja de TNP para tener un grado bajo de densidad de TNP en membrana globular con lo cual se detectan principalmente las placas de alta afinidad.

Se disuelven 10 mgs de TNP en 3,5 ml de tampón cacodilato. Todas las reacciones, una vez disuelto el TNP deben realizarse en la oscuridad (tubo de ensayo envuelto en papel de aluminio). Se añade esta solución a 1 ml de glóbulos. Se mezcla bién y se dejan 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Después se para la reacción añadiendo una pequeña cantidad de glicina (1 mg por mg de TNP aproximadamente). Se agita para dispersar la glicina. A partir de este momento no es necesaria la protección de la luz. Se lava con PBS. 3x o hasta que no se vea color amarillo en el sobrenadante, centrifugando a 1400 r.p.m. aproximadamente.

Hasta el momento del ensayo, los glóbulos-TNP se guardan en frio (4° C) con un pequeño volumen de PBS o salino. No deben usarse cuando hayan transcurrido más de 6-7 dias desde que se hizo el acoplamiento. Para el ensayo se toman glóbulos del sedimento compacto.

Absorción de complemento.

Se toma un alicuoto del sedimento compacto de glóbulos (antes de acoplamiento) y se mezcla con complemento en proporción 1:10 vol glob:vol comp. Se resuspenden los glóbulos. Se deja 30 minutos en cámara fria (4° C). Después se centrifuga también en frio, recogiendose el sobrenadante y despreciando

el sedimento de glóbulos.

Técnica de Cunningham para enumerar células secretoras de anticuerpos (95).

Se utilizan portaobjetos que deben ser lavados exhaustivamente con H_2O destilada, alcohol y de nuevo H_2O. Se forman dos cámaras en los portas mediante cinta adhesiva adherente de doble cara, simetricamente colocada en el centro y los extremos.

Medimos el volumen de las cámaras encontrando que tenian 70 ul por cámara.

Los volúmenes de reactivos que se han recomendado para cámaras de 200 ul son: suspensión de células 150 ul; anti-IgG 20 ul (para determinación de placas indirectas, es decir, células secretoras de IgG que en nuestro caso no era necesario determinar); glóbulos rojos-TNP al 16% 20 ul; complemento de cobaya absorbido 10 ul.

Estas cifras, adaptadas a una cámara de 70 ul y sin determinación de placas indirectas son: suspensión de células 59,5 ul(60) en RPMI; glóbulos rojos-TNP al 16% en RPMI 7 ul; complemento de cobayo 3,5 ul.

Los dos últimos volúmenes no son accesibles a las pipetas de

que disponemos, graduadas de 10 ul en adelante. Por tanto, usamos un volumen doble de glóbulos pero partiendo de una suspensión al 8% y un volumen triple de complemento (10,5) pero partiendo de complemento diluido previamente 1/3 en RPMI. El volumen de la suspensión de células se ajustó, por consiguiente, a 45,5 ul (70-14-10,5).

También se prepara una mezcla de relleno para el caso de que aparezcan cámaras con capacidad superior a 70 ul en las que quedarán espacios vacios trás poner los reactivos. Esta mezcla contiene las mismas proporciones anteriores, excepto que el volumen correspondiente a las células contiene solo RPMI.

Procedimiento.

Se centrifugan las células a baja velocidad (500 r.p.m., 5 minutos), colocando directamente en la centrifuga las microplacas de 96 pocillos (0,2 ml por pocillo). Se absorbe el sobrenadante con pipeta pasteur y se resuspenden las células en 45,5 ul de RPMI.Después se añade el complemento (a dos pocillos) y finalmente los glóbulos a uno de ellos, resuspendiendo todo ello rápidamente y cargándolo en una de las cámaras con la pipeta pasteur. Después de cargar la segunda cámara se sellan los bordes sumergiendolos ligeramente en un baño de cera fundida que se tiene preparado

al efecto.

La cera solidifica con solo retirar los portas, entonces se dejan en posición horizontal en estufa a 37° C, durante 1 hora. Al cabo de este tiempo pueden observarse las placas de hemolisis contándose por iluminación indirecta con ayuda de una lupa.

2.2 DETERMINACION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS POR LA TECNICA DE PROTEINA A (96).

Acoplamiento de proteina A a glóbulos rojos de cordero.

Lavar glóbulos rojos de cordero 3x en 0,9% ClNa.

Disolver cloruro de cromo ($CrCl_3$) en 0,9% ClNa. La cantidad de $CrCl_3$ puede oscilar de $4x10^{-5}$ M (según algunos) a $2,5x10^{-4}$. Nosotros hemos usado esta última. Esta solución debe ser recientemente preparada.

Disolver proteina A en 0,9% ClNa, 0,5 mgs/ml.

Mezclar 1 volumen de la solución de proteina A a 10 volúmenes de la solución de $CrCl_3$. Añadir 1 volumen de glóbulos rojos compactos.

Se agita para mezclar bién y se deja en incubación durante 1 hora a temperatura ambiente (ó 30° C), después de lo cual se lava una vez con 0,9% ClNa y 2 veces con BSS o RPMI.

Un procedimiento alternativo es:

0,5 mg proteina A en salino (guardar en frio).

50 ul solución "stock" de $CrCl_3$.

10 ml salino

1 ml glóbulos rojos de cordero, lavados 3x en salino.

Mezclar en un tubo:

10 ml salino y 50 ul solución "stock" de $CrCl_3$ para llegar a una solución $2,5 \times 10^{-4}$ M de $CrCl_3$.

Mezclar en otro tubo:

solución de proteina A 1 ml y eritrocitos de cordero compactos 1 ml.

A continuación mezclar ambos tubos. Mantener a 30° C aproximadamente durante 1 hora, mezclando cada 15 minutos.

Determinación de placas.

Material.

Glóbulos rojos de cordero acoplados a proteina A, diluidos al 25-30% en RPMI o BSS.

Agar (Bacto Difco). Preparar inmediatamente antes del ensayo una solución al 0,5% de agar en BSS conteniendo 0,75 mgs/ml DEAE-dextrano (dietilaminoetil-dextrano)(neutraliza poder hipocomplementizante del agar).

Complemento de cobayo absorbido con glóbulos rojos de

cordero, disuelto en BSS en proporción 1:4 (la dilución más apropiada puede establecerse por titulación)

Antisueros. Se usan inmunoglobulinas IgG de conejo con especificidad contra los diferentes tipos o subtipos de inmunoglobulina de ratón. Estos antisueros se obtuvieron de Bionetics, USA y fueron empleados a una dilución 1:100 en BSS. Puede ser necesario estimar la dilución apropiada por titulación.

BSS (solución salina balanceada): Cloruro calcico 0,14 g/litro; cloruro sódico 8 g/litro; cloruro potásico 0,40 g/litro; sulfato magnésico ($SO_4Mg.7H_2O$) 0,20 g/litro (0,8mM); cloruro magnésico ($Cl_2Mg.6H_2O$) 0,20 g/litro (1 mM); fosfato monopotásico 0,06 g/litro (0,4 mM); fosfato bisódico ($PO_4HNa_2.2H_2O$) 0,24 g/litro (1,4 mM).

Procedimiento.

Hay que disponer de un baño a 45° C, donde se coloca una gradilla con los tubos de ensayo conteniendo cada uno 300 ul de la solución de agar.

Se lavan los linfocitos y se resuspenden en BSS frio.

Se toman 20 ul de la suspensión de glóbulos rojos-proteina A en BSS, 100 ul de la suspensión de linfocitos diluida convenientemente en BSS, 20 ul de la solución de antisuero y 20 ul de solución de complemento (1 a 4 en BSS). Esta

mezcla se añade rápidamente a los tubos con agar en el baño a 45° C, se agita ligeramente para mezclar y se vierte el contenido sobre placas de Petri de 9 cm de diametro, procurando obtener una distribución uniforme. Una vez el agar ha solidificado, se llevan las placas a una estufa a 37° C, con atmosfera húmeda, donde se mantienen durante 5-6 horas, tiempo requerido para la aparición de las placas de hemólisis.

En lugar de placas de Petri, el ensayo puede llevarse a cabo en cásmaras formadas en portaobjetos según la técnica de Cunningham con lo cual no es necesario el soporte de agar. Para una cámara de 200 ul pueden usarse los distintos reactivos en la proporción siguiente:

100 ul suspensión celular; 50 ul glóbulos-proteina A (al 25% en BSS o RPMI); 25 ul antisuero; 25 ul complemento. Cada componente puede diluirse en BSS o en RPMI.

2.3 AUTORADIOGRAFIA.

Las células esplénicas fueron cultivadas en placas de Linbro en un volumen de 1 ml/pocillo y estimuladas con LPS (50 ug/ml). A los tiempos indicados se añadió 3-H Timidina (1 uCi/ml). Después de 30 minutos de incubación, las suspensiones celulares fueron lavadas en PBS, mezcladas en un tubo de ensayo en una mezcla de ácido acético glacial y

metanol (1:3) y una gota de esta suspensión se dejó caer y secar al aire sobre un portaobjetos.

Los portaobjetos deben estar extremadamente limpios, si es necesario incluso recurriendo a mezcla crómica para limpiarlos.

Antes de proceder a la autoradiografia, los portaobjetos con las células fijadas fueron tratados con ácido tricloroacetico al 5% a 2° C durante 1 hora para eliminar el exceso de timidina libre. Los portas fueron recubiertos con emulsión Ilford Nuclear Research tipo G-5 a 40° C y después de exposición durante 6 dias en refrigerador (en una caja de madera herméticamente cerrada con material higroscópico, "bluegel=silicona con indicador de humedad), se procedió a revelado con revelador G-150 (X-ray developer, Agfa Gevaer) y posterior fijación (X-ray fixer, G-334, Agfa Gevaer).

Tras un tiempo para que los portas se secaran, fueron teñidos con toluidina.

Los detalles de la técnica y materiales de revelado y fijación son los siguientes:

Ilford Nuclear Research Emulsion, en forma de gel. Tipo G.5, tamaño "A", 50 cc.

Baño con agua a 40° C, en cámara oscura.

H_2O dd a 65° C (comprobar con termómetro)

Método:

Verter H_2O a 65° C sobre el gel, aproximadamente proporciones

iguales de agua y gel (el gel debe quedar cubierto con agua). Así, la temperatura queda finalmente a 40° C, lo que proporciona un mejor resultado.

Agitar con varilla de vidrio y verter la mezcla en una cubeta. Colocar ésta en el baño.

Los portas se sumergen, entonces, en la emulsión. Después, se deja que se sequen durante 1 dia en la habitación sin luz.

Poner los portas en caja oscura con material higroscópico en el refrigerador durante 6 dias (pueden tomarse muestras preferentemente de otra caja preparada al efecto para estimar mejor el tiempo de exposición).

Notas. La emulsión debe ser hecha desde el comienzo lo suficientemente espesa. No cambiar, a posteriori, las proporciones de agua y gel.

Sumergir los portas una segunda vez puede producir una superficie irregular.

Revelado y fijación.

Revelador (X-ray developer, G-150, Agfa Gevaer) 1 volumen + 4 volúmenes agua de grifo. Debe ser recientemente preparado.

Fijador (X-ray fixer,G-334, Agfa Gevaer)

Sumergir en revelador 3,5 minutos. Enjuagar con agua de grifo y sumergir en fijador durante 10 minutos

Dejar secar y teñir con azul de toluidina.

Solución de toluidina:

3,6 g Na_2HPO_4 $2H_2O$ (o 2,87 g no hidratado). Disolver en 200 cc agua destilada. Filtrar la solución. Añadir 0,1% azul de toluidina en polvo.

La solución debe ser filtrada inmediatamente antes de usarla.

2.4 CITOMETRIA DE FLUJO.

Las células usadas para determinación de contenido de DNA fueron lavadas en PBS y fijadas en etanol frio. Las células fijadas fueron lavadas en tampón Tris-EDTA, junto con RNAsa (1 mg/ml,Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Entonces, después de tratamiento con pepsina, una suspensión de núcleos celulares fué teñida, usando bromuro de etidio en tampón Tris-EDTA, con una molaridad de 385 mOsm. El contenido en DNA de los núcleos celulares fué analizado por un citofluorómetro de flujo rápido ICPII (Phiwe, Alemania Occidental) con un flujo de hasta 1000 células por segundo. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 455-490nm y 590-630nm respectivamente. Las mediciones de fluorescencia de células individuales fueron resueltas y almacenadas con ayuda de un canal-analizador 256.

La proporción de células en diferentes fases del ciclo celular (G1, S y G2+M) fué determinada a partir de las áreas de los histogramas respectivos asumiendo una función de Gauss de los picos de G1 y G2+M, y atribuyendo la parte restante

del histograma a las células en fase S. Alrededor de 30.000 células fueron medidas. El coeficiente de variación del pico de G1 fué 2% aproximadamente.

Para determinar el porcentaje de macrófagos se utilizó el anticuerpo monoclonal OKM14 (Ortho Diagnostics) marcado con isotiocianato de fluoresceina (FITC). Previamente se comprobó que ese anticuerpo presenta reactividad con los macrófagos de ratón. Para el estudio de los linfos B de ratón se utilizó fragmentos Fab anti IgG + anti IgM marcados con FITC.
En ambos casos fueron mezclados 100 microlitros de la suspensión celular con 10 microlitros de anticuerpo, incubándose en oscuridad a 4° C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 1300 r.p.m. y las células fueron resuspendidas en 1ml de PBS.
El análisis, en este caso, se llevó a cabo en un citómetro de flujo CYTORON (Ortho Diagnostics) determinando el porcentaje de células fluorescentes al incidir sobre ellas un haz de laser de argón de 488nm.

2.5 ENRIQUECIMIENTO DE CELULAS B.

El anticuerpo monoclonal J1j anti-Thy1.1 fué un regalo del Dr. Carlos Marquez, Departamento de Inmunologia, Universidad Autónoma de Madrid. Células esplénicas fueron resuspendidas a una concentración de $2x10^7$ células/ml en este anticuerpo

diluido 1:6 en BSS ó en RPMI a 4° C durante 30 minutos, después de lo cual las células fueron centrifugadas a 1200 r.p.m. y resuspendidas en complemento de conejo diluido 1:6 en BSS ó RPMI.

Después de una incubación de 40 minutos a 37° C las células fueron centrifugadas, resuspendidas en medio de cultivo y contadas en una cámara de Neubauer. La viabilidad fué determinada por tinción con azul tripán.

2.6 DEPLECION DE MACROFAGOS.

Se llevó a cabo incubando las células esplénicas a una concentración aproximada de 10^7 células/ml en frascos de cultivo de plástico (Nunclon tissue culture flask, 25 cm^2, ó 80 cm^2) durante 1 hora a 37° C en medio de cultivo con 10% suero bovino fetal en una atmósfera húmeda conteniendo 5% CO_2.

2.7 ANIMALES Y LINEAS CELULARES.

Se usaron cepas C57Bl/6, DBA/2, Balb/c, C57Bl.10 y C57Bl.10/ScCr de nuestra propia colonia o donados por otros laboratorios.

Los tumores de estirpe B usados fueron SP2 que es un

hibridoma no secretor derivado de Balb/c y NS1, un mieloma no secretor también derivado de Balb/c.

2.8 CONDICIONES DE CULTIVO.

Células esplénicas fueron obtenidas en condiciones estériles, lavadas en BSS y cultivadas en RPMI 1640 suplementado con 10% suero bovino fetal, 1% penicilina y estreptomicina (1000 unidades de cada por ml), $5x10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol (2-ME) y 1% L-glutamina (2000mM) (Flow Laboratories, Irvine, Scotland). Este medio fué tamponado con 2g/1000ml bicarbonato sódico y/o Hepes 20mM.
Los cultivos fueron incubados a 37° C en una atmósfera de 5% CO_2. Los cultivos fueron, excepto donde se indique, en triplicado en un volumen de 0,2 ml en microplacas (96 well Costar plates ó 96-well Sterilin, Middlesex,). A menos que se indique las microplacas eran de fondo redondo.

2.9 MITOGENOS.

Para estimular los cultivos se utilizó lipopolisacárido de Escherichia Coli (LPS) 055:B5 (Sigma Chemical Co) (50 microgramos ó 100 microgramos) según se indicará en cada caso.

2.10 IRRADIACION CELULAS.

Las células fueron irradiadas en la Unidad de Cobaltoterapia del Hospital Universitario de Granada, en un aparato marca A.E.C.L., modelo THERATRON. El método de irradiación consistió en colocar las microplacas o los frascos de cultivo conteniendo las células sobre la mesa de tratamiento e irradiarlas con un campo de 30x30 cm^2, del que se evitaban los bordes para homogeneizar la dosis administrada.
Dado el escaso espesor del medio que contiene las células, insuficiente para alcanzar el equilibrio electrónico, se colocó una lámina de metacrilato de 9 mm sobre las placas, con el fin de conseguir el equilibrio deseado. Las células recibieron de 3000 rads.

2.11 ESTADISTICA

Los resultados se valoraron con el test de Student, excepto en el experimento mostrado en Tabla 4 que fué valorado con el test ji cuadrado.

RESULTADOS

1ª PARTE. CELULAS SUPRESORAS INDUCIDAS POR LPS INHIBEN RESPUESTA POLICLONAL A LPS.

3.1 Efecto supresor de células preincubadas e irradiadas.

Células preincubadas en presencia o ausencia de LPS fueron lavadas e irradiadas antes de ser transferidas a cultivos frescos. El periodo de incubación varió en diversos experimentos de 1 a 3 dias. Como control se usaron células no preincubadas que fueron también irradiadas y transferidas a otras células recién obtenidas. Otro grupo control estaba formado por células frescas no irradiadas a los que se añadió medio de cultivo solamente. Todos los cultivos fueron estimulados con LPS. A las 24 horas (ó 32 horas en otros experimentos) después de la transferencia se dió un pulso de timidina tritiada por un periodo de 15 horas ó 4-5 horas respectivamente y las células fueron recogidas a la terminación del pulso de timidina.

Células preincubadas en presencia o ausencia de LPS inhiben la respuesta de células esplénicas frescas a LPS .Células no

preincubadas irradiadas no tienen efecto inhibidor cuando son transferidas a otra población no irradiada estimulada con LPS (Fig. 1).

Para determinar el fenotipo de la célula responsable de la inhibición en este sistema, las células preincubadas fueron tratadas con un monoclonal anti-Thy 1.1 y complemento al comienzo del periodo de preincubación. Otra parte de la población esplénica no fué sometida a tratamiento alguno. De cada una de estas poblaciones, es decir, población enriquecida en células B y población esplénica no fraccionada se hicieron dos alicuotos que se cultivaron durante 2 ó 3 dias con o sin LPS. Al final de este tiempo las células fueron lavadas, irradiadas y añadidas a células recién obtenidas singénicas en la proporción 1 célula irradiada a 3 frescas. Los controles incluian células frescas irradiadas añadidas a frescas no irradiadas y frescas no irradiadas a las que se añade solamente el mismo volumen de medio de cultivo. Se estimuló con LPS a concentración final que varió en diferentes experimentos de 50 a 100 ug/ml. La proliferación producida por el mitógeno fué inhibida por las células preincubadas con o sin LPS. La adición de células no preincubadas no determinó en general un descenso en el nivel de incorporación de timidina por debajo de la incorporación de las propias células frescas no irradiadas cultivadas solas, aunque en algún experimento se ha observado un ligero

efecto inhibidor siempre inferior al causado por células preincubadas. La actividad supresora de las células preincubadas no sólo se mantuvo sino que se incrementó en poblaciones enriquecidas en células B por tratamiento con suero anti-theta y complemento (Figs. 2 y 3). Estos datos indicaban que la supresión estaba mediada por células B. Sin embargo, existia la posibilidad de que se generaran células T supresoras tras varios dias de cultivo in vitro, es decir cabia la posibilidad de que algunos linfocitos T residuales que hubieran sobrevivido al tratamiento con anti-theta y complemento fueran capaces de producir en cultivo una progenie de células T supresoras. Para descartar esta eventualidad repetimos el experimento pero realizando el tratamiento con anti-Thy1.1 y complemento al final del periodo de preincubación y no a su inicio como en los experimentos anteriores. Los resultados fueron análogos al primer experimento demostrándose un incremento de supresión tras eliminación de las células T en poblaciones preincubadas con o sin LPS (Figura 4).

Los macrófagos van desapareciendo gradualmente durante el periodo de preincubación. Así tiñendo las células B con un fragmento Fab anti-cadenas pesadas M y G, se vió analizando en un citofluorómetro de flujo que el porcentaje de células teñidas era de 95% tras tratamiento con anti-theta y complemento. Este porcentaje aumentaba al 98,6% cuando a este

tratamiento se unía la incubación en frasco de plástico al cual se adhieren los macrófagos. En algún experimento (Fig. 3) se realizó junto al tratamiento con anti-theta y complemento una deplección parcial de macrófagos por adherencia a plástico.Reducción en el contenido de macrófagos por este procedimiento no disminuyó la actividad supresora. Así pues, aunque la participación de macrófagos residuales no pueda ser completamente excluida, parece que la célula responsable de la supresión de proliferación en nuestro sistema es la célula supresora B descrita por Koenig y Hoffmann(91)

3.2 Efecto de células no irradiadas.

Hemos medido también la capacidad supresora de células no irradiadas preincubadas en presencia o ausencia de LPS, lavadas y transferidas a cultivos de células esplénicas frescas que son estimulados por LPS. La supresión se midió comparando incorporación de timidina en cocultivos de frescas y preincubadas con la incorporación de timidina de la suma de los cultivos componentes sembrados separadamente. La determinación de incorporación de timidina se realizó en dos periodos sucesivos en las siguientes 0-12 horas y 12-24 horas, comenzando a contar tras realizar la transferencia de células preincubadas a células frescas. Se dieron pulsos de timidina también de 0-12 horas y de 12-24 horas.

Puede verse en Figs 5, 6, 7 y 8 que la inhibición causada por células preincubadas tanto en presencia como en ausencia de LPS es similar.

3.3 Efecto de células no respondedoras a LPS.

Los experimentos anteriores muestran que la preincubación favorece la activación de células B que inhiben la respuesta policlonal a LPS. Sin embargo, el papel desempeñado por el propio LPS en este proceso no puede ser aclarado por estos experimentos ya que todas las células que han de ser transferidas (preincubadas con o sin LPS y no preincubadas) entrarán en contacto con LPS en el segundo periodo de cultivo. Para dilucidar la cuestión de si, además de un periodo de preincubación, una señal suministrada por LPS es también necesaria para la consecución de capacidad supresora, hemos hecho uso de una cepa de ratón con un rasgo genético que la hace incapaz de responder a LPS. Existen dos de estas cepas: la C57Bl10/ScCr y la C3H/HeJ que son similares o derivadas de las cepas C57Bl10 y C3H/Tif respectivamente. La primera tiene la ventaja para nuestro propósito de ser completamente idéntica, para todos los genes testados a excepción del gen que controla respuesta a LPS, a su homóloga (aunque no congénica) respondedora a LPS C57Bl.10. En particular son idénticas en región H-2 y en el locus Mls (97). Por lo tanto, las células de estas cepas pueden ser

mezcladas sin que se produzca una reacción de cultivo linfocitario mixto que complicaría la interpretación de los resultados.

Se llevaron a cabo con estas cepas experimentos con un diseño similar a los anteriores. Se preincubaron células esplénicas de la cepa respondedora y de la no respondedora ambas en presencia de LPS. Después fueron lavadas y añadidas por separado a cultivos de células frescas de la cepa respondedora que eran estimuladas con LPS. En paralelo se establecieron cultivos separados de las células preincubadas y de las células frescas respondedoras, estimándose la inhibición por la reducción de incorporación de timidina de los cultivos mezcla comparados a la suma de incorporación de timidina en los cultivos componentes cultivados independientemente.

Puede verse en Fig. 9 que las células preincubadas pertenecientes a la cepa no respondedora no muestran efectos supresores al ser cocultivadas con células de la cepa respondedora mientras la incorporación de timidina en cocultivos de respondedoras está descendida respecto a la suma de los cultivos componentes. También se hicieron experimentos irradiando las células preincubadas de ambas cepas previamente a su transferencia a cultivos de células frescas de la cepa respondedora que a continuación era estimulada con LPS. La inhibición causada por las células

irradiadas de la cepa respondedora es mucho mayor que la causada por las de la no respondedora que no arroja una diferencia estadisticamente significativa respecto al grupo al que se añadieron células no preincubadas (Fig.10). La preincubación de las células de la cepa no respondedora, tanto en presencia como en ausencia de LPS, no confiere a dichas células abilidad supresora.

3.4 Periodo de preincubación necesario para conferir abilidad supresora.

En nuestros experimentos, un periodo de incubación de al menos 24 horas ha resultado necesario para que las células exhiban regularmente capacidad supresora. Sin embargo, un periodo de preincubación excesivamente largo (6 dias) no conduce a la aparición de actividad supresora, tanto en cultivos preincubados en presencia como en ausencia de LPS. (Fig. 11). Durante un periodo de cultivo in vitro tan prolongado es sabido que las células pierden capacidad para ser activadas por mitógenos. Por lo tanto, este resultado habla en contra de una inhibición inespecifica por simple efecto estérico o por toxinas liberadas tras irradiación.

3.5 Implicación de células B supresoras inducidas por LPS en inhibición dependiente de densidad de proliferación inducida por LPS.

El hecho de que LPS pueda estimular células supresoras que inhiben la propia respuesta policlonal a LPS implica que en todos los cultivos estimulados con LPS habrá un balance entre inducción de proliferación y de supresión. El incremento en células susceptibles de ser activadas rapidamente por LPS en un pozo de cultivo con un volumen y superficie prefijados tal como ocurre cuando las células preincubadas son añadidas a otros cultivos inclina ese balance en favor de un relativo incremento de la supresión. Este rasgo caracteriza al fenómeno llamado inhibición de crecimiento dependiente de densidad en el cual los cultivos sembrados a alta concentración celular muestran menor producción de anticuerpo y más baja tasa de proliferación celular que los cultivos sembrados a baja concentración cuando estos parámetros se computan en función del número de células sembradas.

La hipótesis de que células B inducidas por LPS que suprimen la respuesta policlonal a LPS son responsables de este fenómeno conduce a la predicción de que cultivos altamente enriquecidos en linfocitos B exhibirán un efecto de densidad más marcado que cultivos de células esplénicas no fraccionadas ya que como hemos visto mayor concentración de células LPS-respondedoras inclina el balance entre

proliferación y supresión en favor de esta última.

Esta predicción se vió cumplida en los experimentos mostrados en Fig. 12. Puede verse que a alta concentración celular, poblaciones enriquecidas en células B incorporan timidina en cantidad similar a la población esplénica no fraccionada a pesar de que el contenido de las células B respondedoras a LPS ha sido aumentado por un factor de 2,3. A su vez, este resultado confirma que células B activadas por LPS antagonizan la respuesta policlonal a LPS sin intervención de células T.

La deplección de macrófagos por paso sobre placas de plástico o por Sephadex G-10 retardó en la mayor parte de experimentos la aparición del máximo de la curva de incorporación de timidina sin cambiar significativamente su altura absoluta (Fig. 13). Puesto que el fenómeno de inhibición dependiente de densidad es muy sensible a los cambios de concentración, la depleción, aún incompleta, de macrófagos deberia haber conducido a una respuesta policlonal a LPS claramente aumentada si los macrófagos fueran responsables de la inhibición de proliferación en este sistema.

2ª PARTE

4.1 ANALISIS DEL FENOMENO DE INHIBICION DEPENDIENTE DE DENSIDAD EN CULTIVOS ESTIMULADOS POR LPS.

Melchers et al (92) describieron este fenómeno en cultivos linfocitarios in vitro estimulados con LPS, aunque no se detuvieron a analizar la causa del mismo. Su caracteristica definitoria es que el indice de proliferación por célula sembrada en cultivos in vitro estimulados con LPS está inversamente relacionado con la concentración inicial de los cultivos. Esto implica que una mayor fracción de la población celular es activada en los cultivos a menores concentraciones o alternativamente, que a menor concentración los linfocitos experimentan mayor número de ciclos proliferativos tras estimulación mitogénica. Esto último entraña un mecanismo inhibidor de la proliferación cuya naturaleza hemos intentado desvelar en esta tesis.

El efecto inhibidor producido como consecuencia del aumento de densidad de los cultivos se detecta tanto al determinar la incorporación de timidina tritiada por las células lo que

estima el grado de proliferación como al contar el número de células formadoras de placas por cultivo lo que representa el número de células que alcanzan diferenciación a células secretoras de anticuerpos. Ambos parámetros aumentan simultaneamente tras estimulación con LPS por lo que pueden usarse indistintamente para estimar grado de proliferación cuando se trabaja con este mitógeno aislado (92)(y Figs 13, 14, 15). Sin embargo debe señalarse que otros estimulos mitogénicos distintos del LPS aumentan selectiva y diferencialmente uno u otro de estos parámetros. Así p. ej. la exposición de las células a suero anti-cadena pesada M causa proliferación sin diferenciación (98).

Mientras la información proporcionada por el método de incorporación de timidina tritiada se limita a la sintesis total de DNA, la técnica de autoradiografia proporciona una determinación precisa del número de células inducidas tras tratamiento con mitógeno a entrar en fase de sintesis.

4.2 El aumento relativo de proliferación a densidades bajas es debido a un mayor número de ciclos proliferativos.

Para obtener una medida directa de la fracción de células respondiendo a LPS bajo diferentes condiciones de densidad de cultivo preparamos autoradiografias de cultivos sembrados a 10^6 células/ml y 10^7 células/ml a las 24, 48 y 72 horas del inicio del cultivo in vitro. LPS se añadió desde el comienzo.

Al determinar la fracción de células en S en estos intervalos de tiempo obtenemos una estimación de la expansión clonal que ocurre a diferentes concentraciones.

El porcentaje de células en fase S del ciclo tras estimulación con LPS fué más alto en los cultivos sembrados a menor concentración. La diferencia era no significativa a 24 horas. A tiempos posteriores (48 y 72 horas) las diferencias fueron marcadas y significativas con porcentajes más altos de células en S en los cultivos a menor concentración (Tabla 1). Este resultado concuerda con los datos obtenidos por incorporación de timidina pero además pone directamente de manifiesto que la mayor incorporación de timidina en cultivos a menor concentración se debe a la mayor expansión clonal que en ellos ocurre. Si la expansión clonal se impide p. ej. añadiendo colchicina el porcentaje de células en S es similar en los distintos cultivos. Sin embargo por debajo de una concentración de 10^6 celulas/ml aparece un retardo en la entrada en ciclo. Esto lo pusimos de manifiesto con un experimento usando cultivos a concentraciones de 10^7 células/ml y $5x10^5$ células/ml. Se añadió colcemid a estos cultivos (30 nanogramos/ml) y se determinó el porcentaje de células en S por citometria de flujo en muestras tomadas a las 24, 48 y 72 horas. Se observa que, en presencia de colcemid, los porcentajes de células en S son similares a ambas concentraciones a las 48 y 72 horas.

Sin embargo, a las 24 horas la fracción de células en S es significativamente menor en el cultivo a $5x10^5$ células/ml. De hecho a esta concentración el porcentaje de células en S a las 24 horas es incluso menor que el determinado antes del comienzo del cultivo (tiempo 0) (Tabla 2). Este retraso en la activación no se observa en cultivos a una concentración ligeramente superior y por tanto debe atribuirse a un efecto de dilución de mecanismo oscuro. Muy probablemente está en relación con la necesidad de usar células filler en cultivos a muy baja concentración.

4.3 Mecanismos inespecíficos de supresión que es necesario descartar.

Hay varias explicaciones triviales del efecto de la concentración que debemos considerar en primer lugar. Una de ellas es que la cantidad de mitógeno usado fuera limitante de forma que se estableciera una competencia entre células por tener acceso al mismo. Esto se descarta facilmente ya que el fenómeno de proliferación inversamente relacionada con concentración se observa usando dosis muy variadas de LPS. Así, p. ej. la dosis de LPS en experimentos de Figuras 13,14 y 15 fué tan solo de 20 ug/ml mientras que en otros experimentos que se mostrarán se ha llegado a usar dosis de 120 ug/ml sin que varie el patrón de las curvas de crecimiento.

El mayor consumo de nutrientes de los cultivos a alta densidad celular no explica su menor indice de proliferación. Otra explicación seria el agotamiento de nutrientes que podria producirse preferencialmente en los cultivos a alta densidad celular.

Para valorar el papel de los nutrientes en la cinética de proliferación hemos llevado a cabo los siguientes experimentos.

1/ El objetivo de este experimento es averiguar la influencia de la renovación periodica (una vez por dia) de medio de cultivo sobre la cinética de proliferración de células esplénicas estimuladas por LPS (50 microgramos/ml) tanto a alta (10^7 células/ml) como a baja (10^6 células/ml) concentración celular.

Se prepararon cultivos de células esplénicas de ratones DBA/2 hembras a 10^7 y 10^6 células por mililitro. Se sembraron 100 ul de suspensión celular en pocillos (96 well Costar plates) por triplicado con LPS (50 ug/ml). Se añadió timidina marcada (3-HTdR 1uCi/pocillo) y se recolectaron las células 5,5 horas después de cada pulso a las 24, 48 y 72 horas.

Cambio de medio: 75 ul de medio usado fueron extraidos de cada pocillo en dias 0 (5,5 horas después del comienzo del cultivo), 1 y 2, y fueron reemplazados por medio fresco conteniendo LPS (50 ug/ml).

En este experimento se observa (Fig. 17) que las células crecen hasta un punto máximo (que se alcanza en los cultivos a 10^7 células/ml a dia 1 y en los cultivos a 10^6 células/ml a dia 2) y luego descienden. La situación del punto máximo es dependiente de la concentración e indica que cuanto mayor es la concentración más pronto se detiene la proliferación (menor grado de expansión clonal). Esto lo hemos observado ya anteriormente. Aquí, además se demuestra que esto ocurre independientemente de la disponibilidad de un exceso de medio de cultivo (cpm/pocillo de los cultivos con cambio de medio y sin él son similares en el pico de la curva).

Sin embargo, el cambio de medio tiene una acción favorable sobre la proliferación a tiempos posteriores. Mejora ligeramente la respuesta de los cultivos a 10^7 células/ml a dia 2 y favorece la respuesta a dia 3 a ambas concentraciones celulares (Fig. 17).

De este experimento podemos concluir que hay una inhibición temprana dependiente de concentración y que esta inhibición no está producida por agotamiento de nutrientes aunque el agotamiento de nutrientes participe en las fases tardias del cultivo.

La estrategia adoptada en el siguiente experimento trataba de delimitar y separar la fase temprana de inhibición dependiente de concentración de la fase tardia en la que entran en juego los factores nutritivos.

La curvas de crecimiento sugerian que tras un periodo inicial de activación con escasas diferencias debidas a concentración se establecia un equilibrio entre número absoluto de células respondedoras y fracción de células en ciclo. Por tanto en el siguiente experimento nos planteamos cual seria el efecto de dividir un cultivo único tras un periodo de activación inicial en dos cultivos a concentraciones celulares distintas. La hipótesis de trabajo era que habiendo dejado transcurrir ese periodo inicial, el efecto inhibidor de la concentración sobre el nivel de activación se detectaria rapidamente, antes de que existiera una probabilidad de participación de los factores nutritivos. Células esplénicas a 10^7 cel/ml en frasco de cultivo de 5 ml fueron estimuladas con LPS (30 ug/ml) durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo fueron lavadas y resembradas en alicuotos de 200 ul por triplicado a dos concentraciones diferentes: $7x10^6$ células/ml y $3,5x10^6$ células/ml. Se añadió LPS (50 ug/ml) y se midió incorporación de timidina tritiada a intervalos sucesivos de 8 horas durante las siguientes 32 horas. Ya durante las primeras 8 horas se detectó una mayor incorporación de timidina por célula sembrada en el cultivo a menor concentración que persistió en los periodos sucesivos (Tabla 3).

Este experimento pone de manifiesto el establecimiento rápido de un equilibrio entre nivel de proliferación y concentración

celular, detectable desde los momentos iniciales y por tanto independiente del efecto de factores nutritivos.

Los experimentos que permiten descartar el agotamiento de nutrientes como causa principal de la supresión dependiente de concentración hablan al mismo tiempo en contra de otros factores ligados al uso del medio como seria la acidificación. De todas formas hemos realizado curvas de crecimiento de cultivos a diferente concentración usando medios con diferente capacidad tamponante. Estas curvas (Fig. 18) muestran que no puede atribuirse a la diferente acidificación del medio producida por diferentes concentraciones las diferencias en cuanto a indice de proliferación ya que una mayor capacidad tamponante no conlleva una reducción de las diferencias en cuanto a proliferación relativa entre cultivos a distinta concentración. Si la acidificación fuera la causa de esta diferencia, el aumento de capacidad tamponante deberia mejorar preferentemente la respuesta de los cultivos a alta concentración reduciendo las diferencias relativas de indice de proliferación entre cultivos a alta y baja concentración.

Efecto del area de cultivo.

En cambio , hemos encontrado que el area de la superficie de cultivo si afecta al indice de proliferación. En efecto, éste no solo depende del volumen de medio en que un determinado

número de células se encuentran (concentración) sino también de la forma del pocillo en que las células son cultivadas ya que ésta determina un contacto celular más o menos estrecho. Así, cuando se compara proliferación de cultivos sembrados en pocillos de fondo plano o fondo en U, la proliferación es consistentemente más alta en los de fondo plano que son los que permiten un mayor distanciamiento entre células. Tanto el máximo de incorporación de timidina como la incorporación de timidina integrada desde el dia 1 al 4 de una curva de crecimiento son mayores en los cultivos en pocillos de fondo plano (Fig. 19). Esto se vió en las 3 concentraciones testadas en 3 de 3 experimentos. Este resultado habla de nuevo en contra de los efectos inespecificos de nutrientes y subraya la importancia del contacto celular en el mecanismo de supresión, o bién sugiere, que en la supresión intervenga un factor de acción a corta distancia.

La reducción del indice de proliferación de los cultivos a alta concentración con respecto a los de baja concentración no se debe a un efecto estérico de contacto inespecífico sino que es causada por células activadas por LPS.

Se ha sugerido (99) que la inhibición de proliferación dependiente de concentración de células esplénicas seria similar al fenómeno de inhibición dependiente de densidad que se observa en cultivos de fibroblastos no transformados. Para

explicar este último se han postulado dos hipótesis alternativas. La primera es la competencia por nutrientes que ya hemos considerado. La segunda es que el contacto celular generaria señales negativas supresoras de la proliferación. Esta última alternativa es compatible con muchos de los resultados hasta aqui expuestos. Sin embargo, una interpretación rigurosa de la hipótesis del contacto conduciria a negar cualquier influencia de la activación o incubación previas. En todo caso estas serian necesarias como requisito para alcanzar un número suficiente de células para permitir el contacto. Seria el efecto estérico, de apelotonamiento o "crowding" el único responsable de la supresión. Por tanto las células recién obtenidas deberian tener efectos supresores análogos a las preincubadas siempre que alcanzaran la misma concentración por cultivo. Sin embargo, algunos de los experimentos anteriormente expuestos y otros que se describirán más adelante ponen de manifiesto un incremento del efecto supresor como consecuencia de la activación o incubación previas que no depende del aumento del número de células.

El siguiente experimento demuestra que la inhibición no debe a un efecto estérico inespecifico ya que el contacto pasivo simple de las células permite un crecimiento no inhibido mientras que se produce inhibición cuando en el mismo número absoluto de células una mayor fracción de las

mismas es activada por LPS. El objetivo de este experimento era,pues, comparar nivel de proliferación en cultivos a concentraciones celulares idénticas pero en los que se introducen diferencias en cuanto a fracción de células activadas por mitógeno. Esto se consigue cocultivando células de las cepas de ratones C57Bl10 y C57Bl10/ScCr que difieren solamente en la capacidad de respuesta a LPS siendo idénticas en el resto del genoma. Explotando estas caracteristicas hemos demostrado que 10^6 células esplénicas de la cepa respondedora C57Bl10 cocultivadas con $9x10^6$ células de la cepa no respondedora C57Bl10/ScCr en 1 ml, proliferan en el mismo grado que un cultivo a la concentración de 10^6 células respondedoras por ml, sin que les afecte por tanto una variación de magnitud 10 en la concentración del cultivo. La implicación es que es el número de células activadas y no el número de células totales lo que determina el grado de supresión.

En este experimento hemos recurrido a una estimación del grado de expansión clonal mediante determinación secuencial de la fracción de células en S por autoradiografia con lo que se obtiene una medida directa de la proliferación por célula sembrada de la cepa respondedora con solo restar del porcentaje de células en S las correspondientes al background de células no respondedoras estimado en un cultivo paralelo.

El diseño experimental es el siguiente:

Se preparan suspensiones de células esplénicas de la cepa C57Bl10 (LPS respondedora) a 10^6 células/ml (grupo A) y 10^7 células/ml (grupo C) y de C57Bl10/ScCr (LPS no respondedora) a 10^6 células/ml (grupo B) y 10^7 células/ml (grupo D). Además, se cocultivan en 1 ml 10^6 células LPS respondedoras + $9x10^6$ LPS no respondedoras (grupo E). Este grupo será comparado con una suspensión celular (grupo F) que se preparará tomando alicuotos en proporción 1:9 (vol:vol) de los grupos C y D respectivamente. La mezcla de las células de ambos grupos se hace inmediatamente antes de realizar la citocentrifugación o la extensión en porta para proceder a autoradiografia y después de los 30 minutos de incubación de los cultivos con timidina tritiada que antecede a la extensión en porta o citocentrifugación.

Todos estos grupos fueron estimulados con LPS (50 ug/ml) desde el comienzo de los cultivos. Otro grupo (grupo G) conteniendo 10^6 células respondedoras + $9x10^6$ células no respondedoras en 1 ml no recibió LPS. Este grupo es un control para mostrar que no ha ocurrido activación a consecuencia de una reacción de cultivo linfocitario mixto. A las 24, 48 y 72 horas suspensiones celulares correspondientes a los diferentes grupos fueron incubados con timidina tritiada durante 30 minutos y se prepararon extensiones celulares en portas por citocentrifugación, se fijaron las células y tras 6 dias de exposición se determinó

el porcentaje de células en fase S de cada grupo.

La comparación de la fracción de células en fase S entre los grupos E y F deberia dar cifras similares si la inhibición de la proliferación depende solamente de la concentración celular ya que ambos grupos proceden de cultivos sembrados a la misma concentración celular y, por las proporciones tomadas en el momento de preparar el grupo F, ambos grupos tienen la misma proporción de células resppondedoras y no respondedoras. Si, por el contrario, la inhibición es determinada por el número de células activadas, en el grupo E ($1x10^6$ células respondedoras + $9x10^6$ células no respondedoras) se producirá expansión clonal de las 10^6 células respondedoras en el mismo grado que si esas 10^6 células estuvieran aisladas. Naturalmente, un número equivalente de células respondedoras del grupo F tomado del cultivo a 10^7 (grupo C) no habrán experimentado el mismo grado de expansión clonal ya que en grupo C el número total de células respondedoras es 10 veces mayor. Si los hechos ocurren de acuerdo con esta segunda posibilidad deberá existir un mayor porcertaje de células en S en grupo E comparado con grupo F y las diferencias corresponderán aproximadamente a las fórmulas:

$$\frac{10 \times A + 90 \times D}{100} = E \qquad \frac{10 \times C + 90 \times D}{100} = F$$

A, C, D, E, F= % células en S en cada uno de estos grupos.

Puesto que sabiamos por determinaciones previas que el porcentaje de células en S difiere a dia 2 notablemente entre un cultivo respondedor a 10^6 y otro igualmente respondedor a 10^7 cel/ml, esperábamos que las cifras dadas por las anteriores fórmulas pudieran proporcionar diferencias estadisticamente significativas entre los grupos E y F, siempre que la activación de fondo de las células no respondedoras fuera baja.

Los datos de la Tabla 4 satisfacen esas expectativas y demuestran que es el nivel de activación (número total de células activables o respondedoras en un volumen dado) más que la simple concentración celular el parámetro que hay que relacionar con la inhibición.

El estudio estadistico de los datos de la Tabla 4 usando el test ji cuadrado muestra lo siguiente:

a/ La diferencia entre los grupos E y F no es estadisticamente significativa los dias 1 y 3 pero es muy

significativa ($p<0,001$) cuando se esperaba que fuera significativa, es decir, a dia 2.

b/ El grupo G consiste en una mezcla de células respondedoras y no respondedoras en proporción 1:9 pero sin LPS. Este grupo muestra que no ha habido reacción de cultivo linfocitario mixto (no hay diferencias significativas entre este grupo y los grupos B a dias 1 y 2, y D a dias 1, 2 y 3.

c/ Hay diferencias altamente significativas entre grupos sembrados a distinta concentración (grupo A comparado a todos los otros grupos a dias 1, 2 y 3).

d/ Hay diferencias debidas a diferente concentración dentro de los cultivos no respondedores que se hacen aparentes con un periodo largo de cultivo (dia 3). Esto es probablemente el resultado de la respuesta a factores mitogénicos del medio de cultivo con una cinética más lenta que la respuesta a LPS (grupos B y D).

e/ Finalmente, hay, por supuesto, diferencias altamente significativas entre cultivos de células respondedoras y no respondedoras (grupo A versus B, C versus D).

Este experimento fué repetido con resultados similares.

Además cultivos de los grupos más relevantes, es decir E y F fueron analizados en otro experimento por citofluorometria de flujo, obteniendose diferencias entre estos del mismo orden que las obtenidas por autoradiografia. El porcentaje de células en fase S era de 16,1 en grupo E y 10,9 en grupo F

(Tabla 5). La citofluorometria y la mezcla de células para formar el grupo F se llevaron a cabo en dia 2.

Posteriormente a la realización de estos experimentos Björklund, Forni y Coutinho (100) describieron que blastos inducidos por LPS e irradiados eran capaces de activar a linfocitos T tanto en presencia como en ausencia de LPS. Por lo tanto, cabia objetar a nuestras conclusiones que la diferencia en fracción de células en S entre gupos E y F podria deberse a la activación de linfocitos T de las $9x10^6$ células no respondedoras de grupo E a través de blastos inducidos por LPS en las $1x10^6$ células respondedoras.

Para comprobar si se producia una activación a través de este mecanismo en nuestros cocultivos, células de la cepa respondedora a $1x10^6$ células/ml y de la no respondedora a $10x10^6$ células/ml fueron separadamente preincubadas con LPS (50 ug/ml) durante 1 dia. A continuación fueron lavadas y las células respondedoras fueron irradiadas y sembradas en volumen de 100 ul por triplicado a una concentración de $1x10^6$ células/ml (grupo A). Las células preincubadas no respondedoras fueron sembradas en volumen de 100 ul por triplicado a una concentración de 10^7 células/ml (grupo B). Un tercer grupo (grupo C) contiene 100 ul de cada una de las suspensiones anteriores por triplicado. Se añadió LPS (50 ug/ml) a todos los cultivos y se midió incorporación de timidina a las 24 y 48 horas (Tabla 6).

Se observa que las c.p.m. de la mezcla de ambas suspensiones celulares son ligeramente inferiores a la suma de las suspensiones integrantes, lo que demuestra que en las condiciones usadas en nuestros experimentos no ha ocurrido activación a través del mecanismo descrito por los autores arriba mencionados (al menos no ha ocurrido hasta el punto de conducir a proliferación adicional superior a la de las 10^6 células respondedoras).

Por otra parte en experimentos que se han descrito se observa que las células preincubadas con LPS, irradiadas o no, tienen un efecto inhibidor al añadirlas a cultivos frescos estimulados con LPS lo que también va en contra de una estimulación adicional de linfocitos T por blastos inducidos por LPS.

La razón de la discrepancia con los resultados de esos autores no está clara pero hay que advertir que, a diferencia de ellos, nosotros no hemos usado blastos purificados. Cabe conjeturar que la acción de estos se limite a un número de linfocitos T que se halle en una proporción con el número de blastos no superior a la propia de la población esplénica. Más probable es, sin embargo, que dadas las bajisimas concentraciones a las que estos autores trabajaron el efecto filler haya jugado un papel importante. De hecho, sus resultados se explican admitiendo que a densidades criticamente bajas los blastos ejercen un efecto filler más

eficaz que los linfocitos no estimulados.

4.4 Corolario: verificación de algunas de las hipótesis propuestas sobre el mecanismo de acción de las células B supresoras.

El hecho de que el linfocito B supresor sea el responsable del fenómeno de inhibición dependiente de densidad en cultivos inducidos por LPS, tal como los experimentos anteriores demuestran, nos ha permitido testar algunas de las hipótesis propuestas sobre el mecanismo de la supresión B, así como testar el mismo concepto de la existencia de una subpoblación independiente de células B supresoras. En dichas hipótesis se ha sugerido que complejos antígeno-anticuerpo (101,102) o anticuerpos dirigidos contra inmunoglobulina propia (91) serian los mediadores de la actividad supresora. El siguiente experimento tenia como finalidad averiguar si tales mecanismos pueden estar implicados en la inhibición causada por células B.

Se hizo uso de la técnica de hapteno-gelatina para purificar linfocitos B dotados de Ig de membrana específica para el hapteno TNP. Estos linfocitos fueron sembrados a muy baja concentración a dos diferentes densidades que diferían en un factor 3x (en el experimento expuesto en Tabla 7, 5000 y

15000 células por pocillo). Como células "filler" se usaron timocitos de los mismos ratones a una concentración de $1x10^6$ células/pocillo, en un volumen total de 0,2 ml por pocillo. Los cultivos fueron estimulados con LPS (100 ug/ml), midiéndose la cinética de aparición de células secretoras de anticuerpos anti-TNP. Adviertase que este medida proporciona lo mismo que la tasa de incorporación de timidina una estimación del grado de proliferación celular ya que ambos parámetros están acoplados y evolucionan paralelamente tras estimulación con LPS.

Este experimento cumple con varios objetivos. De una parte titular el fenómeno de inhibición dependiente de densidad a muy bajas concentraciones. En segundo lugar, la preservación de este fenómeno en una población homogénea anti-hapteno pero estimulada de forma policlonal y sin presencia de hapteno en el medio de cultivo sería una indicación de que los complejos antígeno o hapteno-anticuerpo no son necesarios para la inducción de inhibición. Debido a la homogeneidad en cuanto a Ig de membrana de la población en estudio, podría descartarse asimismo el papel de los complejos inmunoglobulina-antiinmunoglobulina en este tipo de supresión. Por último, dado que la inhibición concentración-dependiente del crecimiento inducido por LPS es un reflejo, como creemos haber demostrado, de la acción de células B supresoras, su persistencia en una población B homogénea

refutaría el concepto de una subpoblación separada de células B supresoras.

El experimento expuesto en Tabla 7 demuestra la existencia de inhibición dersidad-dependiente en una población B especifica anti-TNP. PFC de los cultivos a 5000 células son significativamente más altas que las de cultivos a 15000 células cuando se computan por célula sembradas. Este experimento fué repetido con similar resultado a una concentración ligeramente superior (8000 y 24000 linfocitos B/pocillo). El porcentaje de macrofagos dentro de la población de timocitos "filler" fué del 6%.

3ª PARTE

5.1 SUPRESION DE PROLIFERACION MEDIADA POR CELULAS DE TUMORES LINFOIDES DE ESTIRPE B.

Nos hemos planteado las siguientes cuestiones: 1/ si las células de estos tumores son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos no neoplásicos estimulados con un mitógeno B (LPS), o T (PHA), o bien inhiben ambos tipos de respuesta. 2/ si, análogamente a linfocitos B activados por LPS, son capaces de inhibir el crecimiento de la propia población tumoral.3/ (intimamente ligada a la cuestión anterior), si conservan un mecanismo de autoregulación del tipo de inhibición dependiente de densidad.

5.2 Acción supresora de células tumorales sobre la población esplénica normal.

Se irradiaron células tumorales NS1 y SP2 en crecimiento exponencial y se añadieron a cultivos de células esplénicas frescas que, a continuación, fueron estimuladas con LPS ó PHA. La proliferación de estos cocultivos se comparó con la proliferación inducida por los mismos mitógenos en cultivos de células esplénicas solas o células esplénicas a las que se añadieron células esplénicas irradiadas.

Se observó que las células tumorales irradiadas tenian una potente actividad supresora de la respuesta de células esplénicas tanto a un mitógeno B (LPS) como a un mitógeno T (PHA) (Figs 20,21). Esta capacidad supresora es mucho mayor que la de las células esplénicas preincubadas estudiada antes poniéndose de manifiesto usando proporciones de células tumorales irradiadas a células esplénicas respondedoras a mitógeno mucho más bajas.

Tanto el tumor NS1 como el SP2 fueron generados en la cepa de ratón Balb/c. Las células esplénicas cocultivadas con las tumorales procedían en el experimento de Figura 20 de esa cepa. Sin embargo, se observaron resultados similares usando células esplénicas de ratones C57Bl/6 (Fig. 21) lo que demuestra que homologia en la región H-2 no es requerida en este tipo de supresión.

5.3 Acción de células tumorales irradiadas sobre el crecimiento de la propia población tumoral.

Células irradiadas de tumores NS1 y SP2 fueron añadidas a células no irradiadas de cada uno de esos tumores, con objeto de comprobar si un efecto supresor análogo al que ejercen células B activadas sobre otras células B homólogas, existe en células B tumorales.

El experimento mostrado en Fig. 22 no permite afirmar, de modo categórico, que tal mecanismo exista en las células tumorales, ya que, aunque hay un descenso de incorporación de timidina en los cultivos con células irradiadas, ese descenso es estadisticamente poco significativo en el caso del tumor NS1, $p<0,1$. Las diferencias obtenidas para el tumor SP2 son significativas pero hay que tener en cuenta el posible papel del consumo de nutrientes, muy marcado en este tumor a las 36 horas de cultivo.

5.4 Comparación de la inducción de inhibición en la propia población tumoral y en la población esplénica normal.

En otro experimento se comparó la abilidad de células tumorales irradiadas de inhibir la proliferación de células no irradiadas del propio tumor con su capacidad para inhibir proliferación de céluias esplénicas estimuladas con un mitógeno B (LPS) o T (PHA).

Las células del tumor NS1 fueron usadas en proporción células irradiadas a no irradiadas 1:3 ($1x10^4$ irradiadas + $3x10^4$ no irradiadas, número total en 200 ul) (grupo A). Este mismo número de células tumorales irradiadas se cocultivaron con $3x10^5$ células esplénicas (proporción 1:30) que fueron estimuladas con LPS (grupo B) o con PHA (grupo C). Como controles se utilizaron $3x10^4$ células no irradiadas NS1 en 100 ul (grupo D), $3x10^4$ células no irradiadas NS1 en 100 ul + $1x10^5$ células esplénicas irradiadas en 100 ul (grupo E)(controles para grupo A). $3x10^5$ células esplénicas no irradiadas en 100 ul + $1x10^5$ células esplénicas irradiadas en 100 ul estimuladas con LPS (grupo F) y $3x10^5$ células esplénicas no irradiadas en 100 ul estimuladas con LPS (grupo G)(controles para grupo B). $3x10^5$ células esplénicas no irradiadas en 100 ul + $1x10^5$ células esplénicas irradiadas en 100 ul estimuladas con PHA (grupo H) y $3x10^5$ células esplénicas no irradiadas en 100 ul estimuladas con PHA (grupo I)(controles para grupo C). Estos números de células se sembraron por triplicado en pocillos de fondo plano en el volumen mencionado.

Se observa (Fig. 23) que la proliferación de las células tumorales NS1 cocultivadas con células tumorales del propio tumor resulta inferior a la proliferación de células tumorales solas. Las diferencias son, de nuevo ligeramente significativas ($0,05>p>0,02$) pero es mucho más significativa

la inhibición de la proliferación de células esplénicas estimuladas con LPS cocultivadas con células tumorales irradiadas, $p<0,001$. No lo es tanto la respuesta a PHA, $0,05>p>0,02$) .

Como veremos a continuación, dada la gran sensibilidad del crecimiento tumoral in vitro a la disponibilidad de nutrientes, es dificil saber si se trata de una verdadera inhibición o simplemente de inhibición aparente por disminución de la disponibilidad de nutrientes en los cocultivos de células tumorales irradiadas y no irradiadas. Hay que tener en cuenta que las células irradiadas no mueren hasta bastantes horas después de la irradiación cuando llegan a la mitosis que no pueden completar por el daño cromosómico.

5.5 INFLUENCIA DEL CONSUMO DE NUTRIENTES EN EL CRECIMIENTO TUMORAL IN VITRO.

El mayor consumo de nutrientes que tiene lugar en cultivos a alta concentración podria menoscabar selectivamente la proliferación de los cultivos tumorales sembrados a más altas concentraciones simulando así un mecanismo de autoregulación. Para establecer el papel del consumo de nutrientes en este efecto y averiguar así si podia existir en estos tumores el mecanismo de regulación dependiente de densidad, hemos comparado proliferación en cultivos tumorales a distintas concentraciones con o sin renovación periodica del medio de

cultivo.

En un primer experimento se utilizó tumor NS1 sembrado en pocillos de fondo plano (200 ul/pocillo) por triplicado a concentraciones de $6x10^5$ células/ml y $2x10^5$ células/ml, procediéndose en cultivos paralelos a renovación periódica de medio (100 ul de medio viejo fueron reemplazados diariamente por 100 ul de medio fresco comenzando a las 24 horas de iniciado el cultivo (Figura 24). Un experimento análogo se realizó pocos dias después usando concentraciones de $2x10^5$ células/ml y $4x10^4$ células/ml (Figura 25).

En ambos experimentos se detectan durante los dos primeros dias cifras de incorporación de timidina referida a 10^5 células sembradas ligeramente superiores en los cultivos a menor concentración pero las diferencias no son estadisticamente significativas. Durante este periodo de tiempo la influencia de la renovación periodica de medio sobre el nivel de incorporación de timidina es poco importante. En dia 3 se detecta una relación inversa entre concentración y c.p.m. por célula sembrada y es justamente en ese dia cuando la influencia de la renovación del medio sobre nivel de proliferación se hace importante.

Un experimento similar se llevó a cabo con el tumor SP2 a concentraciones de $6x10^5$ y $2x10^5$ células/ml (Figura 26). En este caso se obtuvieron cifras de incorporación de timidina por célula significativamente superiores en los cultivos a

menor concentración. Sin embargo, la influencia de la renovación de medio fué muy ostensible y detectable desde el pulso de timidina subsecuente a la primera renovación de medio. Es más, cuando se comparan las cifras de incorporación de timidina referidas a un número fijo de células sembradas en cultivos a alta y baja densidad ($6x10^5$ y $2x10^5$), se observa que no hay diferencias estadisticamente significativas entre cultivos sembrados a $2x10^5$ sin cambio de medio y cultivos a $6x10^5$ en los que se procedió a renovación de medio de cultivo.

En otro experimento con NS1 no se procedió a renovación de medio pero se limitó la determinación de incorporación de timidina al periodo de las primeras 8 horas decultivo. Se analizaron cultivos a 4 concentraciones: $2x10^6$ células/ml, $6,6x10^5$ células/ml, $2,2x10^5$ células/ml y $7,3x10^4$ células/ml (Figura 27). En este periodo de tiempo no se establece una relación inversa entre proliferación y concentración de cultivo como ocurre en células normales previamente activadas (Tabla 3), ya que pese a que los cultivos a $6,6x10^5$ cel/ml exhiben mayor indice de incorporación de timidina por célula sembrada que los cultivos a $2x10^6$ cel/ml, éstos últimos arrojan cifras de incorporación de timidina por célula sembrada superiores a las de los cultivos a las dos densidades inferiores. En resumen, no se obtienen diferencias relativas de incorporación de timidina dependientes de

concentración, al menos a tiempos cortos de cultivo. Concluimos, por tanto, que mientras en linfocitos no transformados existe un mecanismo homeostático de regulación de crecimiento que se manifiesta por una mayor tasa de proliferación por célula al disminuir la concentración de los cultivos, los linfocitos tumorales no presentan este mecanismo de regulación, aunque el mayor consumo de nutrientes del medio de cultivo por parte de las células tumorales hace que en las curvas de crecimiento de tumores linfoides in vitro se produzca un mayor crecimiento relativo de los cultivos sembrados a menor concentración, simulando así un fenómeno de regulación de proliferación dependiente de densidad.

6. DISCUSION.

1era parte. CAPACIDAD DE CELULAS ACTIVADAS POR LPS PARA REGULAR LA PROLIFERACION INDUCIDA POR LPS.

Algunos investigadores (90) estudiando inhibición de la respuesta al antígeno eritrocitos de cordero, han sugerido que el mecanismo de inhibición desencadenado por LPS implicaba al linfocito T. Esta sugerencia se basaba en que LPS favorecía la respuesta de ratones "nude" y timectomizados mientras que deprimía la respuesta de células esplénicas de ratones normales. Este razonamiento no es convincente ya que no se puede comparar la respuesta de ratones con o sin compartimento T intacto a un antígeno timo-dependiente como es eritrocitos de cordero. Los ratones carentes de células T solamente pueden montar una respuesta policlonal a ese antígeno mientras que los ratones normales montarán una respuesta especifica.

Esta objeción se hace más patente al considerar el mecanismo subyacente a esa supresión que como años más tarde demostraron esos mismos autores está mediado por células B inducidas por LPS. Está demostrado (91) que la activación de esas células en fases previas a la inducción de la respuesta antigénica tiene como consecuencia la depresión de la respuesta al antígeno. Esta se detecta al comparar la

respuesta en PFC anti-eritrocitos de cordero de los animales tratados con LPS y antígeno con la de las células de animales a las que solamente se añadió antígeno. Por el contrario, es imposible saber si la respuesta policlonal de las células esplénicas de animales timectomizados o "nude" está deprimida como resultado de la activación de células supresoras ya que no existe una referencia que permita medir esa inhibición: las células esplénicas de esos ratones no pueden montar una respuesta a eritrocitos de cordero en ausencia de LPS.

En los hallazgos de esos autores un dato interesante era que esa respuesta policlonal era inferior a la respuesta antígeno-específica y, si bien esto podría deberse a una inducción más eficaz del linfocito B anti-eritrocito de cordero a través de las células T "helper" que a través de su inducción directa por LPS, existía también la posibilidad de que ello fuera debido a la activación concomitante de células supresoras por LPS. Así pues, hemos investigado la posibilidad de un mecanismo de inhibición de esta naturaleza: supresión de la proliferación inducida por LPS por células asimismo activadas por LPS y sin participación de células T. La demostración de la inhibición de la respuesta policlonal a LPS por células B supresoras inducidas por LPS encuentra ciertas dificultades técnicas que no están presentes en un sistema "limpio" como es el de eritrocitos de cordero. En este último, células supresoras y células suprimidas o

"diana" están sujetas a procesos de activación claramente separados: células supresoras son activadas por LPS y células diana por eritrocitos de cordero. La acción inhibitoria de las células supresoras se revela por comparación a células control que ni en el periodo de preincubación ni después de éste entrarán en contacto con LPS. En cambio, en un sistema de transferencia celular que implica preincubación con el mitógeno y posterior reestimulación con el mismo, es inevitable que las células preincubadas en ausencia de LPS queden expuestas a este mitógeno en el segundo periodo del ensayo después de la transferencia de las células preincubadas. Esto impone una limitación en el uso de esta población como control. Sin embargo, una caracteristica de las células supresoras inducidas por LPS descrita por Koenig y Hoffmann permitía cierto margen para la manipulación experimental: se había visto en el sistema de eritrocitos de cordero que las células B supresoras necesitaban cierto tiempo de cultivo in vitro antes de que lleguen a ser operativas en cuanto a supresión. Este periodo, un tanto arbitrariamente fijado en 24 horas se asumió que era necesario para la expansión del "pool" de células supresoras. De acuerdo con esto las células preincubadas en ausencia de LPS deberían ser incompetentes como supresoras si el segundo periodo del ensayo durante el cual están en contacto con LPS es suficientemente corto. Sin embargo, no había sido excluido

que la preincubación afectara la acción de las supresoras por motivos distintos de la expansión del "pool" supresor, p. ej. liberando a esas células de controles existentes in vivo (hormonales o de otro tipo) que mantuvieran a esas células inactivas. La preincubación, al liberar a la célula de esos controles permitiría una activación más rápida tras contacto con el mitógeno. Por esas razones, y con la finalidad de decidir entre esas alternativas, un control debe incluir células recién obtenidas para ser transferidas lo mismo que las preincubadas al cultivo objeto de la supresión. Nuestros experimentos muestran que después de preincubación, aún en ausencia de LPS, las células supresoras son rápidamente activadas por LPS lo que arguye en favor de la segunda alternativa, esto es, que preincubación actuaría provocando alguna alteración fisiológica que facilitaría la activación posterior mas bién que por expansión del "pool" de células supresoras. En algunos de los experimentos expuestos se observa que las células esplénicas responden más vigorosamente al mitógeno después de un dia de cultivo in vitro aún en ausencia de LPS que cuando recién obtenidas (Figs 5,6,7,8). Esto ha sido atribuido a la existencia de células supresoras de vida corta pero nuestros resultados ponen en duda esta explicación ya que la actividad supresora es mayor después de un dia de cultivo. La idea de que la preincubación potencia la acción tanto de las señales

inductoras de proliferación como de las inductoras de supresión a través de una alteración fisiológica desconocida está más de acuerdo con los resultados obtenidos. Cualquiera que sea el cambio celular causado por la preincubación, éste parece ser prevenido por irradiación previa ya que las células frescas irradiadas que son luego cultivadas en contacto con LPS por 36 horas no desarrollan capacidad supresora. La aparición ocasional de ésta en algunos casos siempre inferior en nuestra experiencia a la de las células preincubadas puede ser facilmente explicada por activación in vivo de las células supresoras. Una vez las células han sido preincubadas el contacto subsiguiente con LPS les permite expresar inmediatamente capacidad supresora como demuestran los cultivos preincubados sin LPS, posteriormente irradiados y añadidos a cultivos diana en los que entrarán en contacto con LPS.

El uso de células no respondedoras a LPS nos ha permitido demostrar que ambos factores, preincubación y LPS, son necesarios para la inducción de actividad supresora.

La estirpe B de la célula supresora que opera en este sistema ha sido demostrada por varios procedimientos. En primer lugar porque la actividad supresora persiste tras depleción de células no B de la población esplénica. En segundo lugar porque la regulación característica densidad dependiente en

cultivos estimulados por LPS que como se ha visto es un reflejo de la acción de células B supresoras se potencia en cultivos de células B purificadas. Este último experimento (Fig12) demuestra asimismo que este tipo de regulación es directa sin intervención de células T.

2ª parte. **IMPLICACION DE LOS LINFOCITOS B SUPRESORES INDUCIDOS POR LPS EN INHIBICION DEPENDIENTE DE DENSIDAD DE PROLIFERACION INDUCIDA POR LPS.**

El hecho de que linfocitos activados por LPS sean capaces de antagonizar la inducción de proliferacion mediada por LPS implica que en cualquier cultivo de células esplénicas estimulado por LPS debe existir un balance entre inducción de proliferación y supresión. Este balance se inclina en favor de un relativo aumento de supresión al aumentar el número de células activadas por LPS en un volumen definido como muestran los experimentos en que se obtiene supresión en cocultivos de células esplénicas estimuladas con LPS al comparar estos cocultivos con los cultivos componentes estimulados separadamente. Esta caracteristica de la supresión B estudiada aquí es la base del fenómeno llamado inhibición de proliferación dependiente de densidad. En cultivos linfocitarios fué descrito por primera vez por Melchers et al (92) quienes observaron que tanto la

proliferación como la producción de anticuerpo de cultivos estimulados con LPS están inversamente relacionados con la concentración inicial de los cultivos. Nosotros hemos tratado de explorar las bases de éste fenómeno. En primer lugar hemos visto que la diferencia en porcentaje de células activadas a sintesis en cultivos a 10^6 y 10^7 células por ml no se debe a una diferencia en la fracción de células activadas bajo esas diferentes condiciones de densidad sino que se origina en la expansión clonal posterior que solo es permitida en los cultivos a la menor densidad. En cultivos con colchicina el porcentaje de células en sintesis es similar. Tampoco durante las primeras 24 horas de cultivo sin colchicina se encuentran diferencias significativas en el porcentaje de células en fase S entre cultivos a 10^6 y 10^7 células por ml, pero a las 48 horas aparece una diferencia considerable a favor de los cultivos menos concentrados. Esto concuerda con la necesidad, estudiada antes, de un periodo de preincubación para que se manifieste la actividad supresora. Ya que ésta se hace patente principalmente después de las primeras 24 horas se debe esperar que las diferencias en cuanto a proliferación dependientes de densidad sean más notables una vez transcurrido este tiempo.

La fracción de células en fase S a las 48 horas en cultivos a 10^6 cel/ml es mayor que la fracción de células esplénicas respondedoras a LPS o que poseen el hipotético receptor a

LPS (103). Se puede anticipar que una fracción de células en S todavia mayor se encontraría en cultivos por debajo de 10^6 cel/ml.

Sin embargo, los cultivos a concentración inferior a $5x10^5$ cel/ml exhiben un retraso en la iniciación del ciclo. Esto está probablemente relacionado con la necesidad de células "filler" en cultivos a muy baja concentración.

Puesto que por autoradiografia, la decisión de continuar expansión clonal o detenerla se detecta ya en dia 2, es improbable que la depleción de nutrientes determine esta decisión. Además, hemos demostrado que una población previamente activada y a continuación resembrada en dos cultivos en medio fresco a concentración en proporción 2:1, inmediatamente establece un nivel de proliferación inversamente relacionado con la concentración, antes por tanto de que el consumo de nutrientes haya, concebiblemente, afectado a esas células.

Experimentos comparando el efecto de renovación de medio de cultivo y uso de tampones diferentes fallan en revelar un papel determinante del consumo de nutrientes o de la acidificación, respectivamente, en el fenómeno de crecimiento inverso con la concentración.

La manipulación de células esplénicas de cepas respondedoras y no respondedoras nos ha permitido descartar un efecto inespecífico de la concentración per se. Cultivos sembrados

en idénticas condiciones de densidad proliferan en grado diferente dependiendo de que parte de las células del cultivo sean capaces o no de responder a LPS. Los datos de la Tabla 4 muestran que la proliferación de $1x10^6$ no es impedida (al menos en grado apreciable) por cocultivo con $9x10^6$ células no respondedoras, ya que puede ser inferido de las fórmulas mostradas que proliferan en el mismo grado que $1x10^6$ células respondedoras cultivadas solas. Por tanto, la resistencia a la expansión clonal de cultivos a $10x10^6$ células respondedoras debe ser imputada a células supresoras inducidas por LPS que no existirán en una cepa no respondedora a LPS. Koenig y Hoffmann (91) mostraron que células B supresoras inducidas por LPS estaban implicadas en la supresión de la respuesta a eritrocitos de cordero. En esos experimentos un efecto de densidad semejante al aquí descrito fué notado: LPS actuaba como potenciador en cepas que generaban un bajo nivel de producción antigeno-dependiente de anticuerpo, pero era inhibitorio cuando al aumentar la concentración celular aumentaba la producción de anticuerpo. En cepas con respuesta vigorosa solamente se observó supresión. Esas observaciones parecen idénticas a las aquí expuestas por cuanto el efecto de la densidad es mediado por activación concomitante de tal modo que una concentración menor se requiere para aparición de supresión en cepas con respuestas vigorosas. Estos resultados

combinados indican que células B inducidas por LPS inhiben respuestas antigénicas y mitogénicas de forma densidad dependiente. Los mismos autores han sugerido que las células B supresoras podrían ser los linfocitos dotados de inmunoglobulinas de membrana capaces de reconocer a inmunoglobulinas propias.

Una relación inversa entre magnitud de la respuesta y concentración habia sido descrita en otro sistema B. Nossal y Pike (101) y Stocker (102) encontraron en respuestas antigénicas de células B específicas de hapteno un progresivo descenso en el rendimiento en producción de anticuerpo al aumentar el número de células añadidas a los cultivos. Ellos atribuyeron esto a un "feed-back" negativo mediado por complejos antígeno-anticuerpo. Más recientemente (104) este grupo ha observado el mismo fenómeno en microcultivos de células B no separadas con la técnica hapteno-gelatina y estimuladas policlonalmente con LPS. Nosotros hemos empleado un diseño experimental ligeramente diferente al estimular con LPS una población homogénea obtenida con la técnica hapteno-gelatina y por tanto específica de hapteno.

Puesto que hemos demostrado previamente que la inhibición dependiente de densidad de la proliferación inducida por LPS refleja la acción de las células B supresoras, el experimento así diseñado adquiere unas implicaciones que han pasado desapercibidas al grupo de Nossal. La preservación de la

inhibición dependiente de densidad en cultivos de linfocitos B hapteno-específicos estimulados con LPS implica que ni los complejos antígeno o hapteno-anticuerpo (hipótesis de Nossal) ni los inmunoglobulina-antiinmunoglobulina (hipótesis de Koenig y Hoffmann) juegan ningún papel en este tipo de inhibición. Pero suscita otra cuestión más provocadora y es que no existe una subpoblación independiente de linfocitos B supresores, concepto que fué abordado en un articulo teorico de G. Möller que ha dado origen a una intensa polémica. Por supuesto, se impone cierta reserva antes de considerar este punto absolutamente demostrado ya que no podemos estar seguros aún con la técnica hapteno-gelatina de obtener una población ciento por ciento hapteno-específica. La fracción de células inducidas con esta técnica ha alcanzado en una comunicación del grupo de Nossal (105) el 77%. Por otra parte, el grado de retroinhibición descrito en el experimento de McHeyzer-Williams y Nossal (104) usando células B no específicas es muy similar al obtenido por nosotros, lo que indica que el grado de retroinhibición en una población hapteno-específica y en una población B no específica de hapteno son muy similares. Este resultado va en contra de la existencia de una subpoblación separada de células B supresoras.

El resultado de este experimento, además, confirma los hallazgos previos respecto a supresión en nuestro modelo.

Así p.ej. el papel de los macrófagos queda definitivamente descartado ya que los escasos macrófagos que puedan introducirse junto a los linfocitos hapteno-específicos deben ser diluidos por los macrófagos presentes en la población timica que hemos estimado en unos 60,000 por pocillo. Por un razonamiento parecido pueden excluirse el papel del consumo de nutrientes, acidificación, simple contacto, etc. Supresión proporcional al número absoluto de células activadas e independiente de la relación células "helper":células proliferantes, podria resultar de un mecanismo de supresión asociado a la inducción de proliferación a nivel de cada unidad celular, p. ej. si las células al iniciar el ciclo secretaran o expresaran en su membrana un factor de acción a corta distancia que antagonizara nuevos ciclos proliferativos de las propias células que lo producen o de células vecinas. LPS induciria al mismo tiempo proliferación y producción del factor supresor a nivel de la misma célula y no en células independientes. Podria ser que un efecto diferencial en la inducción de estos dos procesos: proliferación y producción de factor supresor condujera a un progresivo predominio de la actividad supresora con el aumento de la densidad de cultivo. Esto último no solamente se ha observado en sistemas B sino también en células T. Ya hemos referido (5) que poblaciones conteniendo células T "helper" e hipotéticas T supresoras que eran transferidas in vivo a animales

recipientes estimulados con conjugado hapteno-carrier, daban origen a una inhibicion de la respuesta al conjugado al aumentar el número de células transferidas.

Activadores policlonales distintos del LPS, podrian también ser capaces de desencadenar un efecto de retroinhibición. Así, hapteno acoplado a flagelina polimerizada, el PBA usado en los experimentos de Nossal y su grupo, podria activar el mismo mecanismo supresor que opera en la respuesta a LPS.

Las posibles implicaciones de esta hipótesis pueden llegar más lejos. Por ejemplo, si un mecanismo semejante se confirmara en células T, cabria plantear una interpretación alternativa a algunos de los fenómenos de supresión descritos, al menos en el campo de la supresión T inespecífica ya que los requisitos de inducción de supresión inespecífica parecen muy semejantes a los de supresión B. Esto quizás aclararia parte de la confusión reinante en el tema de la supresión.

3era parte. INHIBICION DEPENDIENTE DE DENSIDAD EN TUMORES LINFOCITARIOS.

La inhibición dependiente de densidad podria constituir un mecanismo de gran relevancia en el control del crecimiento celular ya que su pérdida correlaciona en fibroblastos con el estado de transformación neoplásica. Por otra parte, la

similitud de este mecanismo de regulación de la proliferación en fibroblastos y en linfocitos nos ha impulsado a indagar si en los tumores linfocitarios desaparece o se encuentra deprimido dicho mecanismo.

Estudiamos tumores linfoides no secretores de estirpe B. En concreto elegimos los tumores NS1 y SP2.

Al intentar reproducir los experimentos realizados con células esplénicas normales en células de tumores linfoides nos sorprendió encontrar una intensa capacidad supresora en la célula tumoral. Esta supresión se manifiesta por cocultivo con células esplénicas normales estimuladas tanto por mitógenos T como B, por lo que debe tratarse de un mecanismo bastante inespecífico. Tampoco se ve afectada por barreras H-2. Una posibilidad que no consideramos durante la realización de estos experimentos es la sugerida en un trabajo de Tsukuda y Klein (73). Estos autores demostraron que lineas linfoblastoides causan supresión debido a su abilidad para estimular células T supresoras en cocultivos. Este mecanismo supresor podria facilmente testarse en nuestro modelo viendo si los tumores NS1 y SP2 pueden suprimir a cultivos de células B purificadas.

Posteriormente tratamos de establecer si existe una relación inversa entre concentración de cultivo y proliferación por célula en tumores linfocitarios lo que constituiria una indicación de la existencia de un mecanismo de control del

tipo dependiente de densidad.

Aunque en curvas de crecimiento de varios dias de duración existe entre esos parámetros (concentración y c.p.m. por célula) una relación inversa tal como ocurre en linfocitos no neoplásicos, en los tumores la renovación de medio de cultivo afecta de modo ostensible el nivel de incorporación de timidina. En las primeras horas de la curva de crecimiento hay una relación lineal entre concentración e incorporación de timidina. Esta relación lineal se rompe solo tras periodos de tiempo que dependiendo de la concentración y el tumor usado han podido dar lugar a deplección de nutrientes. Como hemos visto, en células normales la relación inversa entre concentración y proliferación se pone de manifiesto rapidamente si las células están previamente activadas y no se influye hasta transcurrido un tiempo prolongado de cultivo por la renovación de medio de cultivo. Dado que la célula tumoral puede considerarse una célula constitucionalmente activada, la inhibición dependiente de concentración debería ocurrir desde los primeros momentos del cultivo caso de existir. Mientras la inhibición de la proliferación de células esplénicas por las tumorales es muy notable, la inhibición del crecimiento de células tumorales por las propias células tumorales irradiadas es, como minimo, mucho más debil. La discreta inhibición que ocurre en algún caso podria estar influida por la deplección de nutrientes que en

tumores puede tener un impacto sobre el crecimiento más evidente que en células normales. Una hipótesis atractiva es que sea solamente el brazo aferente del mecanismo de inhibición dependiente de densidad el que se halle deteriorado en esos tumores. Es decir, la célula tumoral podría transmitir las señales supresoras asociadas con ese mecanismo de control y aún de forma más vigorosa que la célula normal, pero ella misma no sería receptiva, total o parcialmente, a esas señales inhibitorias.

CONCLUSIONES.

Las células B supresoras inducidas por LPS, que han sido involucradas en la supresión de respuestas antigénicas, son también capaces de inhibir la respuesta policlonal inducida por LPS.

La acción inhibitoria de estas células es dependiente de la concentración del cultivo y su expresión requiere, o se potencia por, un breve periodo de incubación in vitro. La incubación de las células in vitro favorece el proceso de activación de estas células más que su expansión numérica.

Las células B supresoras son responsables del fenómeno de inhibición dependiente de concentración de la proliferación inducida por LPS.

El mecanismo de acción de estas células supresoras no involucra complejos antígeno-anticuerpo o inmunoglobulina-antiinmunoglobulina, tal como habia sido sugerido.

Los hallazgos aportados sugieren fuertemente que la célula B supresora no pertenece a una subpoblación linfocitaria B independiente, es decir, el linfocito B antigeno-específico puede actuar simultáneamente como célula supresora.

El fenómeno de inhibición de proliferación dependiente de concentración está ausente o deprimido en los tumores linfoides B NS1 y SP2. Los resultados obtenidos sugieren que la desaparición de ese tipo de regulación en tumores, se debe a que los linfocitos tumorales han dejado de ser receptivos

a las señales supresoras más que a la incapacidad de producción de factores supresores por parte de las células tumorales ya que estas pueden inhibir la proliferación de la población esplénica normal estimulada por mitógenos tanto T como B.

FIG. 1 CAPACIDAD DE CELULAS PREINCUBADAS CON O SIN LPS PARA INHIBIR RESPUESTA DE CELULAS ESPLENICAS RECIEN OBTENIDAS (FRESCAS) A LPS

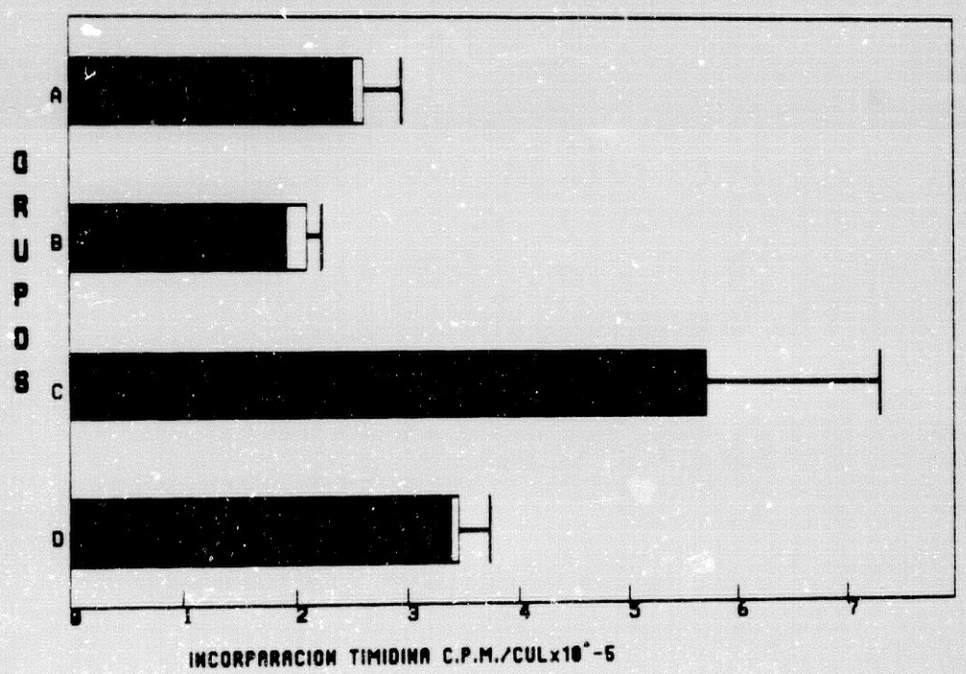


Figura 1. Capacidad de células preincubadas con o sin LPS para inhibir respuesta de células esplénicas recién obtenidas a LPS.

Células esplénicas de ratones machos Balb/c fueron cultivadas in vitro a una concentración de $3x10^6$ células/ml durante 3 dias en presencia o ausencia de LPS (50ug/ml). Transcurrido este tiempo fueron lavadas, irradiadas y resuspendidas a una concentración de $1x10^6$ células/ml y 0,1 ml de esta suspensión fueron añadidos a 0,1 ml de una suspensión de células esplénicas frescas a $3x10^6$ células/ml. Grupos control contenian el mismo número de células frescas en 0,1 ml + 0,1 ml de medio de cultivo solo ó + 0,1 ml de una suspensión de células esplénicas frescas irradiadas a $1x10^6$ células/ml.

Grupos:

A Celulas preincubadas con LPS, irradiadas + Frescas

B Células preincubadas sin LPS, irradiadas + Frescas

C medio de cultivo + Frescas

D Células frescas irradiadas + Frescas

Todos los grupos fueron estimulados con LPS (50 ug/ml) después de la transferencia de celulas irradiadas. A las 32 horas se añadió timidina tritiada, recogiéndose las células 4-5 horas después.

Incorporacion de timidina c.p.m./cultivo

A	B	C	D
26066	20950	57037	34477
±3502	±1454	±16145	±2939

La incorporación de timidina por las propias células irradiadas no ha sido sustraida de estas cifras. La correspondiente a cada grupo es la siguiente: A, 871. B, 1719. D, 557.

Aunque la media de grupo A sea inferior a la de los controles, esta diferencia no es estadisticamente significativa. Si es significativa la diferencia de grupo B con ambos controles, $p<0,005$ frente a D, frente a C $0,01>p>0,005$

FIG. 2 INHIBICION DE PROLIFERACION INDUCIDA POR LPS POR CELULAS PREINCUBADAS CON O SIN LPS E IRRADIADAS.

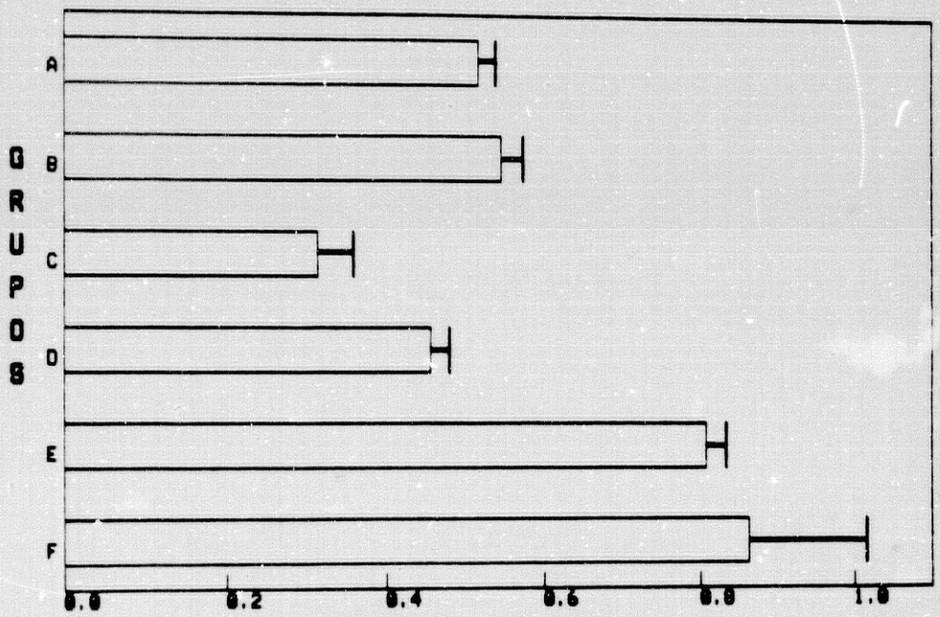


Figura 2.Inhibición de proliferación inducida por LPS por células preincubadas con o sin LPS e irradiadas.

Células esplénicas de ratones machos C57Bl/6 fueron cultivadas in vitro a una concentración de $3x10^6$ células/ml durante 2 dias en presencia o ausencia de LPS (50ug/ml). Transcurrido este tiempo fueron lavadas, y una parte fué tratada con anti-Thy1.1 + C para eliminar células T. Después, todas las células fueron irradiadas y resuspendidas a una concentración de $1x10^6$ células/ml y 0,1 ml de esta suspensión fueron añadidos a 0,1 ml de una suspensión de células esplénicas frescas a $3x10^6$ células/ml procedentes de ratones singeneicos. Grupos control contenian el mismo número de células frescas en 0,1 ml + 0,1 ml de medio de cultivo solo ó + 0,1 ml de una suspensión de células esplénicas frescas irradiadas a $1x10^6$ células/ml.

Grupos:

A Celulas preincubadas con LPS, irradiadas + Frescas

B Células preincubadas sin LPS, irradiadas + Frescas

C Cél prein con LPS,trat anti-Thy1.1, irrad + Frescas

D Cél prein sin LPS,trat anti-Thy1.1, irrad + Frescas

E Células frescas irradiadas + Frescas

F 0,1 ml medio de cultivo + Frescas

Todos los grupos recibieron LPS después de la transferencia (tiempo 0). A las 24 horas se añadió timidina tritiada y se recogieron las células 15 horas después.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

	A	B	C	D	E	F
Media	51636	54476	31355	45507	80683	86219
	±2279	±2905	±4491	±2486	±2636	±15340

La incorporación de timidina por las propias células irradiadas no ha sido sustraida de estas cifras. La correspondiente a cada grupo es la siguiente: A, 1563. B, 628. C, 920. D, 467. E, 245.

Las diferencias son estadisticamente significativas. Control E frente a A y B, $p<0,0005$. Incluso son significativas las diferencias entre las células deplecionadas de células T y las correspondientes poblaciones no deplecionadas. C frente a A, $p<0,001$. D frente a B, $p<0,01$.

FIG. 3 INHIBICION DE RESPUESTA A LPS POR CELULAS ESPLENICAS FRACCIONADAS Y POSTERIORMENTE PREINCUBADAS E IRRADIADAS.

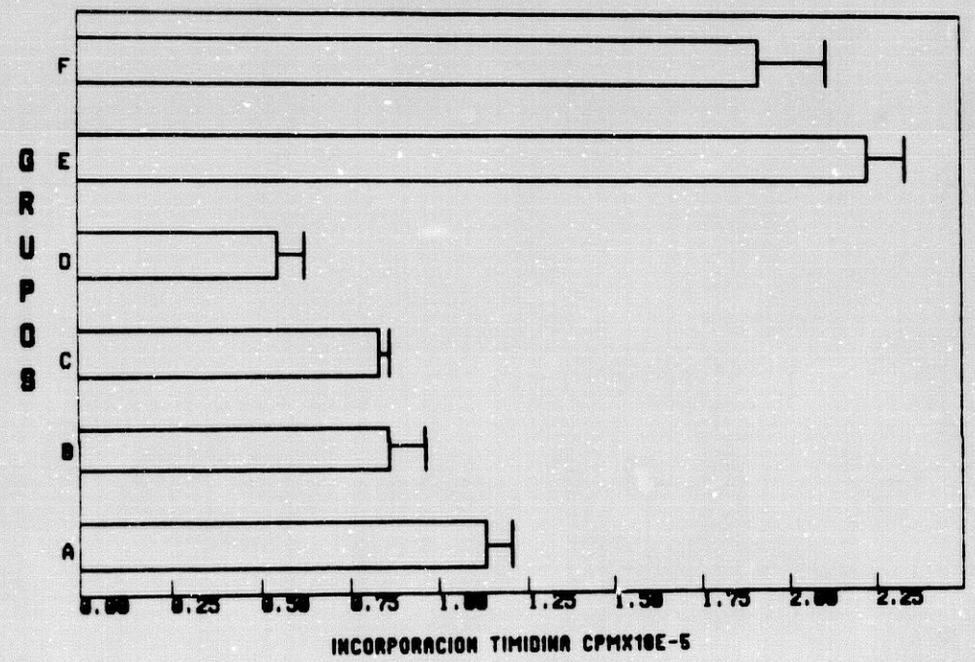


Figura 3. Inhibición de respuesta a LPS por células esplénicas fraccionadas y posteriormente preincubadas.

Células esplénicas de ratones singeneicos C57Bl/6 fueron incubadas durante 1 hora a 37° C en atmósfera con 5% CO_2 y en medio de cultivo conteniendo 10% suero bovino fetal, en frascos de plástico para deplecionar de macrófagos. Después fueron tratadas con monoclonal J1j (anti-Thy1.1) y complemento para eliminar células T. Estas células, asi como alicuotos no fraccionados de la misma población se incubaron durante 10 dias en medio de cultivo con 10% suero bovino fetal en presencia o ausencia de LPS (50 ug/ml). Al final de este periodo, las células fueron lavadas, irradiadas (3000 rads) y añadidas a células esplénicas frescas en la proporción 1 irradiadas : 3 frescas.

Como controles se usaron células esplénicas recién obtenidas irradiadas añadidas a frescas no irradiadas en la misma proporción. Otro grupo control contenia la misma cantidad de células frescas sin células irradiadas.

Las suspensiones celulares conteniendo 10^5 células irradiadas + $3x10^5$ células frescas o $3x10^5$ células frescas solas, todas ellas en un volumen de 0,2 ml fueron sembradas por triplicado en pocillos de fondo plano. Todos los cultivos recibieron LPS (50 ug/ml). A las 24 horas, se añadió timidina tritiada 1 uCi/pocillo, recolectándose las células 15 horas después.

GRUPOS.

A: cel. esp. no fraccionadas prein con LPS, irr + frescas

B: cel. esp. fraccionadas prein con LPS, irr + frescas

C: cel. esp. no fraccionadas prein sin LPS, irr + frescas

D: cel. esp. fraccionadas prein sin LPS, irr + frescas

E: cel. esp. no prein, irr + frescas

F: medio de cultivo (0,1 ml) + frescas

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

	A	B	C	D	E	F
Media	113162	86013	83145	55000	222506	191107
	±7853	±10853	±3624	±7982	±11339	±19962

FIG. 4 INHIBICION DE RESPUESTA A LPS POR CELULAS ESPLENICAS PREINCUBADAS Y POSTERIORMENTE FRACIONADAS E IRRADIADAS.

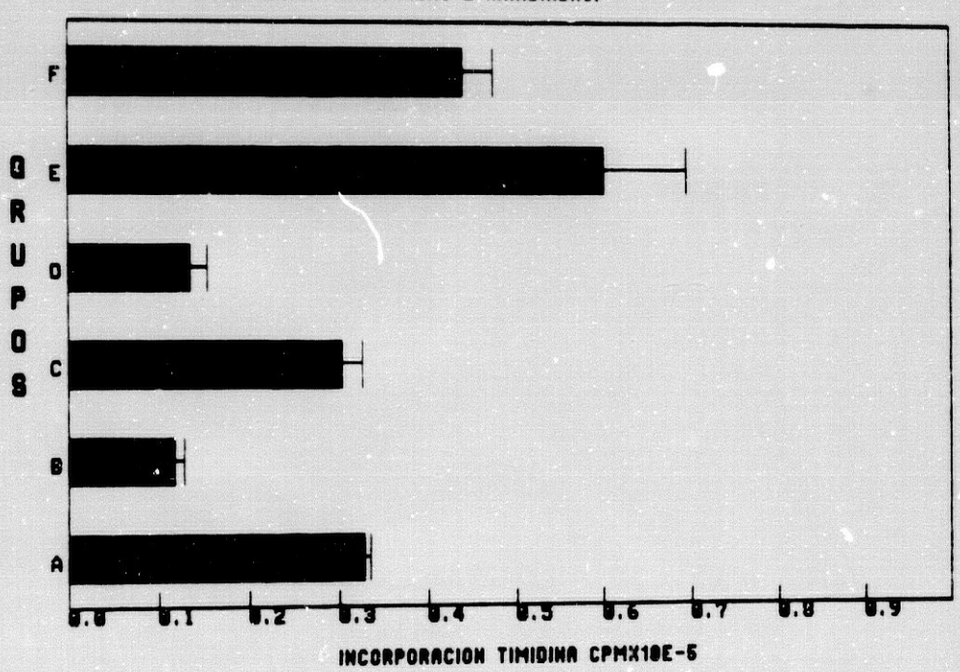


Figura 4. Inhibición de respuesta a LPS por células esplénicas preincubadas y posteriormente fraccionadas.
Condiciones del experimento son idénticas a las de la figura anterior excepto que el tratamiento con anti-Thy1.1 y complemento se realizó al final del periodo de preincubación.
La proporción de células irradiadas a frescas fué de 1 : 1,5.
El pulso de timidina tritiada se hizo durante las últimas 4-5 horas de cultivo.
Iniciales designando los grupos como en figura anterior.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

	A	B	C	D	E	F
Media	35023	12929	31543	14042	60286	44103
	±834	±999	±2223	±1958	±9356	±3364

La incorporación de timidina por las propias células irradiadas, aunque mínima, fué determinada en controles conteniendo células irradiadas solas en el mismo número. En las cifras dadas arriba la incorporación de timidina de las correpondientes células irradiadas no ha sido sustraida. Estas fueron las cifras correspondientes a cada grupo: A, 2278. B, 1125. C, 1108. D, 558. E, 240.
Diferencias estadísticamente significativas. Grupos A y F son los que presentan medias más cercanas y sin embargo $p<0,01$.

FIG. 5 INHIBICION DE PROLIFERACION EN COCULTIVOS VERSUS CULTIVOS SEPARADOS EFECTO DE CELULAS PREINCUBADAS CON LPS. PERIODO 0 - 12 HORAS.

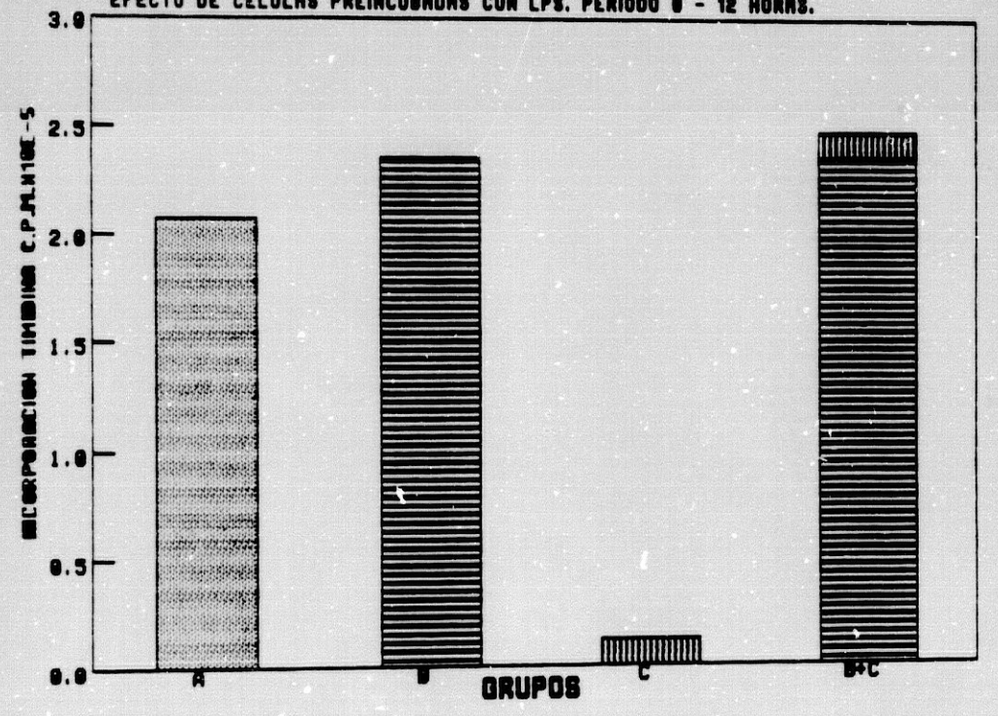


Figura 5. Inhibición de proliferación en cocultivos versus cultivos separados. Efecto de células preincubadas con LPS.

Periodo 0-12 horas.

Células esplénicas a $3x10^6$ cel/ml fueron preincubadas con o sin LPS durante 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas, ajustadas a una concentración de $1x10^6$ cel/ml y recultivadas separadamente o en cocultivo con células esplénicas recién obtenidas las cuales se habian ajustado a una concentración de $4x10^6$ cel/ml. Estas ultimas se cultivaron también separadamente.

Se añadió LPS (100 ug/ml) a todos los cultivos y se midió incorporación de timidina en las siguientes 0-12 horas y 12-24 horas. La timidina tritiada fué añadida al comienzo de cada uno de estos intervalos.

A: células esplénicas frescas a $4x10^6$ cel/ml (100 ul) + células preincubadas con LPS a $1x10^6$ cel/ml (100 ul)

B: células esplénicas preincubadas con LPS a $1x10^6$ cel/ml (100 ul)

C: células esplénicas frescas a $4x10^6$ cel/ml (100 ul)

B+C: suma de la incorporación de timidina en grupos B y C.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

	A	B	C	B+C
Media	207145	235234	11952	247186
	±8966	±22233	±854	

FIG. 6 INHIBICION DE PROLIFERACION EN COCULTIVOS VERSUS CULTIVOS SEPARADOS
EFECTO DE CELULAS PREINCUBADAS SIN LPS. PERIODO 0 - 12 HORAS.

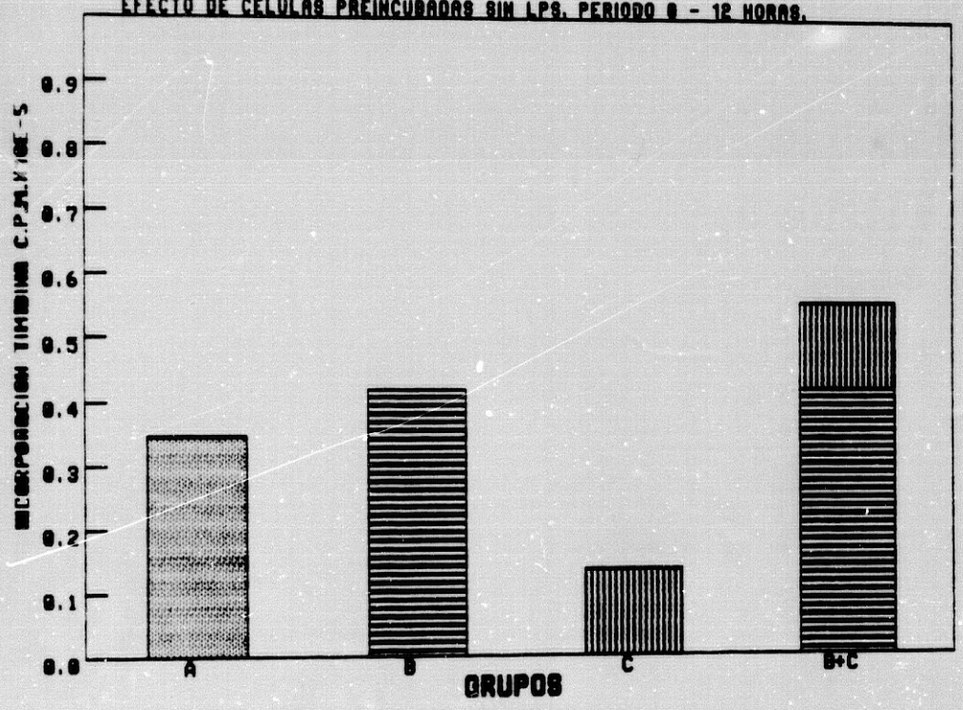


Figura 6. Inhibición de proliferación en cocultivos versus cultivos separados. Efecto de células preincubadas sin LPS.

Periodo 0-12 horas.

Células esplénicas a $3x10^6$ cel/ml fueron preincubadas con o sin LPS durante 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas, ajustadas a una concentración de $1x10^6$ cel/ml y recultivadas separadamente o en cocultivo con células esplénicas recién obtenidas las cuales se habian ajustado a una concentración de $4x10^6$ cel/ml. Estas ultimas se cultivaron también separadamente.

Se añadió LPS (100 ug/ml) a todos los cultivos y se midió incorporación de timidina en las siguientes 0-12 horas y 12-24 horas. La timidina tritiada fué añadida al comienzo de cada uno de estos intervalos.

A: células esplénicas frescas a $4x10^6$ cel/ml (100 ul) + células preincubadas sin LPS a $1x10^6$ cel/ml (100 ul)

B: células esplénicas preincubadas sin LPS a $1x10^6$ cel/ml (100 ul)

C: células esplénicas frescas a $4x10^6$ cel/ml (100 ul)

B+C: suma de la incorporación de timidina en grupos B y C.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

	A	B	C	B+C
Media	34537	42011	13633	55644
	±4672	±1309	±351	

FIG. 7 INHIBICION DE PROLIFERACION EN COCULTIVOS VERSUS CULTIVOS SEPARADOS
EFECTO DE CELULAS PREINCUBADAS CON L.P.S. PERIODO 12 - 24 HORAS.

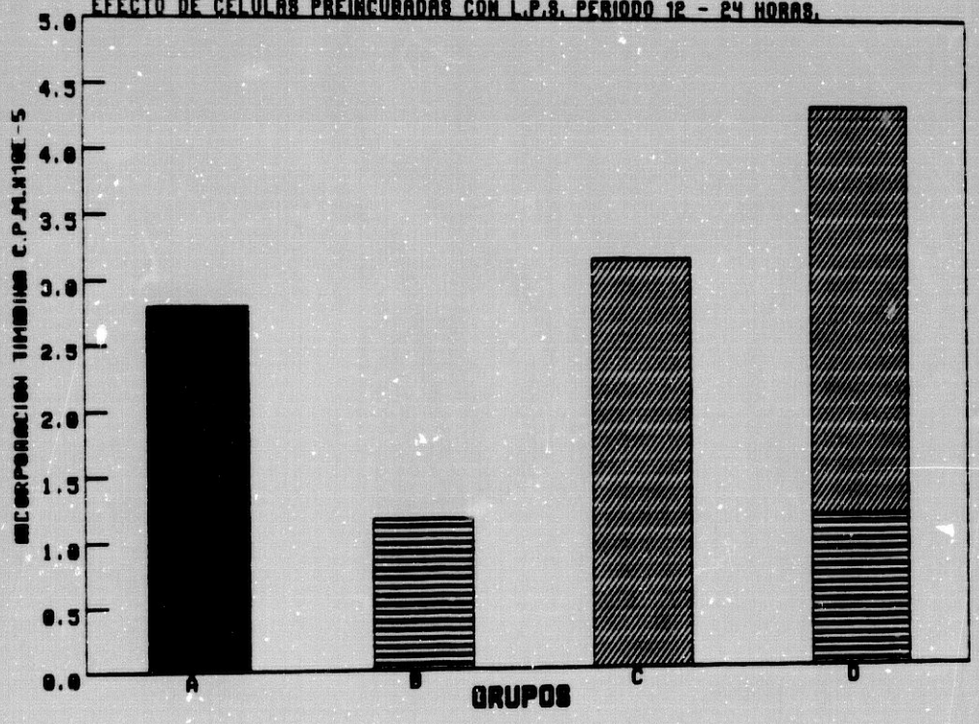


Figura 7. Inhibición de proliferación en cocultivos versus cultivos separados. Efecto de células preincubadas con LPS. Periodo 12-24 horas.

Células esplénicas a $3x10^6$ cel/ml fueron preincubadas con o sin LPS durante 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas, ajustadas a una concentración de $1x10^6$ cel/ml y recultivadas separadamente o en cocultivo con células esplénicas recién obtenidas las cuales se habian ajustado a una concentración de $4x10^6$ cel/ml. Estas ultimas se cultivaron también separadamente.

Se añadió LPS (100 ug/ml) a todos los cultivos y se midió incorporación de timidina en las siguientes 0-12 horas y 12-24 horas. La timidina tritiada fué añadida al comienzo de cada uno de estos intervalos.

A: células esplénicas frescas a $4x10^6$ cel/ml (100 ul) + células preincubadas con LPS a $1x10^6$ cel/ml (100 ul)

B: células esplénicas preincubadas con LPS a $1x10^6$ cel/ml (100 ul)

C: células esplénicas frescas a $4x10^6$ cel/ml (100 ul)

B+C: suma de la incorporación de timidina en grupos B y C.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

	A	B	C	B+C
Media	280966	316046	116916	432962
	±13791	±16382	±9637	

FIG. 8 INHIBICION DE PROLIFERACION EN COCULTIVOS VERSUS CULTIVOS SEPARADOS.
EFECTO DE CELULAS PREINCUBADAS SIN LPS. PERIODO 12 - 24 HORAS.

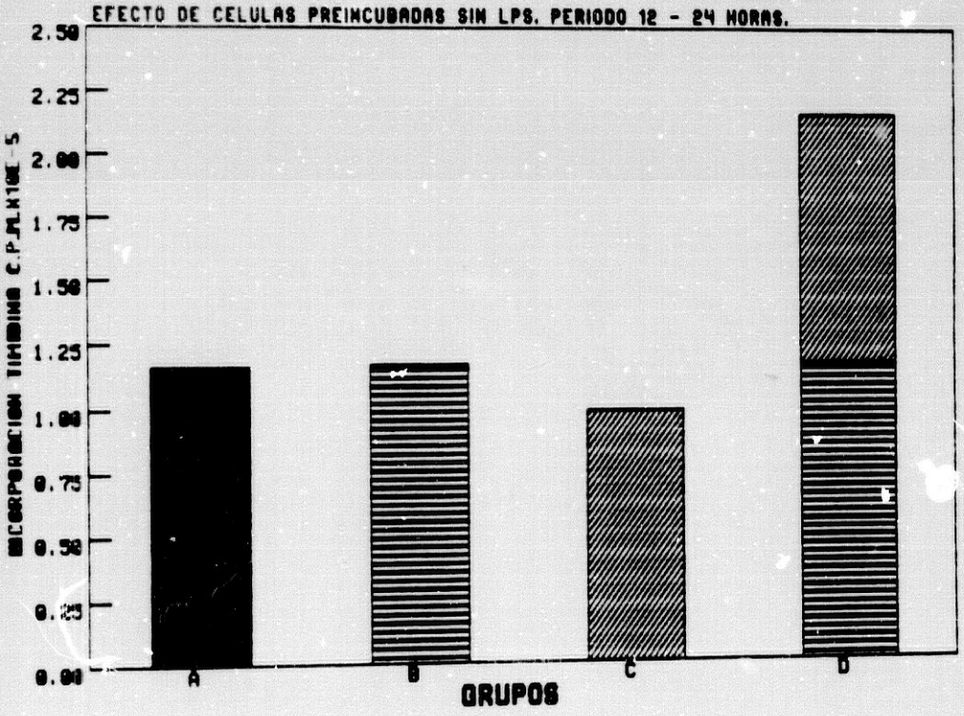


Figura 8. Inhibición de proliferación en cocultivos versus cultivos separados. Efecto de células preincubadas sin LPS. Periodo 12-24 horas.

Células esplénicas a $3x10^6$ cel/ml fueron preincubadas con o sin LPS durante 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas, ajustadas a una concentración de $1x10^6$ cel/ml y recultivadas separadamente o en cocultivo con células esplénicas recién obtenidas las cuales se habian ajustado a una concentración de $4x10^6$ cel/ml. Estas ultimas se cultivaron también separadamente.

Se añadió LPS (100 ug/ml) a todos los cultivos y se midió incorporación de timidina en las siguientes 0-12 horas y 12-24 horas. La timidina tritiada fué añadida al comienzo de cada uno de estos intervalos.

A: células esplénicas frescas a $4x10^6$ cel/ml (100 ul) + células preincubadas sin LPS a $1x10^6$ cel/ml (100 ul)

B: células esplénicas preincubadas sin LPS a $1x10^6$ cel/ml (100 ul)

C: células esplénicas frescas a $4x10^6$ cel/ml (100 ul)

B+C: suma de la incorporación de timidina en grupos B y C.

	INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO			
	A	B	C	B+C
Media	116064	99206	123706	222912
	±7233	±5767	±4566	

FIG. 8 INHIBICION DE PROLIFERACION EN COCULTIVOS VERSUS CULTIVOS SEPARADOS. NO INHIBICION POR CELULAS Cr (LPS NO RESPONDEDORAS).

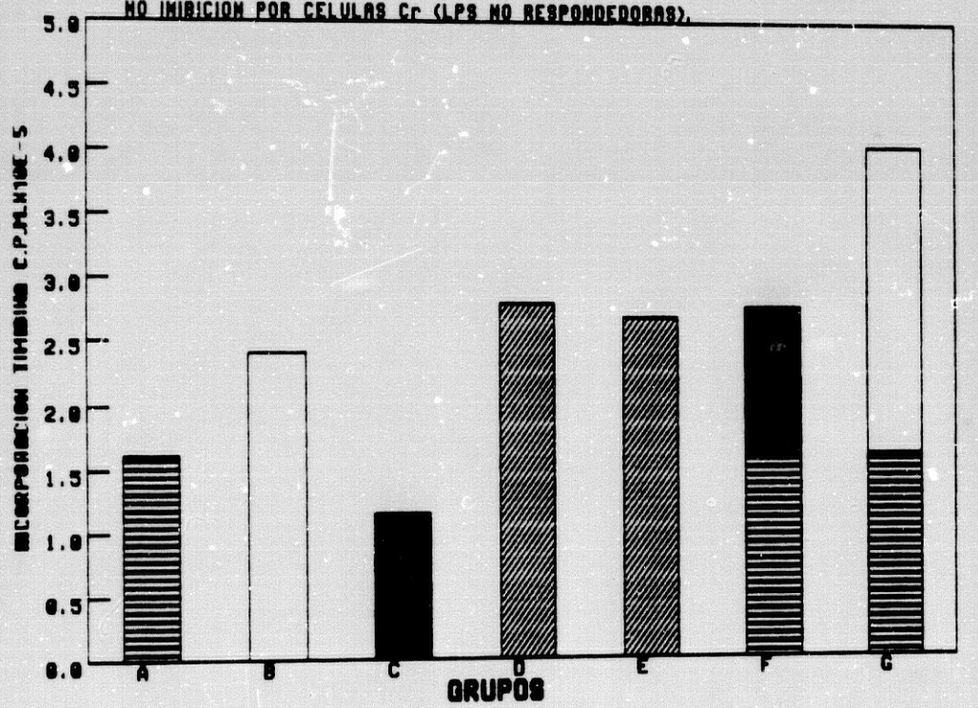


Figura 9.Inhibición de proliferación en cocultivos versus cultivos separados. No inhibición por células Cr (LPS no respondedoras)

Células esplénicas de cepas C57Bl.10 (respondedora a LPS) y de C57Bl.10Cr ambas a $3x10^6$ cel/ml fueron preincubadas con LPS durante 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas, ajustadas a una concentración de $2x10^6$ cel/ml y recultivadas separadamente o en cocultivo con células esplénicas recién obtenidas de la cepa respondedora las cuales se habian ajustado a una concentración de $2x10^6$ cel/ml. Estas ultimas se cultivaron también separadamente. Se añadió LPS (100 ug/ml) a todos los cultivos y se midió incorporación de timidina en las siguientes 12-24 horas. La timidina tritiada fué añadida al comienzo de este intervalo.

A: células esplénicas frescas de C57Bl.10 a $2x10^6$ cel/ml (100 ul)
B: células esplénicas de C57Bl.10 preincubadas con LPS y resembradas a $2x10^6$ cel/ml (100 ul)
C: células esplénicas de C57Bl.10Cr preincubadas con LPS y resembradas a $2x10^6$ cel/ml (100 ul)
D: cocultivo de células frescas de C57Bl.10 a $2x10^6$ cel/ml (100 ul) + células preincubadas de C57Bl.10 a $2x10^6$ cel/ml (100 ul)

E: cocultivo de células frescas de C57Bl.10 a $2x10^6$ cel/ml (100 ul) + células preincubadas de C57Bl.10Cr a $2x10^6$ cel/ml (100 ul)

F: suma de la incorporación de timidina en grupos A y C

G: suma de la incorporación de timidina en grupos A y B

	INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO			
	A	B	C	D
Media	16170	24096	11414	27945
	±1100	±1567	±898	±1233
	E	F	G	
Media	26679	27584	40266	
	±1276			

FIG. 10 INHIBICION DE PROLIFERACION POR CELULAS PREINCUBADAS E IRRADIADAS
EFECTO DE CELULAS DE CEPAS RESPONDEDORAS O NO RESPONDEDORAS A LPS.

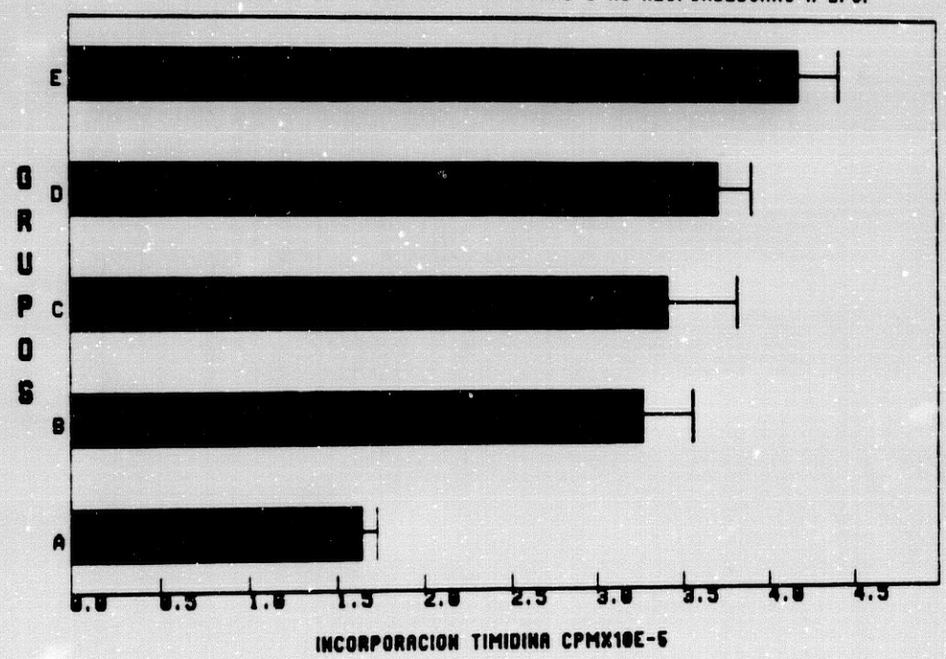


Figura 10. Inhibición de proliferación por células preincubadas e irradiadas. Efecto de células respondedoras y no respondedoras a LPS.

Células esplénicas de ratones machos C57Bl.10 (cepa respondedora a LPS) fueron cultivadas in vitro a una concentración de $3x10^6$ células/ml durante 1 dia en presencia de LPS (50ug/ml). Células de ratones macho C57Bl.10/ScCr (cepa no respondedora a LPS) fueron cultivadas en presencia o ausencia de LPS por el mismo tiempo. Transcurrido este tiempo las células fueron lavadas, irradiadas y resuspendidas a una concentración de $1x10^6$ células/ml y 0,1 ml de esta suspensión fueron añadidos a 0,1 ml de una suspensión de células esplénicas frescas a $3x10^6$ células/ml de la cepa respondedora. Grupos control contenian el mismo número de células frescas en 0,1 ml + 0,1 ml de medio de cultivo solo ó + 0,1 ml de una suspensión de células esplénicas frescas irradiadas a $1x10^6$ células/ml.

Grupos:	A Cel. resp. preincub	con LPS, irr + Frescas
	B Cél. no res preincub	con LPS, irr + Frescas
	C Cel. no res.prein	sin LPS, irr + Frescas
	D Cel. recién obtenidas,	irr + Frescas
	E medio de cultivo	+ Frescas

Todos los grupos fueron estimulados con LPS (100 ug/ml) después de la transferencia de células irradiadas. A las 24 horas se añadió timidina tritiada, recogiéndose las células 15 horas después.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

	A	B	C	D	E
Media	164048	325633	340632	369580	417274
	±8492	±30427	±41497	±20934	±25076

FIG 11 NO INHIBICION POR CELULAS PREINCUBADAS DURANTE 6 DIAS.

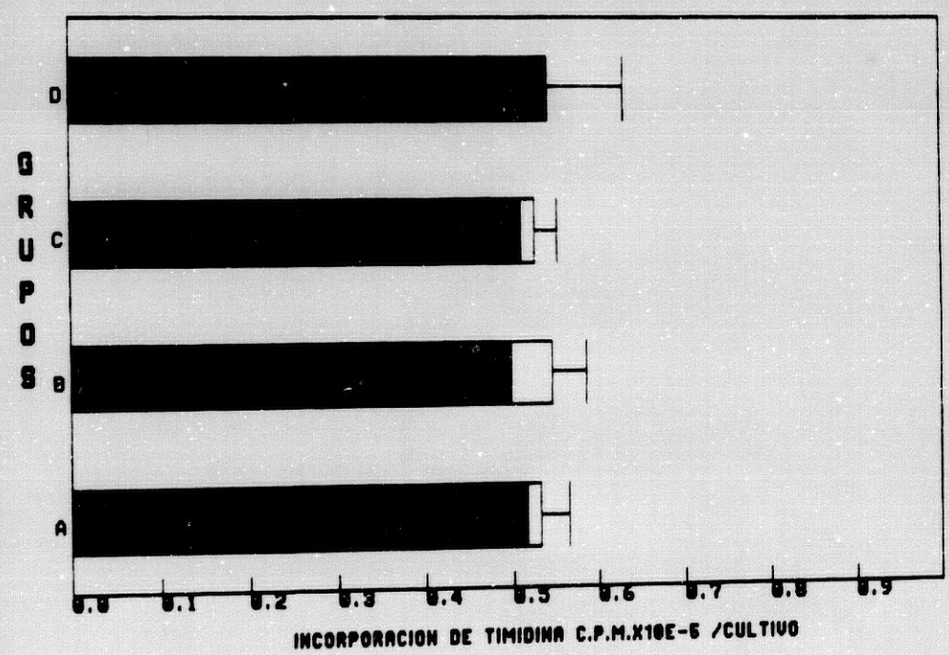


Figura 11. No inhibición por células preincubadas durante 6 dias.

Células esplénicas de ratones Balb/c fueron preincubadas a una concentración de $3x10^6$ células/ml en cultivos paralelos con o sin LPS (50 ug/ml) durante 6 dias. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas, irradiadas, ajustadas a una concentración de $1x10^6$ células/ml y 0,1 ml de estas suspensiones celulares fueron añadidos a 0,1 ml de una suspensión de células esplénicas frescas de Balb/c a concentración de $3x10^6$ células/ml. Como control se usaron células esplénicas recién obtenidas irradiadas ajustadas a $1x10^6$ células/ml y añadidas a la misma suspensión de células esplénicas frescas. Otro control contenia el mismo número de células frescas en 0,1 ml + 0,1 ml de medio de cultivo. Todos los cultivos se sembraron por triplicado en microplacas con pocillos de fondo redondeado (0,2 ml por pocillo). Se añadió LPS (50 ug/ml) y al cabo de 24 horas se dió un pulso de timidina tritiada, recolectándose las células 4 horas después.

Se establecieron cultivos conteniendo un número de células irradiadas solas idéntico al de los cultivos correspondientes con células irradiadas transferidas.

Grupos:

A: $1x10^5$ células preincubadas con LPS, irradiadas, (0,1 ml)

+ $3x10^5$ células esplénicas frescas (0,1 ml)

B: $1x10^5$ células preincubadas sin LPS, irradiadas, (0,1 ml) + $3x10^5$ células esplénicas frescas (0,1 ml)

C: $1x10^5$ células frescas irradiadas (0,1 ml) + $3x10^5$ células esplénicas frescas (0,1 ml)

D: 0,1 ml medio de cultivo + $3x10^5$ células esplénicas frescas (0,1 ml)

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

A	B	C	D
51602±3298	49863±3959	51194±2607	54238±8860

De estas cifras no se ha restado la correpondiente a las células irradiadas. La incorporación de timidina por células irradiadas de cada grupo es A=1555, B=4725, C=1511.

Rectángulos blancos= incorporación por las células irradiadas
Rectángulos negros= incorporación de timidina después de sustraer la incorporación por células irradiadas.

FIG 12 - PROLIFERACION INDUCIDA POR LPS DE CELULAS ESPLENICAS TOTALES Y CELULAS B PURIFICADAS.

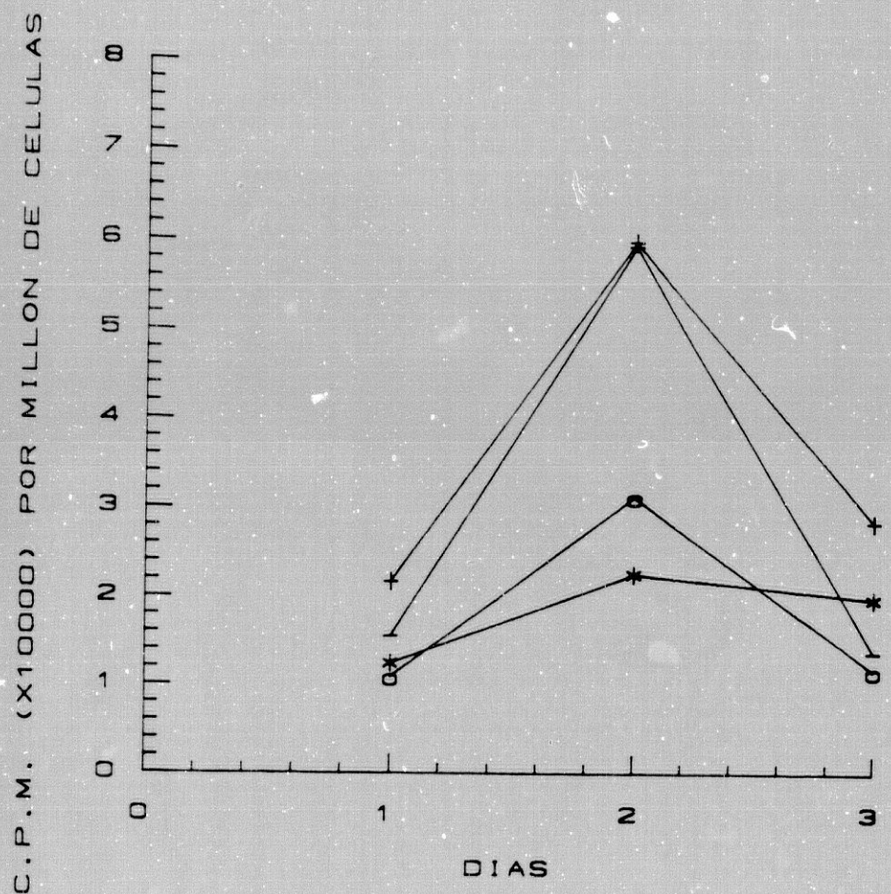


Figura 12. Proliferación inducida por LPS de células esplénicas totales y células B purificadas.

Un alicuoto de la población esplénica fué tratado con monoclonal J1j (anti-Thy1.1) y complemento y ajustado a dos concentraciones ($6x10^6$ células/ml y $2x10^6$ células/ml). El resto de la población esplénica no tratada fué asimismo sembrado a las mismas concentraciones. El factor de enriquecimiento en células B tras el tratamiento con J1j y C fué de 2,3. Se añadió LPS (100 ug/ml) al inicio a todos los cultivos y se determinó cinética de incorporación de timidina en dias 1, 2 y 3. Los pulsos de timidina fueron de 24 horas.

La incorporación de timidina expresada por 10^6 células sembradas fué la siguiente:

	Cultivos			
dias	C.totales $6x10^6$	C.totales $2x10^6$	C.B $6x10^6$	C.B $2x10^6$
1	12468	21818	10909	15584
	±530	±1350	±878	±614
2	22857	60779	31688	60260
	±1879	±4350	±2107	±4351
3	20260	29091	11948	14026
	±1745	±2314	±946	±778

+ Células esplénicas totales a $2x10^6$/ml. - Células B a $2x10^6$/ml. * Células esplénicas totales a $6x10^6$/ml. o Células B a $6x10^6$/ml.

FIG. 13 EFECTO DE DEPLECION DE MACROFAGOS SOBRE PROLIFERACION.

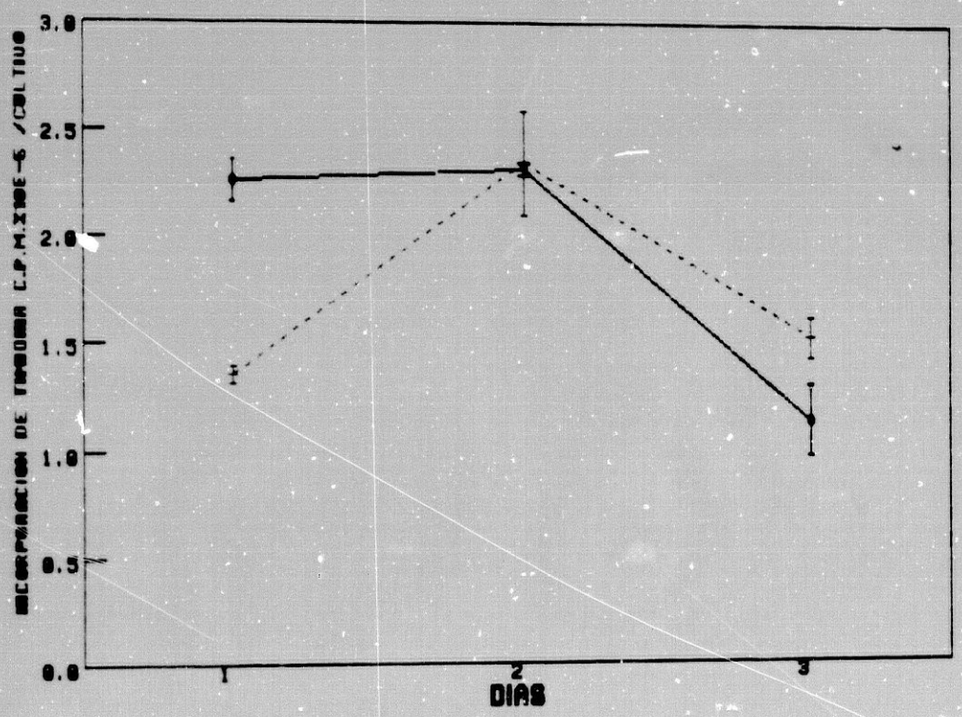


Figura 13. Efecto de la depleción de macrófagos sobre proliferación.

Se obtuvieron células esplénicas de ratones C57Bl/6 y en un alicuoto de las mismas se procedió a eliminación parcial de macrófagos por adherencia a plástico. Después se midió cinética de proliferación de cultivos de células esplénicas totales o deplecionadas de macrófagos sembradas a la misma concentración ($3x10^6$/ml) y estimuladas con LPS(50 ug/ml). Cultivos por triplicado. Timidina añadida 24 horas antes de recolectar las células.

INCORPORACION DE TIMIDINA

Dias	Células totales	Células sin macrófagos
1	226042±9839	135786±4019
2	231251±2638	233778±24529
3	113792±16378	152000±9081

Linea continua-células esplénicas totales.

Linea de puntos.. células deplecionadas de macrófagos.

FIG 14 - LA INCORPORACION DE TIMIDINA POR CELULA SEMBRADA EN CULTIVOS ESTIMULADOS CON LPS ES INVERSAMENTE PROPORCIONAL A LA CONCENTRACION.

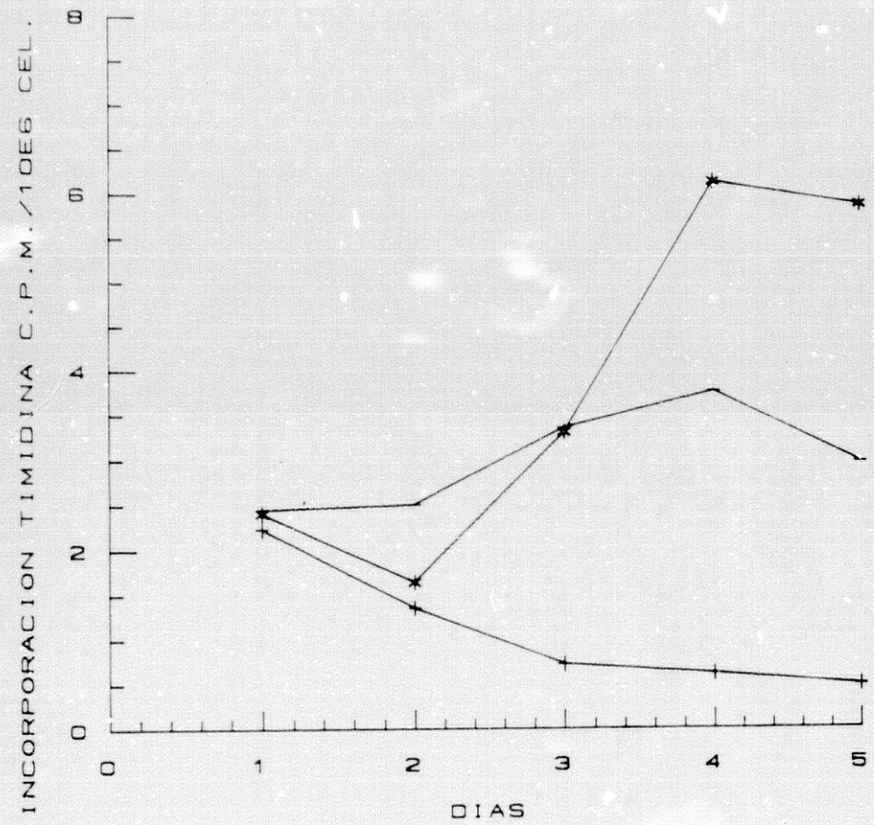


Figura 14. La incorporación de timidina por célula sembrada en cultivos estimulados con LPS es inversamente proporcional a la concentración.

Células esplénicas de ratones C57Bl/6 fueron sembradas a 3 concentraciones diferentes $5x10^6$, $1x10^6$, $5x10^5$ y estimuladas con LPS (25 ug/ml). Se determinaron, en cultivos por triplicado, incorporación de timidina y células formadoras de placas (producción de IgM y de IgG). Esto último con la técnica de la proteina A.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./10^6 CELULAS

	Cultivos		
dias	$5x10^6$	$1x10^6$	$5x10^5$
1	22429	24603	24160
	±1214	±812	±341
2	13698	25270	16572
	±1247	±588	±811
3	7338	33976	33472
	±1101	±4437	±3062
4	6262	38300	62446
	±521	±6350	±3228
5	4995	30350	60032
	±229	±505	±866

* Cultivos a $5x10^5$ cel/ml. -Cultivos a $1x10^6$ cel/ml. + cultivos a $5x10^6$ cel/ml. + Cultivos a $5x10^6$ cel/ml.

FIG 15 - LA PRODUCCION DE IgM POR CELULA SEMBRADA ES INVERSAMENTE PROPORCIONAL A LA CONCENTRACION

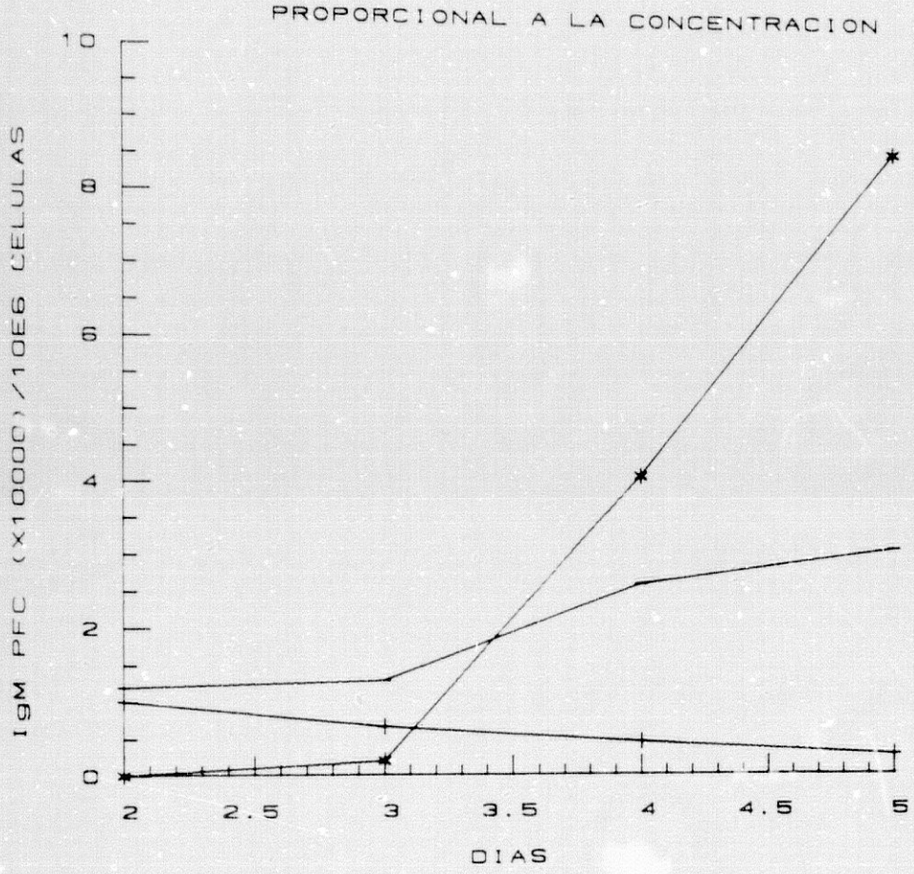


Figura 15. La producción de IgM por célula sembrada es inversamente proporcional a la concentración. Los mismos cultivos de la figura anterior.

IgM PFC/10^6 células

Cultivos

dias	$5x10^6$	$1x10^6$	$5x10^5$
2	10100	12000	---
	±1100	±890	
3	6700	13000	2000
	±1500	±7100	±124
4	4600	26200	41000
	±1200	±4500	±5321
5	2800	31000	86000
	±360	±500	±9200

* Cultivos a $5x10^5$ cel/ml. -Cultivos a $1x10^6$ cel/ml. + cultivos a $5x10^6$ cel/ml. + Cultivos a $5x10^6$ cel/ml.

FIG 16 - LA PRODUCCION DE IgG POR CELULA SEMBRADA ES INVERSAMENTE PROPORCIONAL A LA CONCENTRACION INICIAL.

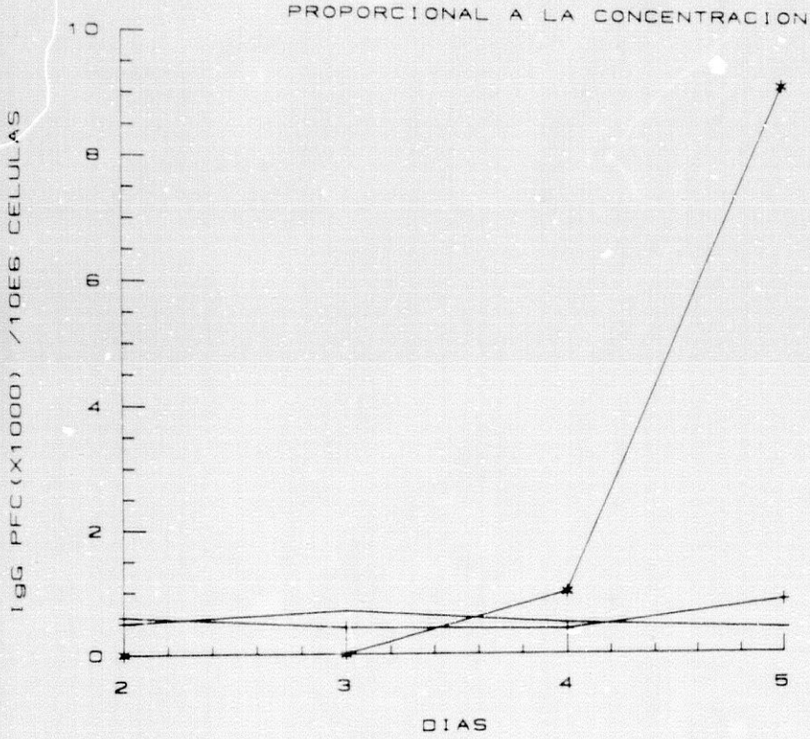


Figura 16. La producción de IgM por célula sembrada es inversamente proporcional a la concentración inicial. Los mismos cultivos de la figura anterior.

IgG PFC/10^6 células

Cultivos

dias	$5x10^6$	$1x10^6$	$5x10^5$
2	600	500	---
	±68	±74	
3	431	700	---
	±56	±89	
4	400	500	1000
	±76	±67	±98
5	860	400	9200
	±45	±52	±870

* Cultivos a $5x10^5$ cel/ml. -Cultivos a $1x10^6$ cel/ml. + cultivos a $5x10^6$ cel/ml. + Cultivos a $5x10^6$ cel/ml.

FIG 17 - EFECTO DE LA RENOVACION PERIODICA DEL MEDIO DE CULTIVO EN PROLIFERACION.

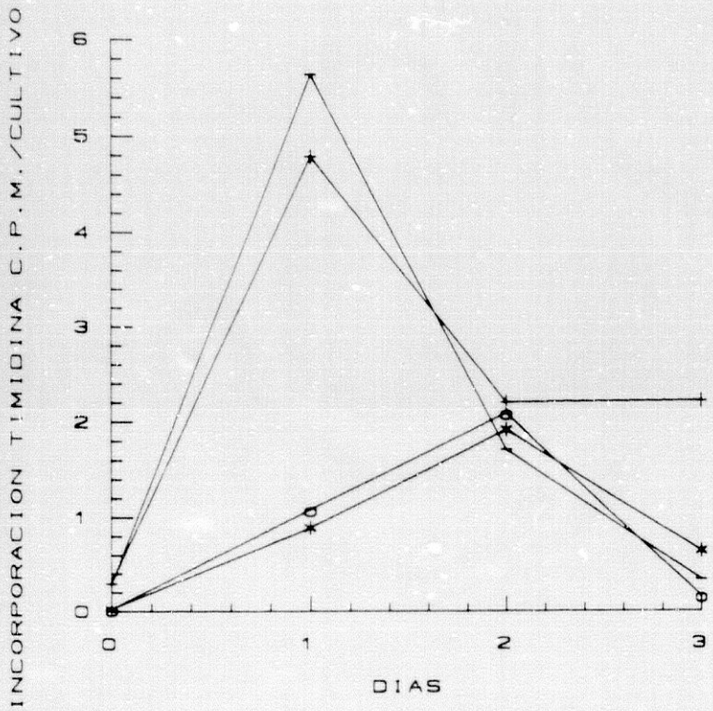


Figura 17. Efecto de la renovación periodica de medio de cultivo en la proliferación.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

Cultivos

días	10^7	10^7	10^6	10^6
	cambio medio	sin cambio	cambio medio	sin cambio
0	29242	29242	1997	1997
	±949	±949	±293	±293
1	481687	507380	89615	108923
	±23217	±31023	±6367	±4471
2	223187	173373	194136	211880
	±3050	±1905	±8687	±12971
3	220693	34594	65729	16382
	±5521	±2236	±3117	±3708

Cultivos por triplicado en microplacas (Costar plates, 96 wells); 100 ul de suspensión celular a 10^7 ó 10^6 células/ml por pocillo. 3-HTdR se añade (1 uCi/pocillo) y el pulso se termina 5 horas 30 minutos después.

Resultados= c.p.m./cultivo (media y desviación estandar)

Cambio de medio: 75 ul de medio usado fueron reemplazados de

cada cultivo por 75 ul de medio fresco conteniendo LPS en dias 0, i.e. 5,5 horas después del comienzo de los cultivos y dias 1 y 2.

Ratones: DBA/2 hembras de 10 meses de edad.

Medio de cultivo: RPMI 1640 + 10% suero bovino fetal + 1% penicilina-estreptomicina + 1% glutamina + $5x10^{-5}$ 2ME.

- Cultivos a 10^7 cel/ml sin cambio de medio. + cultivos a 10^7 cel/ml con cambio de medio. o Cultivos a 10^6 cel/ml sin cambio de medio. * cultivos a 10^6 cel/ml con cambio de medio.

FIG 18 - EFECTO DE DIFERNTES TAMPONES SOBRE PROLIFERACION.

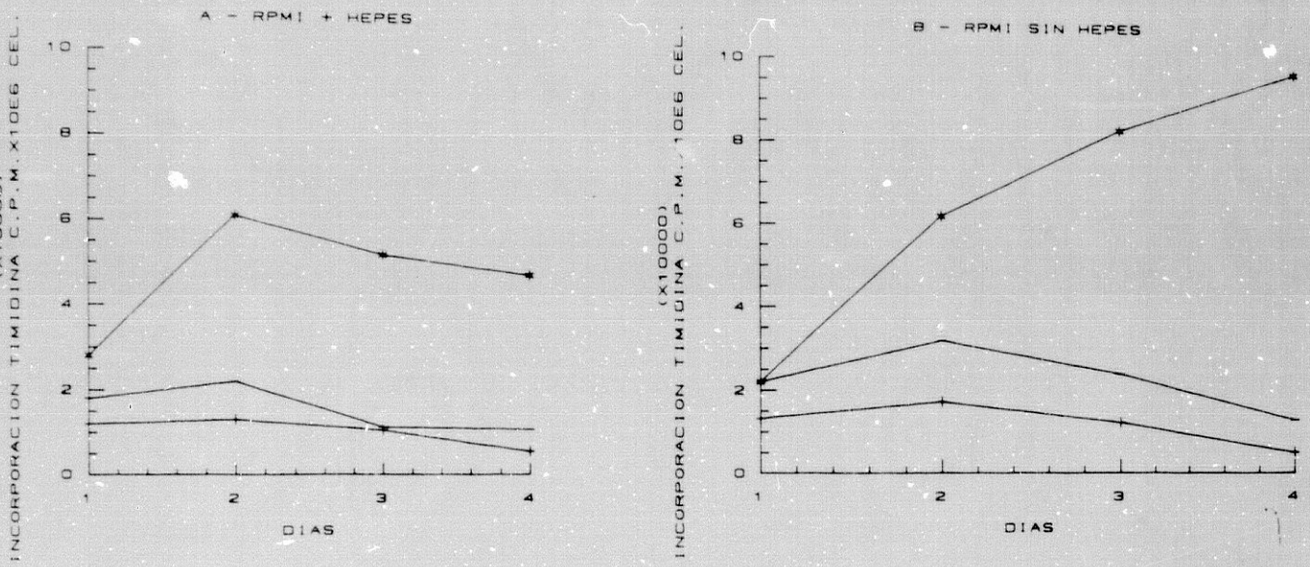


Figura 18. Efecto de diferentes tampones sobre proliferación. Células esplénicas de ratones C57Bl/6 fueron cultivadas a concentraciones de 10^7 cel/ml, $5x10^6$ cel/ml y $1x10^6$ cel/ml en medio tamponado con RPMI 1640 + Bicarbonato ó RPMI 1640 + Bicarbonato + 25 mM HEPES. Se añadió LPS (120 ug/ml) a todos los cultivos y se midió cinética de incorporación de timidina durante los 4 dias siguientes dando pulsos de timidina tritiada de 24 horas de duración a cultivos por triplicado.

* Cultivos a $1x10^6$ cel/ml. - Cultivos a $5x10^6$ cel/ml. + Cultivos a 10^7 cel/ml.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./10^6 CELULAS

	RPMI+HEPES			RPMI SIN HEPES		
dias	10^7	$5x10^6$	$1x10^6$	10^7	$5x10^6$	$1x10^6$
1 -	11859 ±1050	18869 ±1289	28584 ±1908	13549 ±879	22296 ±2109	21987 ±1448
2	12867 ±878	22284 ±1187	60588 ±4421	17624 ±1165	32262 ±3006	62661 ±5443
3	10567 ±762	11671 ±894	51548 ±4008	12445 ±1089	24821 ±2103	83282 ±7684
4	4353 ±544	10475 ±876	47463 ±3100	5325 ±675	12713 ±1324	97036 ±8707

FIG 19 - EFECTO DEL AREA DE CULTIVO EN PROLIFERACION

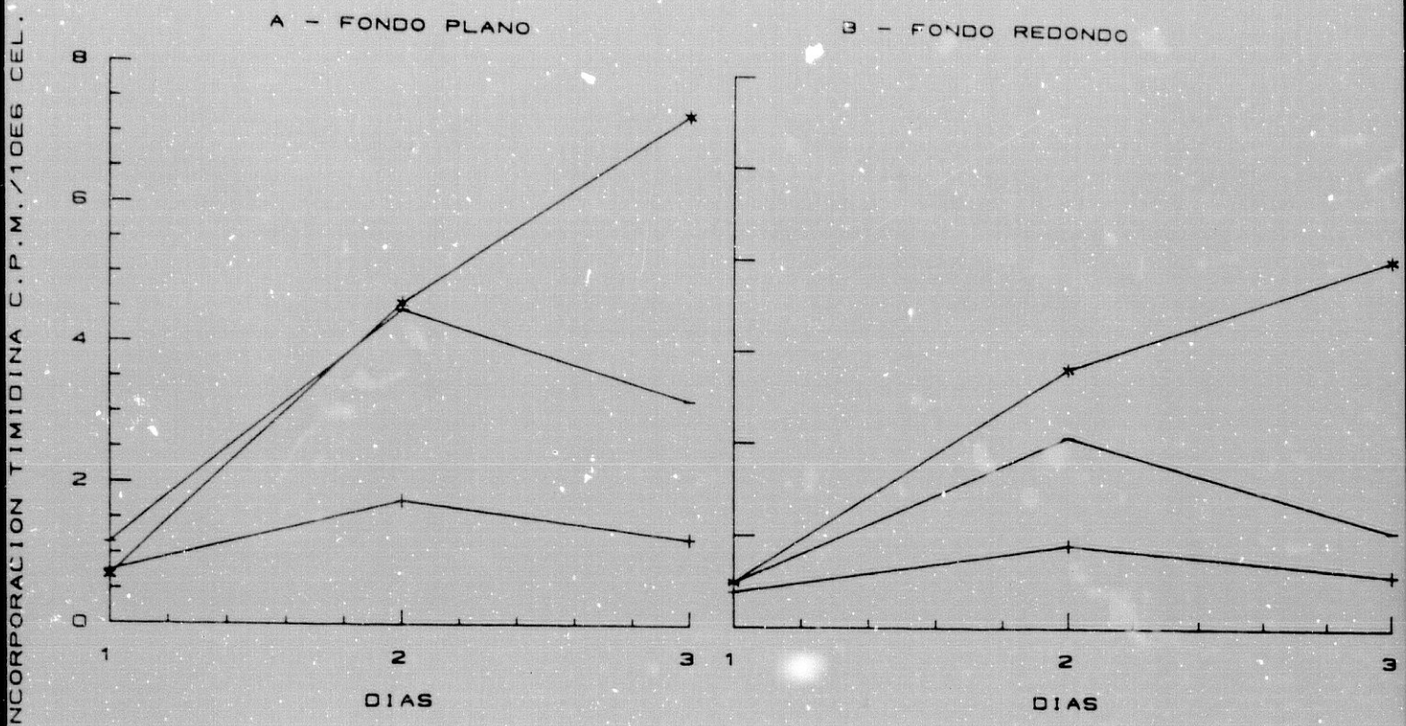


Figura 19. Efecto del area de cultivo en proliferación. Células esplénicas de ratones C57Bl/6 fueron cultivadas a concentraciones de 10^7 cel/ml, $5x10^6$ cel/ml y $1x10^6$ cel/ml en microplacas con pocillos de fondo plano o fondo redondeado (0,2 ml por pocillo). Se añadió LPS (100 ug/ml) a todos los cultivos y se midió cinética de incorporación de timidina durante los 4 dias siguientes dando pulsos de timidina tritiada de 24 horas de duración a cultivos por triplicado.

* Cultivos a $1x10^6$ cel/ml. - Cultivos a $5x10^6$ cel/ml. + Cultivos a 10^7 cel/ml.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./10^6 CELULAS

	FONDO PLANO			FONDO REDONDO		
dias	10^7	$5x10^6$	$1x10^6$	10^7	$5x10^6$	$1x10^6$
1	7496	11472	6818	5108	6385	6466
	±965	±1189	±928	±459	±746	±748
2	17678	45013	45985	12195	27948	37977
	±1546	±3998	±3217	±990	±2101	±2889
3	12357	32353	73855	8001	14529	55116
	±1009	±1902	±6557	±760	±1008	±4921
4	7237	13936	173860	6615	11160	81028
	±599	±996	±1354	±619	±1723	±7025

FIG 28 CELULAS IRRADIADAS DE TUMORES NS1 Y SP2 INDUCEN INHIBICION DE LA RESPUESTA A LPS DE CELULAS ESPLENICAS.

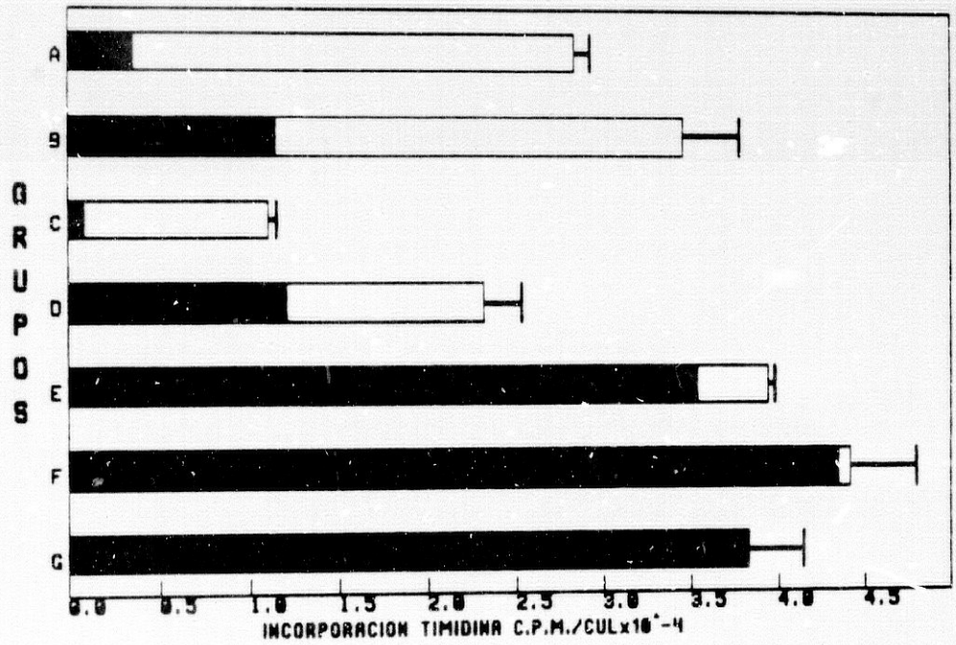


Figura 20. Células irradiadas de tumores NS1 y SP2 inducen inhibición de la respuesta a LPS de células esplénicas.

Células de tumores linfoides B, NS1 y SP2, en crecimiento exponencial fueron irradiadas y transferidas a cultivos de células esplénicas frescas de ratones Balb/c que fueron estimuladas con LPS (50 ug/ml). Todos los cultivos se realizaron por triplicado en pocillos de fondo plano. A las 20 horas se añadió timidina tritiada, recogiéndose las células 4 horas después.

Grupos:

A: células NS1 irradiadas ($4x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul)

B: células NS1 irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul)

C: células SP2 irradiadas ($4x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul)

D: células SP2 irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul)

E: células esplénicas frescas irradiadas ($4x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul)

F: células esplénicas frescas irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul)

G: células esplénicas solas ($3x10^5$ en 100 ul)

Se sembraron separadamente las células irradiadas solas a la misma concentración y volumen para restar la incorporación de timidina que pueda occurrir de los grupos correspondientes.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

A	B	C	D
28284±1032	34581±3222	11051±555	23150±2243
(3569)	(11465)	(906)	(12060)
E	F	G	
39388±423	44096±634	38220±3249	
(35329)	(43441)		

Números en paréntesis corresponden al número de cuentas después de sustraer las de las células irradiadas añadidas a cada grupo determinadas en cultivos separados.

Rectángulos negros: incorporación de timidina después de restar la de las propias células tumorales irradiadas.
Rectángulos blancos: incorporación de timidina por las correspondientes células de tumores irradiadas.

La inhibición de proliferación inducida por ambos tumores es muy potente. El test de Student da diferencias muy significativas en todos los casos, $p<0,0005$.

FIG 21 CELULAS NS1 IRRADIADAS INDUCEN INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS ESPLENICAS ESTIMULADAS CON LPS O CON PHA.

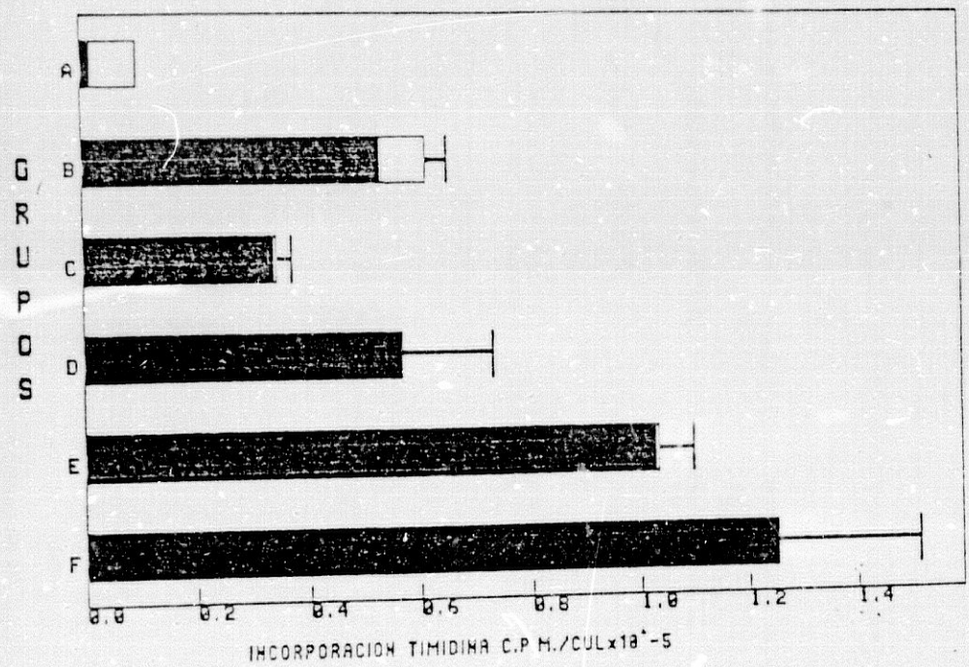


Figura 21. Células NS1 irradiadas inducen inhibición de la proliferación de células esplénicas estimuladas con LPS o PHA.

Células de tumor linfoide B, NS1, en crecimiento exponencial fueron irradiadas y transferidas a cultivos de células esplénicas frescas de ratones C57Bl/6 que fueron estimuladas con LPS (50 ug/ml) o con PHA (40 ug/ml). Todos los cultivos se sembraron por triplicado en pocillos de fondo plano. A las 32 horas se añadió timidina tritiada, recogiéndose las células 5 horas después.

Grupos:

A: células NS1 irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul) + LPS

B: células NS1 irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul) + PHA

C: células esplénicas frescas irradiadas ($1x10^5$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul) + LPS

D: células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul) + LPS

E: células esplénicas frescas irradiadas ($1x10^5$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul) + PHA

F: células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul) + PHA

Se sembraron separadamente las células irradiadas solas a la misma concentración y volumen para restar la incorporación de

timidina que pueda occurrir de los grupos correspondientes.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

A	B	C	D
9764±161	61326±3973	34477±2939	57037±16145
(1539)	(53101)	(33920)	
E	F		
103435±6328	125058±26997		
(102878)			

Números en paréntesis corresponden al número de cuentas después de sustraer las de las células irradiadas añadidas a cada grupo determinadas en cultivos separados.

Rectángulos negros: incorporación de timidina después de restar la de las propias células tumorales irradiadas.
Rectángulos blancos: incorporación de timidina por las correspondientes células de tumores irradiadas.
La inhibición de proliferación inducida por ambos tumores es muy potente. El test de Student da diferencias muy significativas de grupo A respecto a sus controles C y D, $p<0,005$. La inhibición de la respuesta a PHA es algo menor, $0,01>p<0,005$.

FIG 22 EFECTO DE CELULAS IRRADIACAS NS1 Y SP2 SOBRE EL CRECIMIENTO DE TUMORES NS1 Y SP2.

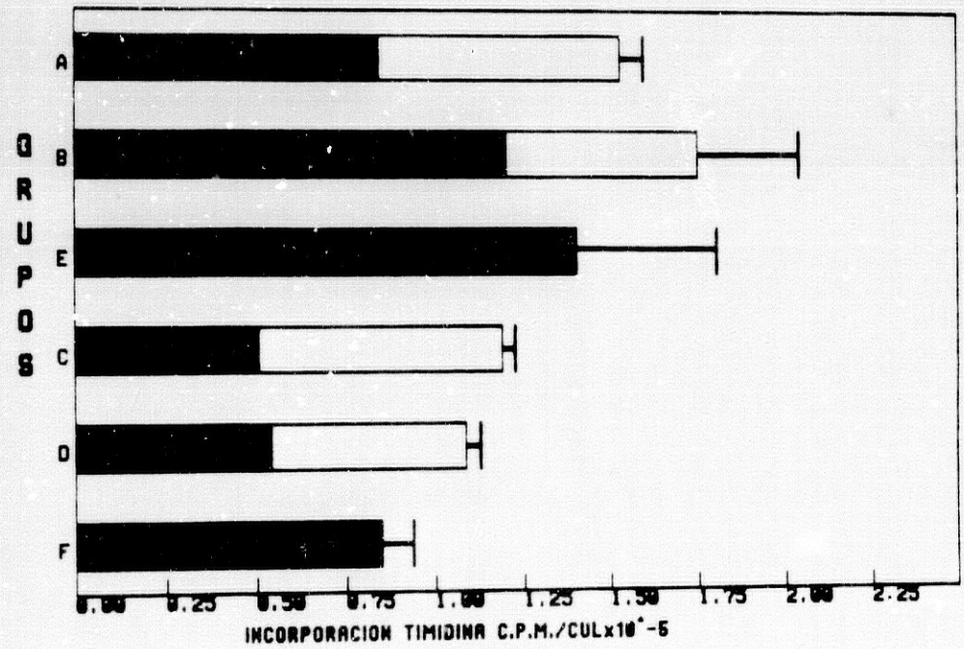


Figura 22. Efecto de células irradiadas NS1 y SP2 sobre el crecimiento de tumores NS1 y SP2

Células de tumores NS1 y SP2 fueron irradiadas y 100 ul de una suspensión a $1x10^5$ cél/ml fueron añadidas a una suspensión de células no irradiadas de cada uno de estos tumores (100 ul a $1x10^5$ cel/ml). A las 18 horas se añadió timidina tritiada, recolectándose las células 4 horas después.

A: NS1 irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml) + NS1 no irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml)

B: SP2 irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml) + NS1 no irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml)

E (control para A y B): NS1 no irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml) + 100 ul medio de cultivo

C: NS1 irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml) + SP2 no irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml)

D: SP2 irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml) + SP2 no irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml)

F (control para C y D): SP2 no irradiadas (100 ul a $1x10^5$ cel/ml) + 100 ul medio de cultivo

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

	A	B	C
Media	152893±7030	174722±29672	119374±3811
	(84530)	(120392)	(51011)
	D	E	F
Media	108775±4432	140406±40129	85237±8765
	(54445)		

Números en paréntesis corresponden al número de cuentas después de sustraer las de las células irradiadas añadidas a cada grupo determinadas en cultivos separados

Rectángulos negros: incorporación de timidina después de restar la de las propias células tumorales irradiadas.
Rectángulos blancos: incorporación de timidina por las correspondientes células de tumores irradiadas.

El test de Student da diferencias poco significativas, $0,1>p>0,05$ de A y B respecto a E (no clara inhibición del crecimiento de NS1) y significativas para C y D respecto de F, $p<0,01$.

FIG 23 CELULAS NS1 IRRADIADAS INHIDEN MUCHO MENOS LA PROLIFERACION DE CELULAS NO IRRADIADAS DEL PROPIO TUMOR QUE LA DE CELULAS ESPLENICAS ESTIMULADAS CON LPS O PHA.

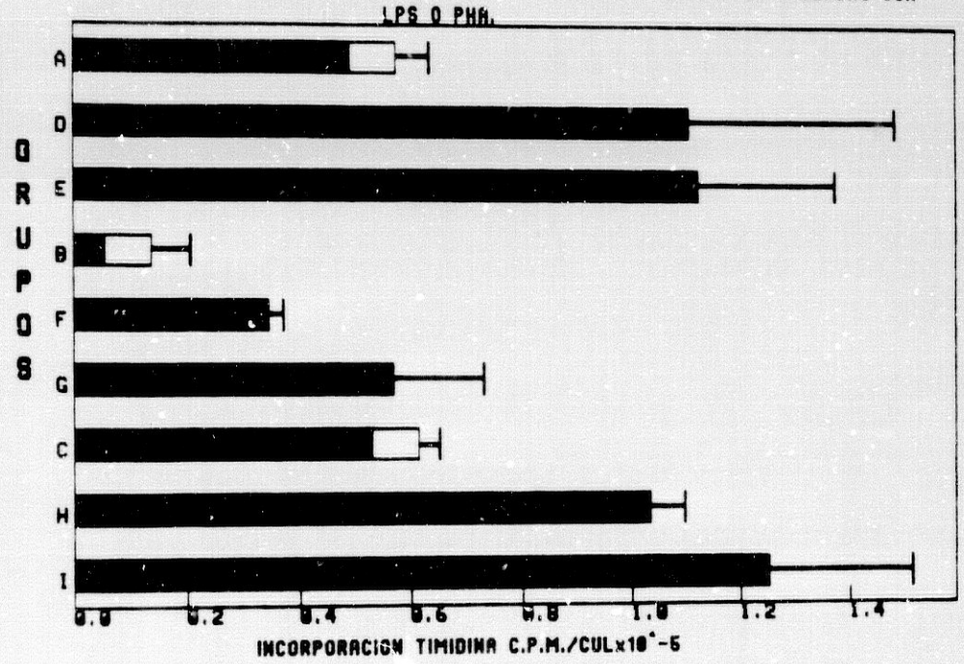


Figura 23. Células NS1 irradiadas inhiben mucho menos la proliferación de células no irradiadas del propio tumor que la de células esplénicas estimuladas con LPS o PHA.

Células de tumor linfoide B, NS1, en crecimiento exponencial fueron irradiadas y transferidas a cultivos de células esplénicas frescas de ratones Balb/c que fueron estimuladas con LPS (50 ug/ml) o con PHA (40 ug/ml). Asimismo células NS1 irradiadas fueron añadidas a células no irradiadas del propio tumor. Todos los cultivos se sembraron por triplicado en pocillos de fondo plano. A las 32 horas se añadió timidina tritiada, recogiéndose las células 5 horas después.

Grupos

A: Células NS1 irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul) + células NS1 no irradiadas ($3x10^4$ en 100 ul)

B: Células NS1 irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul) + LPS

C: Células NS1 irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas ($3x10^5$ en 100 ul) + PHA

Controles para A:

D: Células NS1 no irradiadas ($3x10^4$ en 100 ul)

E: Células NS1 no irradiadas ($3x10^4$ en 100 ul) + células esplénicas irradiadas ($1x10^4$ en 100 ul)

Controles para B:

F: Células esplénicas irradiadas ($1x10^5$ en 100 ul) + células

esplénicas no irradiadas ($3x10^5$ en 100 ul) + LPS

G: Células esplénicas no irradiadas ($3x10^5$ en 100 ul) + LPS

Controles para C:

H: Células esplénicas irradiadas ($1x10^5$ en 100 ul) + células esplénicas no irradiadas ($3x10^5$ en 100 ul) + PHA

I: Células esplénicas no irradiadas ($3x10^5$ en 100 ul) + PHA

INCORPORACION DE TIMIDINA

A	B	C	D
57519±6051	13755±6912	61326±3973	110424±38176
(49294)	(5530)	(53101)	
E	F	G	H
112138±25409	34477±2939	57037±16145	103435±6328
I			
125058±26997			

Números en paréntesis corresponden al número de cuentas después de sustraer las de las células irradiadas añadidas a cada grupo determinadas en cultivos separados. No se han sustraido las correspondientes a células no tumorales irradiadas por tener valores muy bajos.

Rectangulos negros: incorporación de timidina después de restar la de las propias células tumorales irradiadas.

Rectángulos blancos: incorporación de timidina por las correspondientes células de tumores irradiadas.

La inhibición de proliferación inducida por células irradiadas de NS1 sobre las células del propio tumor es ligeramente significativa, $0,05>p>0,02$. La inhibición sobre células esplénicas normales es muy significativa $p<0,005$ para LPS y no tanto para PHA, $0,05>p>0,02$.

FIG 24 - EFECTO DEL CAMBIO DE MEDIO EN LA CINETICA DE PROLIFERACION NS1.

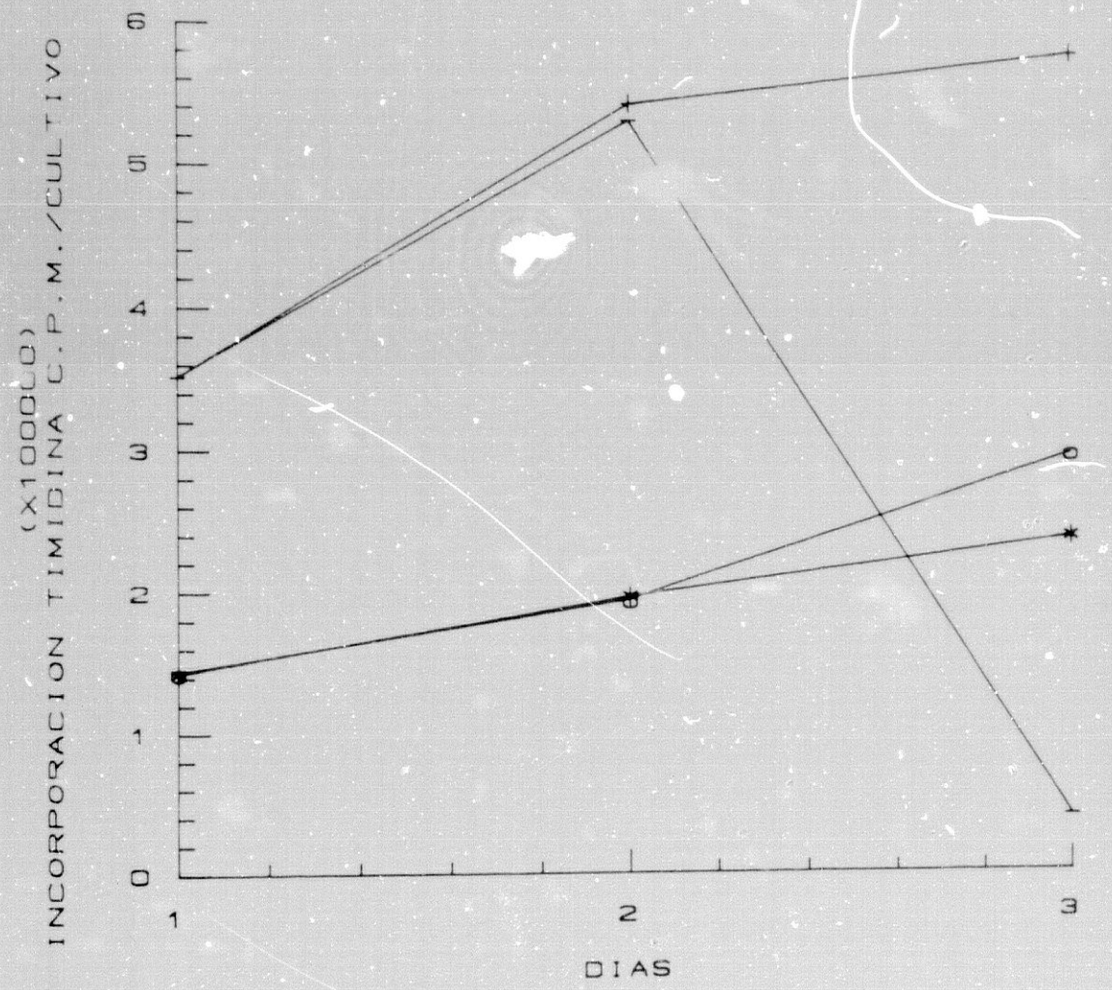


Figura 24.Efecto del cambio de medio de cultivo en la cinética de proliferación de tumor NSi.

Células del tumor NS1 fueron cultivadas en medio de cultivo con 10% suero bovino fetal en pocillos de fondo plano por triplicado (200 ul por pocillo) a dos concentraciones, $6x10^5$ y $2x10^5$ células/ml. En cultivos paralelos, se procedió a renovación periódica de medio de cultivo cada 24 horas, a partir de las primeras 24 horas (100 ul de medio viejo reemplazados por medio recién preparado). Se dieron pulsos de timidina de 24 horas, recolectándose las células al final de cada pulso.

	INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO			
dias	$6x10^5$	$6x10^5$	$2x10^5$	$2x10^5$
	cambio medio	sin cambio	cambio medio	sin cambio
1	351897±42489	351897±42489	143899±11641	143899±11641
2	547385±45192	535270±11596	198241±6317	196043±29825
3	588814±87665	39787±9887	242294±34620	302268±98067

Un test de Student no muestra diferencias significativas de incorporación de timidina por célula sembrada entre los cultivos a distintas concentraciones, excepto a dia 3, cuando los efectos de consumo de nutrientes son muy marcados como muestra la gran diferencia entre cultivos con y sin cambio a la concentración de $6x10^5$.

FIG 25 - EFECTO DEL CAMBIO DE MEDIO EN LA CINETICA DE LA PROLIFERACION DE NS1.

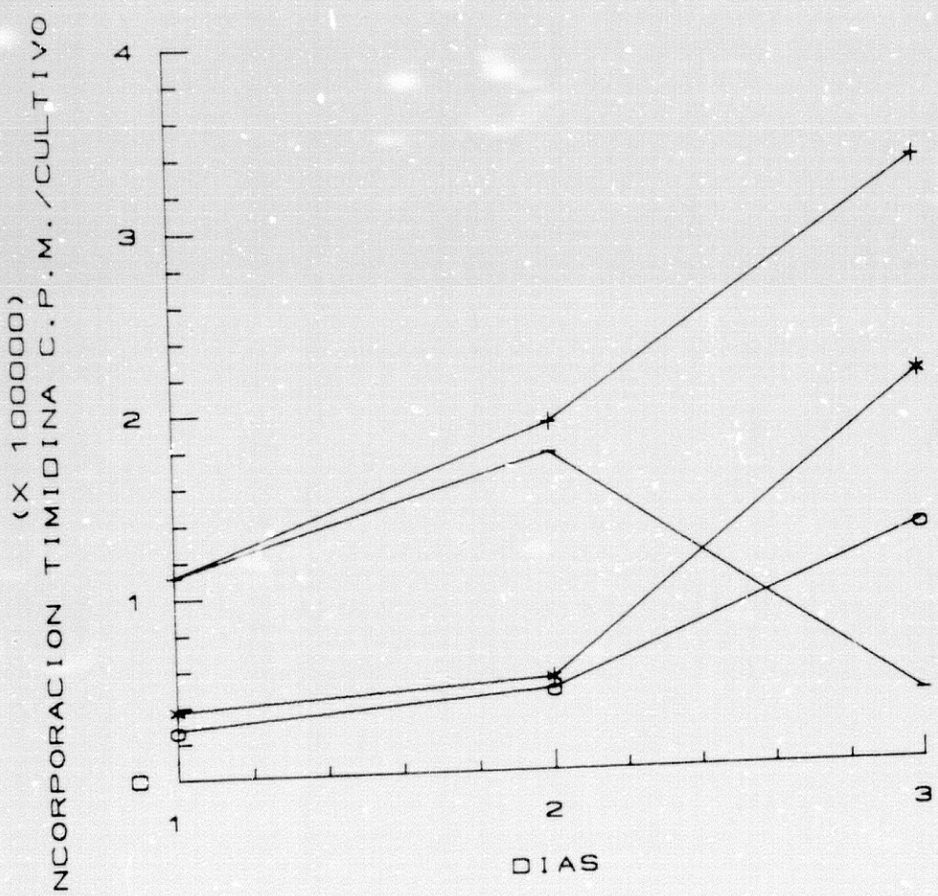


Figura 25.Efecto de medio de cultivo en la cinética de proliferación de tumor NS1

Células del tumor NS1 fueron cultivadas en medio de cultivo con 10% suero bovino fetal en pocillos de fondo plano por triplicado (200 ul por pocillo) a dos concentraciones, $2x10^5$ y $4x10^4$ células/ml. En cultivos paralelos, el medio fué renovado cada 24 horas, a partir de las primeras 24 horas (100 ul de medio viejo reemplazados por medio recién preparado). Se dieron pulsos de timidina de 24 horas, recolectándose las células al final de cada pulso.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

dias	$2x10^5$	$2x10^5$	$4x10^4$	$4x10^4$
	cambio medio	sin cambio	cambio medio	sin cambio
1	111950±10995	111950±10995	37717±2023	37717±2023
2	193787±12206	177064±14824	52078±10172	45773±1454
3	339800±17806	39031±15043	219455±18667	134548±9789

Un test de Student no muestra diferencias significativas de proliferación por célula sembrada que no puedan ser atribuidas a envejecimiento del medio de cultivo, p. ej. a dia 2 c.p.m. del cultivo a la menor densidad sin cambio de medio estrictamente proporcional a c.p.m. del cultivo a la mayor densidad con cambio de medio. También a dia 2, si se multiplica por 5 el cultivo con cambio de medio a $4x10^4$ y se

compara con el cultivo a $2x10^5$, aunque la media de incorporación de timidina es más alta en los cultivos a la menor densidad, la diferencia no es estadisticamente significativa.

+ Cultivos a $2x10^5$ cel/ml (cambio de medio). - Cultivos a $2x10^5$ cel/ml (sin cambio de medio). * Cultivos a $4x10^4$ cel/ml (cambio de medio). o Cultivos a $4x10^4$ cel/ml (sin cambio de medio)

FIG 26 - EFECTO DEL CAMBIO DE MEDIO EN LA CINETICA DE LA PROLIFERACION DE SP2.

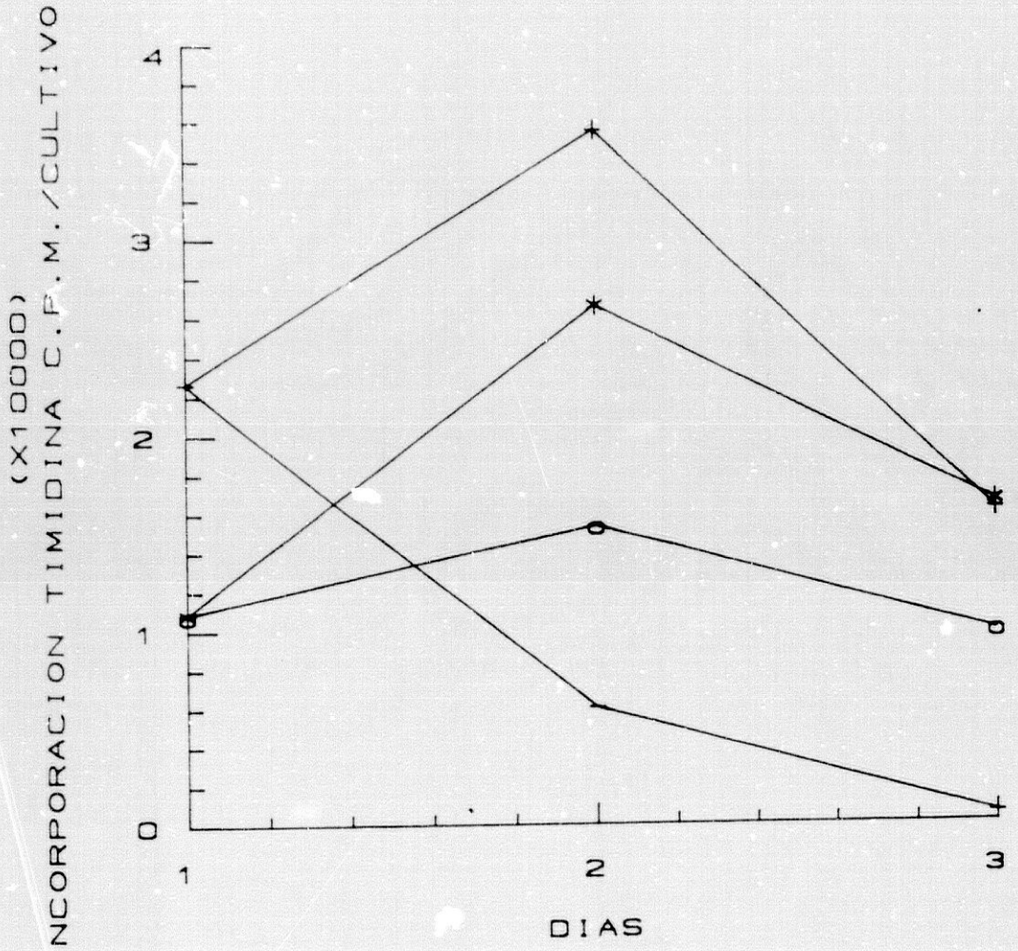


Figura 26.Efecto del cambio de medio de cultivo en la cinética de proliferación de tumor SP2.

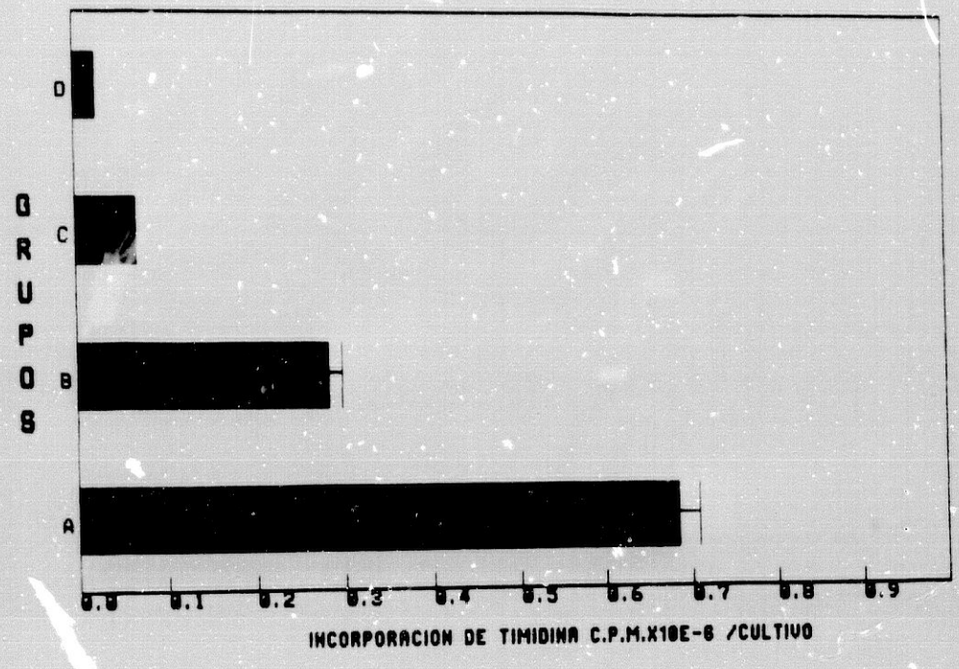
Células del tumor SP2 fueron cultivadas en medio de cultivo con 10% suero bovino fetal en pocillos de fondo plano por triplicado (200 ul por pocillo) a dos concentraciones, $6x10^5$ y $2x10^5$ células/ml. En cultivos paralelos, se procedió a renovación periódica de medio de cultivo cada 24 horas, a partir de las primeras 24 horas (100 ul de medio viejo reemplazados por medio recién preparado). Se dieron pulsos de timidina de 24 horas, recolectándose las células al final de cada pulso.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO

dias	$6x10^5$ cambio medio	$6x10^5$ sin cambio	$2x10^5$ cambio medio	$2x10^5$ sin cambio
1	226238±2277	226238±2277	108466±5233	108466±5233
2	359816±20290	60948±5725	268935±28044	155436±30586
3	165605±1864	4828±935	169835±17270	101576±12457

+ Cultivos a $6x10^5$ cel/ml (cambio de medio). - Cultivos a $6x10^5$ cel/ml (sin cambio de medio). * Cultivos a $2x10^5$ cel/ml (cambio de medio). o Cultivos a $2x10^5$ cel/ml (sin cambio de medio)

FIG 27 AUSENCIA DE EFECTO DE DENSIDAD EN LAS PRIMERAS HORAS DE CULTIVO DE TUMOR NS1.



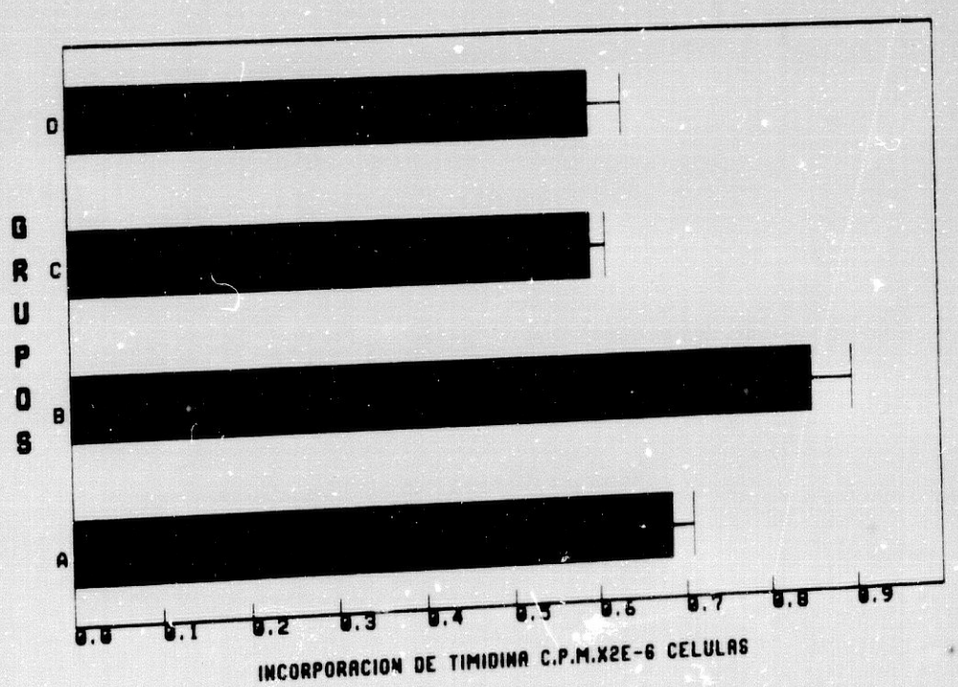


Figura 27. El tumor NS1 fué sembrado a 4 concentraciones que diferian en un factor 3x: $2x10^6$ cel/ml, $6,6x10^5$ cel/ml, $2,2x10^5$ cel/ml y $7,3x10^4$ cel/ml, en pocillos de fondo plano por triplicado. Se añadió timidina y las células se recolectaron 8 horas más tarde.

INCORPORACION DE TIMIDINA C.P.M./CULTIVO			
$2x10^6$ cel/ml	$6,6x10^5$ cel/ml	$2,2x10^5$ cel/ml	$7,3x10^4$ cel/ml
684102±23193	282865±16174	66047±1961	21997±1415

Tabla 1. Porcentaje de células en fase S en cultivos a alta ($10x10^7$ cels/ml) y baja ($1x10^6$ cells/ml) densidad estimulados con LPS (50 ug/ml).

Dias en cultivo	Porcentaje de células en S	
	($1x10^6$)	($10x10^7$)
1	10	9
2	38	7.5
3	16	6

Tabla 2. Porcentaje de células en fase S en cultivos tratados con colchicina a alta ($10x10^6$ cells/ml) y baja ($5x10^5$ cells/ml) densidad estimulados con LPS (50 ug/ml).

Horas en cultivo	Porcentaje de células en S	
	($10x10^6$)	($5x10^5$)
0	4.1	4.1
24	7.8	3.6
48	7	8.1
72	6.2	5.9

LPS (50 ug/ml) y colcemid (30 nanogramos/ml) fueron añadidos a todos los cultivos a tiempo 0.

Tabla 3. Incorporación de timidina en cultivos resembrados a dos concentraciones diferentes en medio fresco después de preincubación en un cultivo único durante 24 horas.

Horas después de preincubación	7×10^6 cels/ml	3.5×10^6 cels/ml
0 - 8	10223 (314)	16762 (588)
8 - 16	6485 (62)	13883 (788)
16 - 24	4256 (280)	9268 (564)
24 - 32	2797 (241)	9180 (677)

Ambos grupos fueron preincubados con LPS 30 ug/ml a 10^7 cels/ml.
Después de 24 h, los linfocitos fueron resembrados en medio fresco con LPS (50 ug/ml) a las concentraciones indicadas.

Números en paréntesis = desviación standard de cultivos triplicados.

Tabla 4. El simple contacto celular no reduce la proliferación.

Porcentaje de células en fase S medido por autoradiografia

Dias en cultivo	Grupos*						
	A	B	C	D	E	F	G
1	11.4	0.8	8.4	0.9	2.5	1.9	1.2
2	34.8	4.1	5.5	2.2	7.5	3.9	3.1
3	17.1	12.1	6.2	3.3	4.8	4	2.8

Grupos corresponden a cultivos establecidos como sigue:

A: C57Bl.10 células esplénicas a 1 x 10^6 cels/ml + LPS.

B: C57BlCr células esplénicas a 1 x 10^6 cels/ml + LPS

C: C57Bl.10 células esplénicas a 10 x 10^6 cels/ml + LPS.

D: C57BlCr células esplénicas a 10 x 10^6 cels/ml + LPS.

E: 1 x 10^6 C57Bl.10 células esplénicas + 9 x 10^6 C57BlCr células esplénicas en 1 ml + LPS.

F: Mezcla, después de incubación en 3H-Timidina de 0.1 ml de grupo C y 0.9 ml de grupo D.

G: 1 x 10^6 C57Bl células esplénicas + 9 x 10^6 C57BlCr células esplénicas en 1 ml sin LPS.

Tabla 5. Proliferación en cultivos en idénticas condiciones de densidad.

Grupos[a]	Fase del ciclo (porcentaje)[b]		
	G1	S	G2
A	87,5	10,9	1,6
B	81,6	16,1	2,3

a/ Grupos corresponden a cultivos establecidos a $1x10^6$ C57Bl10 células esplénicas + $9x10^6$ C57Bl10Cr células esplénicas en volumen de 1 ml (B) y una mezcla antes de citometria de flujo de 0,1 ml de un cultivo de C57Bl10 a 10^7 cels/ml y 0,9 ml de un cultivo de células Cr a 10^7 cels/ml (A). LPS añadido a todos los cultivos a tiempo 0 (50 ug/ml).
b/ Todas las determinaciones fueron hechas por citometria de flujo a dia 2 de cultivo.

Tabla 6. Blastos inducidos por LPS a densidades altas no inducen proliferación de otras células esplénicas.

Células de la cepa respondedora a LPS, C57Bl6 fueron precultivadas durante 1 dia en presencia de LPS (50 ug/ml). Al cabo de este tiempo fueron irradiadas, lavadas y añadidas a cultivos también preincubados de células esplénicas de la cepa no respondedora C57Bl10/ScCr. Se midió incorporación de timidina de los cultivos por separado y de las mezclas de ambos cultivos para ver si en estos últimos se detecta una activación adicional sobre la correspondiente a la suma de los cultivos separados que indicaria una interacción positiva con aumento de la incorporación de timidina sobre la suma teorica de los cultivos separados. Pulso de timidina durante las 24 horas siguientes a la mezcla y nuevo pulso de 24-48 horas. Las células se recolectaron a las 24 y 48 horas. Media de cultivos por triplicado

Grupo A: células preincubadas respondedoras a LPS, irradiadas y sembradas a $1x10^6$ cel/ml en 100 ul por pocillo.

Grupo B: células preincubadas no respondedoras, no irradiadas, sembradas a $10x10^6$ cel/ml, 100 ul por pocillo.

Grupo C: 100 ul de grupo A + 100 ul de grupo B.

Se añadió LPS a todos los grupos (50 ug/ml)

horas	INCORPORACION DE TIMIDINA		
	A	B	C
0-24	20582±1233	34620±2339	29988±165
24-48	2852±198	24800±1553	21587±471

Tabla 7. Respuesta en PFC inducida por LPS en linfocitos B específicos para TNP sembrados por triplicado a 15,000 y 5,000 células por pocillo.

pocillos	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5
	PFC de cultivos a 15,000 cels/pocillo			
1	83(27,7)	218(72,7)	134(44,7)	155(51,7)
2	78(26)	144(48)	240(80)	72(24)
3	54(18)	182(60,7)	98(32,7)	161(53,7)
	PFC de cultivos a 5,000 cels/pocillo			
1	43	61	131	157
2	48	99	118	171
3	34	162	146	86

Números entre paréntesis de los cultivos a 15000 células corresponden a PFC por 5000 células sembradas.

PFC por 5000 células sembradas mayor en cultivos a menor densidad $p<0.01$.

PFC en controles de timocitos solos entre 0 y 10 (10 solamente en un pocillo a día 4).

REFERENCIAS.

1. Gershon, R.K. & Kondo, K. 1970. Immunology 18,723

2. Möller, G. 1988. Scand. J. Immunol 27, 247

3. Pritchard-Briscoe, H & Loblay, R.H. 1989. Res. Immunol 140, 313

4. Tada, T. et al. 1989. Res. Immunol 140, 291

5. Loblay, R.H. & Basten, A. 1986. In "Paradoxes in Immunology" p115 CRC Press Inc., Boca Raton, Florida

6. Arrenbretch, S. & Mitchel G.F. 1975. Immunology 28, 485

7. Loblay, R.H. et al. 1984. Aust. J. Exp. Med. Sci. 62, 11

8. Kronenberg. M. et al. 1985. Nature 313, 647

9. DeSantis, R. et al. 1985. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82, 8638

10. Imai, K. et al. 1986. Proc. nat. Acad. Sci. USA. 83, 8708

11. Geen, D.R. & Zheng, H. 1989. Res. Immunol. 140, 294

12. Weiner, D.B. et al. 1988. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85, 6077

13. Fairchild, R.L. et al. 1988. J. Immunol. 141, 3342

14. Kölsch, E. et al 1989. Res. Immunol. 140, 286

15. Krzych, U. et al. 1989. Res. Immunol. 140, 302

16. Murphy, D.B. et al. 1976. J. Exp. Med. 144, 699

17. Tada, T. et al. 1976. J. Exp. Med. 144, 713

18. Steinmetz, M. et al. 1982. Nature. 300, 35

19. Ochi, A. et al. 1982. J. Immunol. 129, 227

20. Lowy, A. et al. 1983. J. Exp. Med. 157, 353

21. Tada, t. et al. 1985. Immunol. Rev. 83, 106

22. Nakayama, T. et al. 1988. Eur. J. Immunol. 18, 761

23. Shou, L. et al. 1976. J. Exp. Med. 143, 1100

24. Kurnicck, J.T. et al. 1976. Scand. J. Immunol. 5, 771

25. Hirschberg, H. & Thorsby, E. 1977. Scand. J. Immunol. 6, 809

26. Hodes, R.J. & Hathcock, K.S. 1976. J. Immunol. 116, 167

27. Engleman, E.G. & McDevitt, H.G. 1978. J. Clin. Invest. 61, 828

28. Knaab, S. & Jeannet, M. 1983. Int. Archs. Allergy. Appl. Immun. 71, 97

29. Bresnihan, B. & Jasin, H.E. 1977. J. Clin. Invest. 59, 106

30. Sano, K. et al. 1987. J. Exp. Med. 165, 1284

31. Loblay, R.H. et al. 1978. Nature 272, 620

32. Dray, S. 1962. Nature(London) 195, 677

33. Jacbson, E.B. & Herzenberg, L.A. 1972. J. Exp. Med. 135,

1151

34. Benaroch, P. & Bordenave, G. 1989. Res. Immunol. 140, 307

35. Benaroch, P & Bordenave, G. 1989. J. Immunol. 142, 1

36. Weinberger,J.Z. et al. 1980. J.Exp.Med. 152, 161

37. Minami,M. et al. 1981. J.Exp.Med. 154, 1390

38. Okuda,K. et al. 1981. J.Exp.Med. 154, 468

39. Aoki,I. et al. 1983. J.Exp.Med. 157, 1726

40. Sherr.D.H.et al. 1983. J.Exp.Med. 157, 515

41. Sherr,D.H., and Dorf,M.E. 1981. J.Exp.Med. 153, 1445

42. Sherr,D.H. et al 1981. J.Exp.Med. 153, 640

43. Usui,M. et al. 1984 J.Immunol. 133,1137

44. Sunday,M.E. et al. 1981. J.Exp.Med. 153,811

45. Sherr,D.H. & Dorf,M.E. 1982. J.Immunol. 128, 1261

46. Okuda,K. et al 1981. J.Exp.Med. 154, 1838,

47. Aoki,I. et al. 1984. J.Immunol. 132, 1735

48. Sherr,D.H. et al. 1985. Role of idiotypes in the 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl (NP) specific suppressor T cell pathway. In Idiotypes-Structure and Function, ed A. Nisonoff, M.I.Greene. NY: Plenum.

49. Asherson,G.L. 1984. Immunology, 53, 491

50. Dorf,M.E., and Benacerraf,B. 1984 Suppressor cells and Immunoregulation. Ann. Rev. Immunol. 2: 127

51. Schrader,J.W. 1979. Scand. J. Immunol. 10, 387

52. Kawasaki,H. et al. 1987. J. Immunol. 138, 2063

53. Hayglass,K.T. 1986. Immunology Today, vol 7, nº 6

54. Becker, M.J. et al. 1981. Clin. Exp. Immunol. 45, 439

55. Treves et al. 1979. J. Immunol. 122, 643

56. Laughter, A.H. & Twomey, J.J. 1977. J. Immunol. 119, 173

57. Godwin, J.S. et al. 1977. J. Exp. Med. 146, 1719

58. Metzger, Z. et al. 1980. J. Immunol. 124, 983

59. Sathish,S. et al. 1983. Infect. Immun. 42, 890

60. Wadee, A.A. et al. 1981. Clin. Exp. Immunol. 46, 82

61. Wahl, S.M. et al. 1988. J. Exp. Med. 168, 1403

62. Janossy, G. et al. 1983. Lancet i, 839

63. Panush, R.S. 1982. J. Clin. Lab. Immunol. 9, 59

64. Bullock, W.E. 1978. J. Infect. Dis. 137, 341

65. Ellner, J.J. et al. 1978. J. Immunol. 121, 2

66. Cone, L. & Uhr, J.W. 1964. J. Clin. Invest. 43, 2241

67. Fahey, J.L. et al. 1963. Amer. J. Med. 35, 698

68. Rapp, C.E. et al. 1978. Amer. J. Dis. Child. 132, 78

69. Provisor, A.J. et al. 1975. N. Engl. J. Med. 293, 62

70. Broder, S. 1975. N. Engl. J. Med 293, 887

71. Tosato, G. et al. 1979. N. Engl. J. Med. 301, 1133

72. Johnsen, H.E. et al. 1979. Scand. J. Immunol. 10, 251

73. Tsukuda, K. et al. 1981. Cell. Immunol. 60, 191

74. Papageorgiu, P. et al. 1972. J. Immunol. 108, 494

75. Tsuchimoto, T. et al. 1972. J. Immunol. 109, 884

76. Granger, G.A. et al. 1970. J. Immunol. 104, 1476

77. Calebaugh, D.L. 1974. Cell. Immunol. 11, 286

78. Waksman, B.H. et al. 1976. Cell. Immunol. 21, 161

79. Yoshida, T. et al. 1976. J. Immunol. 117, 548

80. Hersh, E.M. et al. 1974. Clin. Exp. Immunol. 17, 463

81. Hersh, E.M. et al. 1974. Transplantation 17, 221

82. Green, S.S. et al. 1974. Transplantation 18, 496

83. Han, T. et al. 1975. Clin. Exp. Immunol. 20, 73

84. Vesole, D.H. et al. 1979. J. Immunol. 123, 1322

85. Farkas, R. et al. 1986. Immunology 57, 395

86. Farkas, R. et al. 1987. Clin. Immunol. Immunopathol. 42, 171

87. Gilbert, K.M. & Hoffmann, M.K. 1982. Immunology, 46, 545

88. Mizel, S.B. 1989. FASEB J. 3, 2379

89. Defrance, T. et al. 1988. J. Exp. Med. 168, 1321

90. Hoffmann, M.K. et al. 1975. J. Immunol. 114, 738

91. Koenig, S. & Hoffmann, M.K. 1979. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 4608

92. Melchers, F. et al. 1975. Scand. J. Immunol. 4, 853

93. Haas, W. 1979. In "Immunological Methods" (I.Lefkoviths & B. Pernis) pp269-76. Academic Press Inc, N.Y.

94. Rittenberg, M.B. & Pratt, L. 1969. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 575

95. Cunningham, A. 1965. Nature 207, 1106

96. Gronowicz, E. et al. 1976. Eur. J. Immunol. 6, 588

97. Coutinho, A. & Meo, T. 1978. Immunogenetics. 7, 17

98. Flahart, R.E. & Lawton, A.R. 1987. J. Exp. Med. 166, 864

99. Gronowicz, E. 1979. J. Immunol. 123, 2057

100. Björklund, M. et al. 1987. Ann. Inst. Pasteur/Immunol 138, 181

101. Nossal, G.J.V. & Pike, B.L. 1976. Immunology 30, 189

102. Stoker, J.W. 1976. Immunology 30, 181

103. Anderssor, J. et al. 1977. J. Exp. Med. 145, 1511

104. McHeyzer-Williams, M.G. & Nossal, G.J.V. 1989. J. Immunol. Methods. 119, 9

105. Pike, B.L. & Nossal, G.J.V. 1985. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82, 3395