LINFOCITOS T DOBLE NEGATIVOS (CD4-, CD8-), COMO CELULAS EFECTORAS EN LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL; SU CONTROL POR CELULAS Th (CD4+).

LINFOCITOS T DOBLE NEGATIVOS (CD4-, CD8-), COMO CELULAS EFECTORAS EN LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL; SU CONTROL POR CELULAS Th (CD4+)

Tesis presentada por D. Abelardo Caballero Gonzalez, para optar al grado de Doctor en Medicina.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN Medicina

Curso de 1989 a 1990 Folio 85 vto Número 170

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Abelardo Caballero Gonzalez, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "Linfocitos T doble negativos (CD4-, CD8-) como células efectoras en la respuesta inmune antitumoral. Su control por células Tcr (CD4+)".

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

Granada 1 de [illegible] de 1990

EL PRESIDENTE,

Fdo.: Vicente Pedraza

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: N Olea Serrano

EL VOCAL,

Fdo: HERNANDEZ CORTES FUNES

EL VOCAL,

Fdo.: M Ruiz de Almodóvar

EL VOCAL,

Fdo. Eduardo Fernandez-Cruz.

FIRMA DEL GRADUANDO,

A Caballero

D. FEDERICO GARRIDO TORRES-PUCHOL, CATEDRATICO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR, JEFE DEL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DE LA CIUDAD SANITARIA VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

Certifica: Que la tesis doctoral que presenta al superior juicio del tribunal que designe la Facultad de Medicina de Granada, D. Abelardo Caballero González, sobre el tema: LINFOCITOS T DOBLE NEGATIVOS (CD4-, CD8-), COMO CELULAS EFECTORAS EN LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL; SU CONTROL POR CELULAS Th (CD4+), ha sido realizada bajo mi dirección durante los cursos academicos 1987-88, 1988-89 y 1989-90, siendo expresión de la capacidad tecnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor al grado de doctor en Medicina, siempre que asi lo considere el citado tribunal.

Granada, 6 de Marzo de 1990

Fdo: Prof. Dr. D. Federico Garrido

D. ANTONIO GARRIDO TORRES-PUCHOL, DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS, ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANLISIS CLINICOS DE LA CIUDAD SANITARIA VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

Certifica: Que la tesis doctoral que presenta al superior juicio del tribunal que designe la Facultad de Medicina de Granada, D. Abelardo Caballero Gonzàlez, sobre el tema: LINFOCITOS T DOBLE NEGATIVOS (CD4-, CD8-), COMO CELULAS EFECTORAS EN LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL; SU CONTROL POR CELULAS Th (CD4+), ha sido realizada bajo mi direcciòn durante los cursos academicos 1987-88, 1989 y 1990, siendo expresiòn de la capacidad tecnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor al grado de doctor en Medicina, siempre que asi lo considere el citado tribunal.

Granada, 6 de Marzo de 1990

Fdo: Dr. D. Antonio Garrido

a Mercedes

a mis hijos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a la realizaciòn de este trabajo.

Al Dr. D. Federico Garrido por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.

A Antonio Garrido, sin cuya amistad y comprensiòn hubiera sido imposible la realizaciòn de este trabajo.

A Matias Pérez que me inició en este arduo trabajo.

A Inmaculada Delgado por su preocupaciòn y apoyo técnico.

Quiero extender mi agradecimiento a todas las personas que trabajan en el Servicio de Anàlisis Clinicos del Hospital Virgen de las Nieves, que me han ayudado de alguna forma en la realizaciòn de esta Tesis.

INDICE

Pag.

I.- INTRODUCCION

1.- INMUNOLOGIA TUMORAL.....1

1.1.- Introducción.....1

1.2.- Vigilancia inmune.....4

1.3.- Mecanismos de escape tumoral.....7

a.- Modulación antigénica.....7

b.- Liberación de antígenos.....8

c.- Tolerancia.....8

d.- Factores genéticos.....9

e.- Inmunoselección.....9

f.- Inmunosupresión.....9

g.- Camuflaje.....10

1.4.- Mecanismos de defensa inmune.....10

a.- Mecanismos específicos humorales.....11

b.- Opsonización y fagocitosis.....13

c.- Citotoxicidad por ADCC.....13

d.- Macrófagos activados no específicos.....13

e.- Citotoxicidad natural.....14

f.- Citotoxicidad mediada por linfocitos T.....15

2.- MARCADORES FUNCIONALES DE LAS CELULAS T EN RATON.....16

2.1.- Receptor de células T.....16

a.- Cadena beta del receptor de células T.....19

Pag.

b.- Cadena alfa del receptor de células T.....20

c.- Cadena ganma del receptor de células T.....21

d.- Cadena delta del receptor de células T.....22

e.- Ontogenia del receptor de células T.....22

2.2.- Complejo CD3.....24

2.3.- Molécula CD4.....25

2.4.- Molécula CD8.....31

3.-RECONOCIMIENTO ANTIGENICO.....33

3.1.- Molécula de clase I del CMH.....35

3.2.- Molécula de clase II del CMH.....37

3.3.- Papel del CMH en el reconocimiento antigénico.....38

3.3.1.- Restricción de clase I.....39

3.3.2.- Restricción de clase II.....40

3.3.3.- Aloreactividad.....40

3.4.- Procesamiento y presentación del antigeno.....43

3.4.1.- Presentación por moléculas de clase I..... ..43

3.4.2.- Presentación por moléculas de clase II.....47

4.- DESARROLLO TIMICO DE LAS CELULAS T.....49

4.1.- Timocitos inmaduros dobles negativos (CD4- CD8-)...49

4.2.- Timocitos inmaduros simples positivos (CD4+ CD8-, CD4- CD8+).....52

4.3.- Timocitos inmaduros dobles positivos (CD4+ CD8+)...52

Pag.

4.4.- Adquisición de timocitos maduros simples positivos.53

4.4.1.- Selección positiva.....54

4.4.2.- Delección clonal.....56

4.4.3.- Coexistencia de la doble selección.....58

5.- POBLACION PERIFERICA DE CELULAS T.....59

5.1.- Linfocito T maduro cooperador o CD4+.....59

5.2.- Linfocito T maduro citotóxico o CD8+.....63

5.3.- Linfocitos maduros doble negativos o CD4- CD8-.....64

6.- EL SISTEMA TUMORAL GR9.....65

II.- OBJETO DE LA TESIS.....69

III.- MATERIALES Y METODOS

MATERIALES.....70

1.- RATONES.....70

2.- LINEAS TUMORALES.....70

3.- ANTISUEROS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES.....74

4.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.....77

Pag.

METODOS.....78

5.- GENERACION DE CELULAS CITOTOXICAS ANTITUMORALES.....78

6.- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.....81

7.- DEPLECIONES DE LAS CELULAS CITOTOXICAS ANTITUMORALES.83

8.- ENSAYO DE INHIBICION DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE Ac Mo FRENTE A ANTIGENOS DE CLASE I.....84

9.- ESTUDIO FENOTIPICO POR CITOMETRIA DE FLUJO.....86

10.- INHIBICION DEL CRECIMIENTO IN VIVO POR TRATAMIENTO CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI L3T4.....88

IV.- RESULTADOS

1.- GENERACION DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL.....93

2.- ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES EFECTORAS.....95

3.- ESTUDIO FENOTIPICO POR CITOMETRIA DE FLUJO.....103

4.- ESTUDIO DE REACTIVIDAD.....106

5.- ENSAYO DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DEL CLON TUMORAL GR9.B9.....110

V.- DISCUSION.....120

Pag.

VI.- CONCLUSIONES.....137

VII.- BIBLIOGRAFIA.....138

INTRODUCCION

1.- INMUNOLOGIA TUMORAL.

1.1- INTRODUCCION.

Las primeras ideas sobre el posible caràcter inmune de la defensa antitumoral aparecieron a principios de siglo, cuando algunos investigadores trasplantaron tumores experimentales de unos animales a otros, obteniendo su rechazo en la casi totalidad de los casos; estos resultados en aquel tiempo fueron interpretados rapidamemte y de la siguiente forma: la transformacion de una célula normal en cancerosa se acompaña por la aparición de nuevas moléculas que el organismo reconoce como antigenos extraños (se crea la figura del antigeno tumoral especifico asociado al tumor), desencadenando una respuesta inmune frente a ellos y destruyendo el tumor. Esta respuesta explicaban, se expresa màs fuertemente en tumores trasplantados que en los originales, debido a que los primeros en contraste con los últimos no han tenido tiempo de adaptarse a esta respuesta inmune y contrarrestarla. Esta idea, tan sugerente en un principio, se derrumbò en cuanto se pudo disponer de las cepas puras endogàmicas. Al usar estas cepas de animales de experimentaciòn se comprobo que los rechazos tumorales, anteriormente descritos se debian no a los antigenos tumorales sino a los antigenos de histo-

compatibilidad; así al realizar estos trasplantes entre individuos con identidad para sus antígenos de histocompatibilidad, los tumores crecían y mataban al animal. Este hecho llevó a la mayoría de los investigadores al extremo opuesto: los tumores al ser trasplantados en cepas endogámicas no son rechazados, luego no poseen antígenos tumorales y por lo tanto el sistema inmune es impotente para controlar el crecimiento tumoral. Este hecho paralizó prácticamente el campo de la inmunología tumoral, mantenida por un reducido número de investigadores que prosiguieron su estudio en esta materia. La perseverancia de estos empezó a dar sus frutos en la década de los cincuenta. Así Foley (1953) ideó un sistema para demostrar la existencia de los antígenos tumorales, y por tanto la posibilidad del rechazo inmune de los tumores; esta idea consistía en extrangular progresivamente el tumor por unas hebras atadas a su alrededor, que inducían la necrosis del tumor por falta de riego sanguíneo e impedían su difusión por el animal. Cuando reinyectaba estos animales con células vivas del mismo tumor, observó que eran frecuentemente rechazadas, mientras que la misma inoculación efectuada en animales no tratados previamente daba lugar a la progresión del tumor y la muerte del huésped. A los pocos años Prehn y Main (1957), confirmaron estos experimentos y mostraron además que mientras que inmunizaciones con tumores inducidos por Metil-

colantreno en ratones singénicos pueden impedir el posterior crecimiento del mismo tumor, inmunizaciones con tejidos normales procedentes del mismo ratòn no pueden. O viceversa, las inmunizaciones con células tumorales no hacian rechazar trasplantes de piel entre animales singénicos, lo que descartaba a los antigenos de histocompatibilidad como causantes del rechazo. Ademàs Prehn y Main obtuvieron evidencias que indicaban la individualidad de los antigenos tumorales para cada uno de los tumores inducidos por carcinògenos quimicos. Fueron G. Klein y cols. (1960) los que aportaron las pruebas definitivas sobre la existencia de los antigenos tumorales y la posibilidad del rechazo inmune de tumores por parte del huésped. Asi indujeron un tumor en la pata de un ratòn, la cual amputaron y trasplantaron las células tumorales a otro ratòn, donde el tumor progresò. Con las células tumorales irradiadas procedentes de este segundo ratòn, inmunizaron el ratòn primitivo, que màs tarde era inyectado con células tumorales vivas que no progresaron en ningun caso.

Tras estos experimentos quedo establecido la posibilidad de que el sistema inmune rechace tumores trasplantados y la existencia en estos, de moléculas hacia las cuales se centre la respuesta inmune, moléculas conocidas genericamente como antigenos tumorales.

1.2.- VIGILANCIA INMUNE.

Aunque la posibilidad de rechazo de tumores trasplantados está plenamente demostrada y aceptada no debemos olvidar que en cualquier caso se trata de un supuesto experimental donde el tumor se inocula al animal sano de una forma brusca muy distinta a la manera en que un tumor aparece en la naturaleza. La posibilidad de que el sistema inmune actue controlando e impidiendo la proliferación de células cancerosas en el organismo, es una teoría atractiva y que uno tiende a aceptarla como algo evidente, esta fue expresada por L. Thomas (1959) y hoy es conocida como vigilancia inmune (Burnet, 1970), siendo su hipótesis principal la de que el sistema inmune es capaz de detectar y destruir las células tumorales que emergen en un organismo.

Esta teoría es sin embargo difícil de demostrar y en la realidad tropieza con argumentos de complicada interpretación. Así observamos que existen muy pocos casos donde se describa la desaparición natural de un tumor espontaneo frente al cual el organismo aparece la mayoría de las veces totalmente indefenso, aunque cabe pensar que la actuación de la "vigilancia inmune" tendría que suceder antes del diagnóstico y para cuando este se hace posible lo que en realidad obser-

vamos es una batalla perdida (G. Klein, 1982), mientras que los éxitos de esta "vigilancia inmune" escaparian por tanto a nuestra apreciaciòn.

Por lo tanto, para ser efectivo, el sistema de vigilancia inmune deberia ser capaz de reconocer y reaccionar con los antigenos tumorales, presentes en los clonos de células malignas de nueva aparición, antes de que la masa tumoral haya obtenido un tamaño crítico a partir del cual estos mecanismos de control no son efectivos (Benjamini y col 1982), o actuen mecanismos de tipo supresor.

Del apartado anterior se deduce que la principal predicciòn de la vigilancia inmune será el aumento en la aparición de neoplasias cancerosas, en individuos con déficit inmunològicos por timectomia neonatal, irradiacciòn, tratamiento con sueros antilinfociticos o drogas inmunosupresoras, asi como en individuos con inmunodeficiencias heredadas. En una extensiòn limitada esto se ha confirmado por observaciones clínicas y experimentales. En general los individuos inmunològicamente deficientes desarrollan càncer màs frecuentemente de lo que lo hacen los individuos normales. La dificultad, sin embargo, estriba en que la mayoria de los tumores desarrollados en tales individuos pertenecen al sistema linfoide. Si la

teoría de la vigilancia inmune fuera correcta, se observaría un incremento general de todas las formas de tumores, no solo las del sistema linfoide. La preponderancia de tumores linfoides sugiere que este incremento no resulta de un fallo de la vigilancia inmune, sino del tratamiento que los individuos inmunodeficientes reciben. Apoyando este argumento, observamos que ratones congénitamente atímicos, esto es, con una parte del sistema inmune incapacitado, tienen la misma incidencia de aparición de tumores que los ratones normales. También el hecho de la existencia de tumores que son más malignos a dosis bajas, precisamente aquellas donde la vigilancia inmune debe ser más eficiente, es argumento en contra de la existencia de la misma. Sin embargo, para cada uno de los argumentos antes citados puede existir una explicación, así los individuos inmunodeficientes no viven lo suficiente para mostrar una alta incidencia de cáncer. Los ratones atímicos no están totalmente desprovistos de sus linfocitos T, y además tienen completamente desarrolladas las celulas NK, que pueden sustituir o incluso jugar un papel más importante en la vigilancia inmune. Indudablemente los argumentos en contra y a favor pueden continuar por mucho tiempo hasta que se alcance un acuerdo en el papel que el sistema inmune juega en el control de la aparición de neoplasias cancerosas.

Por lo hasta aquí expuesto podemos concluir que la vigilancia inmune podría ectuar durante el proceso de oncogénesis y una vez que el tumor se ha desarrollado, existiendo dos conjunto de mecanismos antagónicos, unos favorables al escape del tumor y otros dirigidos hacia su destrucción.

1.3.- MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL.

Los mecanismos de escape tumoral intentan explicar la gran paradoja de la inmunología tumoral, que es el por qué neoplasias demostrablemente inmunogénicas, eluden las células efectoras del sistema inmune. Los mecanismos de escape tumoral citados en la bibliografía son muy numerosos, aquí citaremos los que a nuestro juicio son más importantes o mejor conocidos: G. Klein (182), Hood y cols (1978), Roitt y cols (1985).

a.- Modulación antigénica. En presencia de anticuerpos, algunos antígenos son retirados de la superficie celular, lo que envuelve procesos de liberación, endocitosis, o redistribución antigénica en la membrana, con una pérdida completa del determinante, de superficie celular, lo que facilitaría el escape por desaparición del antígeno diana reconocido por el mecanismo efector del sistema inmune.

b.- Liberación de antígenos. Antígenos tumorales solubles han sido detectados circulando en suero de animales y personas portadoras de un tumor, teniendo la capacidad de comprometer la inmunidad mediada por células T por la saturación de los lugares de reconocimiento del antígeno, particularmente en lugares próximos al tumor, donde la concentración de antígeno liberado se supone más alta. De igual manera podrá paralizar la acción efectora de anticuerpos.

c.- Tolerancia. Una inhibición específica de la respuesta inmune normal a antígenos tumorales puede darse en ciertos tumores. Así ocurre en tumores mamarios murinos producidos por el virus (MTV), transmitido a través de la leche materna.

Experimentos de trasplante muestran que los tumores mamarios son mucho más inmunógenos en ratones que no poseen el virus, que en aquellos que lo tienen. Aquellos ratones que son infectados congénitamente, llegan a ser inmunológicamente tolerantes a ciertos antígenos comunes al virus y por tanto no responden a los tumores.

d.- Factores genéticos. Se ha demostrado con varios virus en ratones y con el virus influenza en humanos, que huéspedes con un cierto haplotipo para el complejo mayor de

histocompatibilidad (CMH) son pobres inductores de una respuesta citotóxica de linfocitos T, probablemente debido a la imposibilidad de que los productos de CMH formen un complejo adecuado con los antígenos extraños.

e.- Inmunoselección. Aunque cada tumor empieza probablemente por una sola célula, lo que representa un clon, las células de este clon es probable que no permanezcan inalterables. Mientras el tumor crece, ocurren cambios adicionales; así en un momento determinado, la población celular del tumor es una mezcla heterogénea de diferentes subclonos. Si uno de estos cambios da como resultado una disminución de la antigenicidad, la variante poco antigénica tomará ventaja bajo la presión selectiva ejercida sobre el tumor por el sistema inmune del huésped. Esta variante puede, por tanto, hacerse mayoritaria y así aumentar la inmunorresistencia general del tumor. La disminución de antigenicidad de estas células tumorales puede venir no solo de la pérdida de antígenos, sino también de la disminución de su densidad sobre la membrana. Si esta densidad baja de un cierto nivel umbral, el tumor puede llegar a ser "invisible" para el sistema inmune.

f.- Inmunosupresión. La inducción de células supresoras antígeno específicas, juega un importante papel en la regula-

ción de la respuesta inmune a ese antigeno.La actividad supresora puede afectar al nivel de ambas respuestas humoral y celular. Células supresoras especificas de tumor han sido identificadas en algunos ratones portadores de tumor y pueden jugar un papel en la aparente ineficacia de la respuesta de estas ratones. Más aún, la transferencia de estas células supresoras al mismo tiempo o cinco dias despues puede suprimir el rechazo de dosis inmunógenas de células tumorales.

g.- Camuflaje. Se ha observado en ciertos tumores que su crecimiento, en animales inmunocompetentes, se ve favorecido cuando son inoculados en pequeño número, osea en condiciones teoricamente optimas para el rechazo. Asi las células tumorales parece como si se "camuflaran", pasando desapercibidas para el sistema inmune, hasta que el tumor logra un tamaño que lo hace incontrolable.

1.4- MECANISMOS DE DEFENSA INMUNE.

Como otros muchos estímulos, los antigenos asociados al tumor activan no solo uno, sino un completo juego de mecanismos de defensa inmune, tanto especificos como no especificos, humorales y celulares. Asignar de una forma general un papel predominante a unos mecamismos sobre otros, es hoy dia arri-

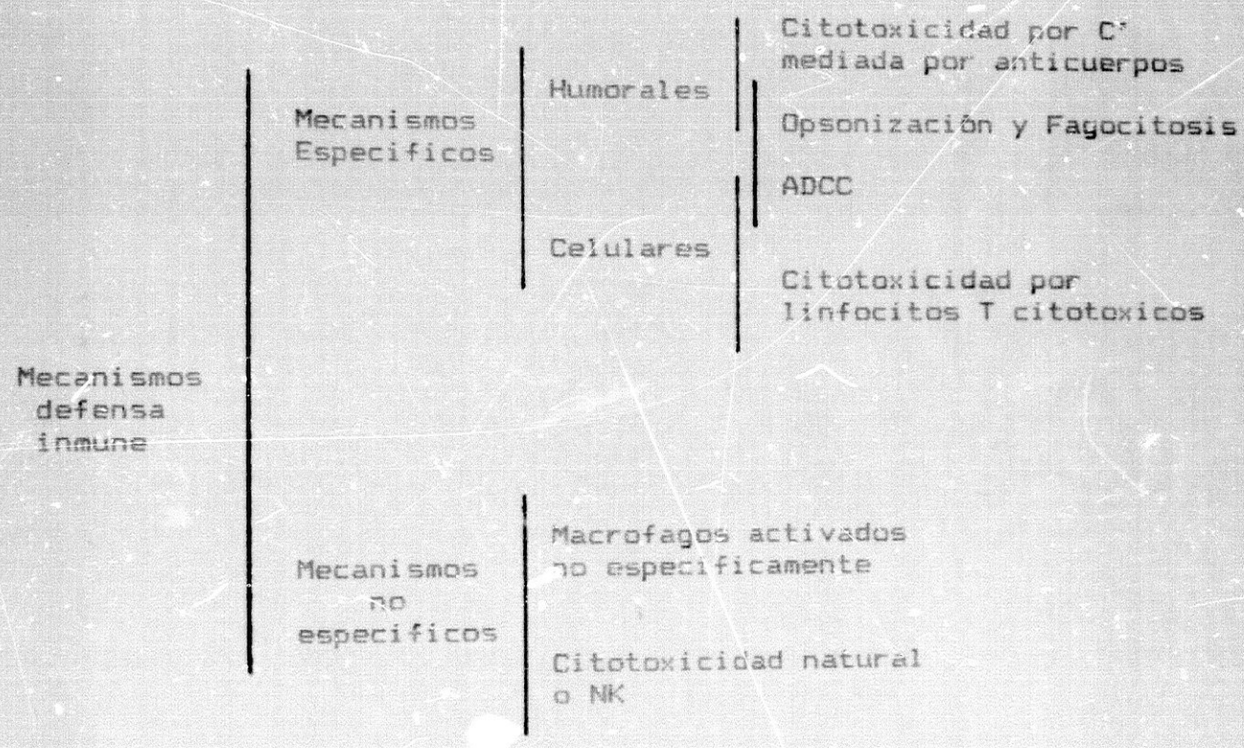
esgado, y depende del tumor concreto de que se trate; lo que sí es muy probable es que sobre un tumor determinado exista un mecanismo de defensa inmune que adquiera un papel predominante.

Los mecanismos inmunes envueltos en la defensa antitumoral los podemos dividir según la tabla 1.

La diferencia existente entre los dos grandes grupos de mecamismos de inmunidad radica en que los específicos necesitan una sensibilización previa para efectuar la lisis y su acción se dirige sobre determinadas estructuras presentes en las células tumorales, mientras que los mecanismos inespecíficos o de inmunidad natural son efectuados por células capaces de lisar tumores espontáneamente, esto es, sin sensibilización previa.

a.- Mecanismos específicos humorales: anticuerpos contra células tumorales han sido detectados en pacientes y animales portadores de cáncer. Estos anticuerpos en presencia de complemento, son capaces de lisar las células tumorales en ensayos "in vitro". En cuanto a su actuación "in vivo" estudios con tumores trasplantables de ratón han demostrado que los anticuerpos citotóxicos son capaces de suprimir el

Tabla 1. Mecanismos de defensa inmune



crecimiento de leucemias y linfomas o el crecimiento de tumores en fluido ascítico, sin embargo parece no afectar al crecimiento de tumores sólidos. También anticuerpos antitumorales pueden preveer el establecimiento de metástasis después de inyectar células de carcinoma mamario intravenosamente en ratones.

b.- Opsonización y fagocitosis: Es una via de actuación especifica mediada por macrófagos y dirigida por anticuerpos y componentes del complemento; su existencia ha sido demostrada "in vitro" aunque su importancia "in vivo" esta aun por probar.

c.- Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC): Este mecanismo efector, al igual que el anterior, está mediado por células, pero la especificidad de la reacción corre a cargo de anticuerpos que se unen a la célula diana (tumor) por medio de su región Fab y a la célula efectora (granulocitos, macrófagos, célula K) por la porción Fc. Al igual que en el caso anterior este mecanismo ha sido demostrado "in vitro" pero "in vivo" queda aún por comprobar.

d.- Mecanismos mediados por macrófagos activados no especificamente: Junto con las células NK los macrófagos

pueden ser considerados como las células efectoras de la inmunidad natural o inespecífica, aunque esto solo represente uno de sus papeles en la inmunidad celular. Como efectores los macrófagos tienen poca actividad citotóxica si no están activados por linfoquinas o por otras sustancias (endotoxinas, RNA de doble hebra, etc...) que actuan sobre ellos directamente. La activación se caracteriza por varios cambios tanto morfológicos como bioquímicos y funcionales. Los macrófagos activados son con frecuencia inespecificos para la lisis de células tumorales, desconociéndose la naturaleza del "receptor" reconocido por el macrófago en células tumorales, discriminándolas de las normales. El proceso citolítico resulta predominantemente de eventos no fagocíticos.

Los macrófagos recuperados de los infiltrados tumorales presentan características de macrófagos activados, lo que parece indicar un papel in vivo, de los macrófagos en la inmunología tumoral.

f.- Citotoxicidad natural o NK: Células esplenicas de roedores no inmunizados asi como linfocitos humanos de sangre periférica pueden lisar una gran variedad de lineas tumorales. Las células protagonistas en mayor medida de esta lisis espontanea son las células llamadas "NK". En humanos la prin-

cipal célula NK, son los linfocitos granulares grandes que comprenden entre el 2 y el 5% de los linfocitos de sangre periférica. Estas células son caracteristicamente distintas a los linfocitos T maduros, linfocitos B, macrófagos y funcionalmente diferentes a los células "K" pues no necesitan la presencia de anticuerpos para su acción y por tanto no son inhibidas por la presencia de complejos antígenos-anticuerpo. Tanto los receptores reconocidos por los células NK como los mecanismos de lisis son desconocidos.

g.- Citotoxicidad mediada por linfocitos T: La existencia de linfocitos T citotóxicos ha sido probada "in vitro" para gran cantidad de tumores, que a diferencia de los anticuerpos son capaces de lisar tanto a células tumorales aisladas como a masas tumorales sólidas. La actividad "in vivo" de este mecanismo efector ha sido probada en experimentos de transfección de inmunidad, donde células esplénicas de ratones inmunizados frente a un tumor, transferían dicha inmunidad al ser inyectadas en ratones no inmunizados previamente. Si estas células esplénicas eran tratadas con antisueros anti linfocitos T, la transfección inmunitaria fracasaba.

Pruebas de existencia de linfocitos T citotóxicos han sido recogidas también en humanos, donde aproximadamente la

tercera parte de todos los pacientes de cáncer sometidos a cirugía, exhiben citotoxicidad mediada por linfocitos en sangre periférica, dirigida contra el tumor autólogo, citotoxicidad que puede ser incrementada por preincubación in vitro con el mismo tumor.

El mecanismo de lisis de estos linfocitos T no es aún totalmente concido; lo que se sabe es que estos linfocitos T citotóxicos presentan restricción para las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad , lo que significa que estos linfocitos ven el antígeno tumoral en conjunto con los antígenos de clase I y que células diana y linfocitos deben poseer los mismos antígenos de histocompatibilidad (Zinkernagel y Doherty, 1974).

2.- MARCADORES FUNCIONALES DE LAS CELULAS T EN RATON

2.1- RECECTOR DE CELULAS T

Tanto las células T como las B reconocen antígenos extraños a través de sus respectivos receptores. Sin embargo existen diferencias entre unas células y otras. Asi las células B pueden reconocer antígenos libres mientras que las células T reconocen el antígeno unicamente cuando este va

asociado a las moléculas del CMH (Zinkernagel y Doherty-1974). Diferentes subpoblaciones de linfocitos T maduros están restringidos con diferentes clases de moléculas del CMH. En general células CD4- CD8+, normalmente células T citotóxicas reconocen antígenos en asociación con los productos del CMH de clase I; mientras que células CD4+ CD8-, normalmente células T Helper reconocen los antígenos en el contexto de los productos del complejo mayor de histocompatibilidad de calse II (Swain 1983). La información para esta restricción asi como la especificidad para el antígeno se encuentra contenida en el RcT (Yague y cols 1985) y se piensa que se adquiere durante el desarrollo intratímico de las células T.(Fink y cols 1978; Palacios y Pelkonen 1988). Sin embargo una clara definición de la estructura y expresión del RcT es importante para comprender su maduración y función.

Clonos o hybridomas de células T distintos en su reconocimiento antigénico o restricción por CMH fueron usados para generar anticuerpos monoclonales específicos para las células inmunizantes. Inmunoprecipitaciones con estos reactivos revelaron la existencia en estas células de una estructura de membrana especifica para los mismos que correspondia a un heterodímero formado por dos cadenas de glicoproteinas de

transmembrana unidas por puentes disulfuro con pesos moleculares que oscilan de 40 a 50 KD, ambas glicoproteinas presentan una regiòn constante (C) y otra variable (V). Hasta ahora se han descrito cuatro cadenas $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ que forman los dos tipos de TcR conocidos; TcR_1 (α/β) y TcR_2 (γ/δ). (Kappler y cols 1983) (Fatdman y cols 1983) (Clever y cols 1988).

Como en las inmunoglobulinas los genes que codifican estas moléculas se componen de dos partes: Una variable y otra constante. El gen variable se compone a su vez de dos (V y J) o tres (V, D y J) segmentos genòmicos (Chien y cols 1984; Siu y cols 1984b; Hayday y cols 1985 ; Hayday y cols 1985b; Winoto y cols 1985; Yoshikai y cols 1985). Cada familia de genes tiene multiples segmentos genicos V y J y uno o tres genes constantes (Gascoigne y col 1984; Malissen y cols 1984; Yanagi y cols 1985). Los segmentos V, D y J estan separados en la linea germinal y son llevados juntos por reordenamiento del ADN durante la diferenciaciòn de los linfocitos T para completar el gen variable (V).

Los genes del receptor de células T fueron identificados por dos grupos independientemente; en hibridomas de células T de ratòn por un lado (Hedrick y cols 1984) y en leucemias T humanas por otro (Yanagi y cols 1984).

a.- CADENA BETA DEL RECEPTOR DE CELULAS T

Los genes para la cadena beta del ratòn està localizado en el cromosoma 6 (Lee y cols 1985) y està constituidos por menos de 30 regiones génicas variables (Vbeta) (Patten y cols 1984) y dos constantes (Cbeta) junto con una D (Dbeta) y seis J (Jbeta) (Gascoigne y cols 1984). Los genes Vbeta, Dbeta, y Jbeta codifican para el segmento proteico variable de la cadena beta, estos segmentos variables se agrupan por ahora en 16 diferentes subfamilias (Patten y cols 1984). Aunque hay pocas regiones génicas Vbeta no se ha podido establecer ninguna correlaciòn entre un particular gen Vbeta y la restricciòn para una clase de CMH (Goverman y cols 1985).

Anàlisis de Northern usando la sonda de la regiòn constante de la cadena beta revela la transcripciòn de un segmento de 1.3-Kb y uno de 1.0-Kb. El segmento de 1.3-Kb deriva del reordenamiento de las regiones VDJbeta del gen de la cadena beta. La transcripciòn 1.0-Kb deriva del reordenamiento del segmento D y un J sin reordenamiento de la regiòn Vbeta(Siu y cols 1984) se desconoce si hay traducciòn del mensaje del segmento de 1.0-kb.

b.- CADENA ALFA DEL RECEPTOR DE CELULAS T

Clonos de cDNA para la cadena alfa del receptor de células T han sido aislados (Chien y cols 1984b). Al igual que la cadena beta el mRNA de la cadena alfa del RcT codifica para una proteina con, L, V, C, transmenbrana y un dominio citoplasmàtico. Los genes que codifican para la cadena alfa mapean en el cromosoma 14 del ratòn (Dembic y cols. 1985). Aunque la organizaciòn esencial de la cadena alfa es similar a la cadena beta existen importantes diferencias. El locus de la cadena alfa tiene solo una regiòn C alfa y hay por lo menos 50 segmentos J alfa que se encuentran 65 Kb por encima en direcciòn 5' del segmento C alfa (Winoto 1985), hay tambièn mas segmentos V alfa que V beta (Chien y cols. 1984). No se conoce la existencia de un segmento D alfa.

En la transcripciòn aparecen dos segmentos uno de 1.7 Kb y otro de 1.4 Kb. Como ocurre en la cadena beta, el segmento de 1.7 Kb transcribe para la proteina funcional de la cadena alfa mientras que no se conoce polipéptido para el segmento de 1.4 Kb.

c.- CADENA GANMA DEL RECEPTOR DE CELULAS T

Durante los esfuerzos para aislar un cDNA de la cadena alfa del RcT, otros clonos de cDNA fueron aislados con parecidas caracteristicas. Estos clonos hibridaban especificamente con mRNA y DNA genômico de células T (Saito y cols 1984). La proteina que se deduce contiene regiones L, V, C, transmembrana y dominio citoplasmatico, similar a las cadenas alfa y beta. EL gen para la cadena ganma ha sido mapeado en el cromosoma 13 del raton (Kranz y cols 1985).

La transcripciôn de la cadena ganma es de 1.3-1.5 Kb y contiene secuencias que codifican para V ganma, D ganma, J ganma y C ganma. El gen de la cadena ganma no esta expresado aparentemente en algunas células T maduras, sin embargo el mRNA de la cadena ganma se ha detectado en muchas células T citotôxicas (Garman y cols) asi como en timocitos fetales (Raullet y cols 1 '85).

Cuando el CD3 es inmunoprecipitado de células T inmaduras o de linfomas T negativos para la cadena alfa y beta del RcT coprecipitan dos polipéptidos (Brenner y cols 1986), uno de estos peptidos de 55 Kd también precipita con antisueros contra C ganma y V ganma.

d.-CADENA DELTA DEL RECEPTOR DE CELULAS T

Los genes C delta, J delta y D delta de la cadena delta murina se encuentran en el cromosoma 14 entre los segmentos génicos V alfa y J alfa. Hasta el presente han sido identificadas 8 subfamilias V delta génicas (Chien 1987).

La localizaciòn de los genes D delta , J delta y C delta entre los segmentos génicos V alfa y J alfa se piensa que da lugar a un conjunto de genes V que son utilizados segun proceda por las cadenas alfa o delta, se ha visto que existe similitud entre algunas subfamilias V delta y V alfa siendo probablemente V delta3 identica a V alfa6 (Elliott y col 1988). Hasta el presente no se conocen los mecanismos ciertos que dan lugar a la producciòn de una cadena en detrimento de la otra.

e.- ONTOGENIA DEL RECEPTOR DE CELULAS T

Se ha visto que en el desarrollo de los timocitos se produce un reordenamiento progresivo de las diferentes cadenas que componen el RcT, siendo la cadena ganma la primera en aparecer reordenada, sobre el dia 14 en los timocitos fetales, seguida del reordenamiento de la cadena beta y finalmen-

te la cadena alfa (Haars y cols 1986). A los 15 dias de gestaciòn hay un dramàtico incremeto en el nùmero de reordenamiento de los genes de la cadena beta(Born y cols 1985). El reordenamiento de D beta y J beta precede en un dia al reordenamiento V beta, D beta y J beta, la mayoria de los alelos de la cadena beta estan reordenados hacia el dia 17 de gestaciòn (Born y cols 1985).

La transcripciòn de la cadena ganma que comienza sobre el dia 14 de gestaciòn declina progresivamente sobre los dias 18-19 de gestaciòn (Raulet y cols 1985). La transcripciòn del segmento de 1.0 Kb de la cadena beta comienza el dia 14 de gestaciòn, sobre el dia 17 de gestaciòn es el segmento de 1.3 Kb el predominante en la transcripciòn (Haars 1986). Sera en el dia 16 de gestaciòn cuando aparece el segmento de 1.4 Kb de la cadena alfa estando presente el segmento funcional de 1.7 Kb en timocitos adultos(Raulet y cols 1985).

Parece ser necesario por lo visto hasta ahora, que la expresiòn en células adultas del receptor alfa/beta va precedido del reordinamiento de los genes de la cadena ganma, sin embargo en los ultimcs años se conoce una pequeña proporciòn de células adultas T que expresan el receptor ganma/delta en su menbrana, Palacios y Pelkonen (1988) proponen una sugeren-

te hipòtesis donde diferencian dos caminos para estos dos tipos de receptores. Sugieren que el reordenamiento de los segmentos V delta y D delta llevaria a la expresiòn del receptor ganma/delta en células adultas, mientras que el reordenamiento de los segmentos D delta y J delta asi como V delta, D delta y J delta llevaria a la expresiòn en células adultas del receptor alfa/beta.

2.2.-COMPLEJO CD3

La aparición en la membrana de los linfocitos T del heterodimero alfa/beta o ganma/delta va unido siempre al complejo CD3. Este complejo esta formado basicamente por tres cadenas, denominadas CD3-ganma de 25 Kd, CD3-delta de 20 Kd y CD3-exilòn de 20 Kd (Oettgen y cols, 1984; Borst y cols, 1984).

Cada uno de los tres componentes posee un dominio N-terminal extracelular, un segmento transmenbrana y un dominio intracitoplasmatico. En el caso del CD3 ganma y CD3 delta el domino N-terminal se encuentra glicosilado. La regiòn de transmenbrana del complejo CD3 posee una carga negativa que puede ser uno de los componentes que estabilice el complejo RcT/CD3. El polipéptido CD3-exilòn, posee un dominio intraci-

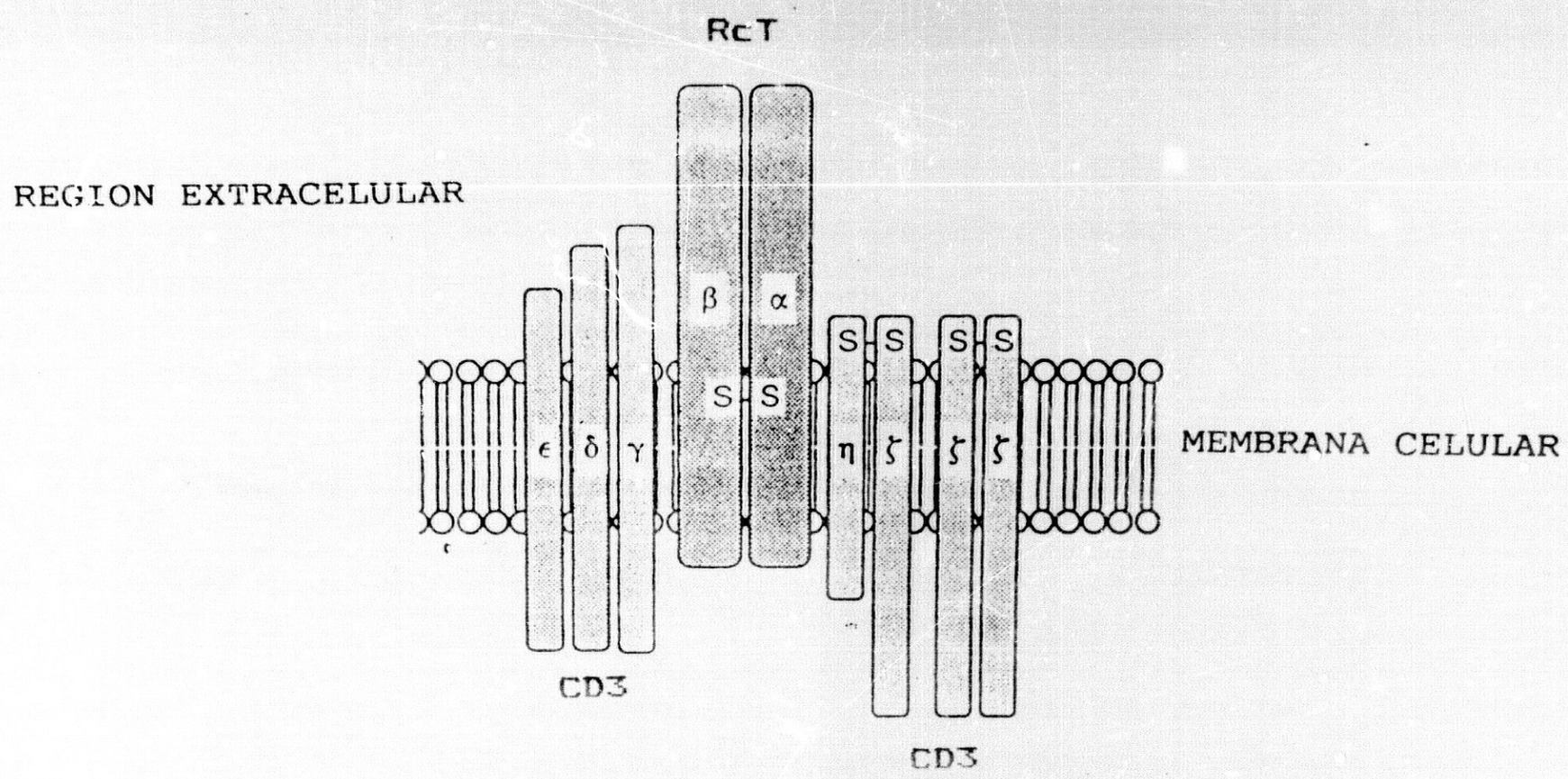
toplasmàtico de gran tamaño cuya area inmediatamente C-terminal contiene un excepcional nûmero de aminoàcidos bàsicos seguidos por un corto segmento de prolina, este orden se ha encontrado también en el polipéptido CD2 sugiriendo que CD2 y CD3-exilòn pudieran interactuar con la misma proteina en el citoplasma.

Mucho menos conocidos son dos nuevos componetes de este complejo denominados CD3-Zeta y proteina p21. El CD3-Zeta es un homodîmero no glicosilado de 17 Kd, a veces se ha encontrado como heterodîmero consistente en un polipéptido de 17 Kd y otro 15 Kd no glicosilado (Oettgen,H.,y cols 1986). Se han detectado puentes disulfuro entre el CD3-Zeta y la proteina p21 sugiriendose la posibilidad de que la formaciòn de estos puentes disulfuro se deba a la activaciòn del complejo RcT/CD3. En la figura 1 aparece esquematizado el complejo RcT/CD3.

2.3.- MOLECULA CD4

El antigeno CD4 està formado por una molécula de 55 Kd obtenida por inmunoprecipitaciòn en SDS-PAGE (Reinherz y cols, 1979). Para determinar su estructura, se ha aislado y secuenciado un cDNA codificante para la molécula CD4 (Maddon

Figura 1.- Representación esquematica del complejo CD3/RcT. Las cadenas Y & del receptor clonotípico de células T, van acompañadas por un conjunto de polipeptidos (CD3), cuya misión parece ser transmitir cambios conformacionales del RcT al interior de la célula.


RcT
REGION EXTRACELULAR
β
α
S
S
S
S
S
S
ϵ
δ
γ
η
ζ
ζ
ζ
MEMBRANA CELULAR
CD3
CD3
REGION INTRACELULAR

y cols, 1985). Anteriormente, también habia sido aislado y secuenciado el cDNA codificante de la molécula CD8 (Littman y cols, 1985); comparando la secuencia de ambas proteinas se ha observado que poseen una significativa homologia secuencial y estructural con los dominios variables (V) de las Ig y que son miembros de la familia de supergenes de las Ig.

Sin embargo, los dominios amino-terminal "V-Like" de CD4 y CD8 son bastante diferentes: muestran una homologia solo del 28% y son menos homòlogos entre si, que cada uno por separado con las cadenas ligeras de las Ig. Ademàs las regiones de màxima conservaciòn entre CD4 y CD8 son las mismas que muestran fuerte homologia con las regiones V de las Ig y del receptor de las células T.

Numerosas diferencias distinguen CD4 de CD8: el dominio "V-like" de CD4 va seguido de un bloque de aminoàcidos con considerable homologia a la regiòn de uniòn (J) de las cadenas ligeras de las Ig y de las cadenas del receptor del antigeno de las células T. Este hecho no se observa para la secuencia de CD8. A continuaaciòn de la regiòn "J-like" de CD4, existe un tramo de 265 aminoàcidos en la superficie extracelular, de baja homologia con los miembros de la familia de supergenes de las Ig. Esta regiòn es significativamente menor

a la de CD8 (58 aminoàcidos) y no muestra homologia con ella. Por tanto, CD4 que contiene 435 aminoàcidos, es aproximadamente dos veces mayor que CD8.

Resumiendo: CD4 y CD8 muestran en conjunto una estructura homòloga: ambas molécvlas son proteinas de membrana con un dominio extracelular homòlogo a la regiòn V de la cadena ligera de las inmunoglobulinas, un tramo de transmembrana y un dominio intracitoplasmàtico altamente cargado. Sin embargo, a nivel de secuencia de aminoàcidos, son muy diferentes: sus dominios "V-like" son altamente divergentes. Las proteinas difieren en gran medida en tamaño y en conjunto muestran baja homologia.

Maddon y cols (1985) sugieren que la homologia estructural de la regiòn "V-like" mostrada por CD4 y CD8 puede ser de particular relevancia en las funciones de estas proteinas. Todos los miembros de la familia de supergenes de las Ig participan en la respuesta inmune (Hood y cols 1985). Ademàs, los miembros individuales de esta familia muestran una fuerte tendencia a asociarse con otros para formar dimeros. Asi, se pueden destacar las interacciones entre las cadenas pesadas y ligeras de las Ig; entre las cadenas alfa y beta del receptor para el antigeno de las células T; entre la beta2 microglobu-

lina y los antígenos CMH de clase I y entre las cadenas alfa y beta de las moléculas de calse II. La glicoproteina CD8 forma puentes disulfuros con T8, molécula "MHC-like", en la superficie de los timocitos (Snow y cols, 1985); y se presenta como multímeros de la subunidad de 32 Kd en los linfocitos T de sangre periférica (Snow y cols, 1983). Estas afinidades específicas de las moléculas "Ig-like" pueden ser esenciales para las funciones de reconocimiento de CD4 y CD8. Hay que destacar que CD4 no parece existir como un dímero unido covalentemente en asociación con el mismo o con otras moléculas "Ig-like" (Terhorst y cols, 1980). Aunque CD4 puede existir como una única cadena Ig-like en la superficie celular, posible que CD4 se asocie con otras proteinas de la célula T en la misma superficie celular a través de débiles interacciones no covalentes. Alternativamente, CD4 puede interactuar para formar asociaciones con CMH u otras moléculas "Ig-like" en las células diana, y estas posibles interacciones pueden ser esenciales para la función de CD4.

Por otra parte, mediante ensayos funcionales, se ha demostrado que estas células T CD4+ poseen numerosas funciones: a) Proliferación: células T CD4+ proliferan en respuesta a antígenos solubles o antígenos asociados a la superficie celular (Reinherz y cols, 1979).

b) Función colaboradora: inducen a las células B para segregar inmunoglobulinas y a las células T precitotóxicas para ejercer sus efectos citotóxicos (Reinherz y Schlossman,-1980b).

c) Liberación de linfoquinas: solo las células T CD4+ producen factor mitogénico de leucocitos que inducen la proliferación de la mayoria de los linfocitos (T, B, células nulas), así como de los macrófagos (Reinherz y cols, 1979).

d) Control de la supresión: interacciones entre células T CD4+ y las CD8+ se requieren para inducir la supresión de la producción de Ig en sistemas estimulados por antigenos, el mitógeno (PWM) y en el cultivo mixto leucocitario autólogo (Morimoto y cols, 1983)

e) El antigeno CD4 está implicado en el reconocimiento de la célula diana por los linfocitos T citotóxicos (CTLs).

La diversidad de función de la células CD4+ y CD8+ junto con el hecho de que las moléculas CD4 y CD8 no muestras un significativo polimorfismo, han conducido a la hipótesis de que CD4 y CD8 reconocen regiones no polimórficas de las moléculas de clase II y clase I respectivamente. Un segundo tipo

de proteina que difiere en las diferentes células efectoras T, es el receptor que reconoce al antigeno en asociación con regiones polimórficas de las moléculas del CMH (Zinkernagel y Doherty, 1979; Kappler y cols, 1983; Acuto y cols, 1983a).

Las interacciones de los linfocitos T CD8+ son restringidas a células dianas que expresan proteinas CMH de clase I; mientras que los T CD4+ están restringidos a las que expresan antigenos de clase II (Krensky y cols, 1982; Swain, 1983). Estas interacciones especificas pueden ser mediadas por el receptor de las células T que reconoce el antigeno en el contexto de los moléculas CMH (Kappler y cols, 1983; Acuto y cols, 1983a).

2.4.- MOLECULA CD8

Este antigeno fué definido inicialmente como un polipéptido multimero con dos componentes de peso molecular de 32 y 45 Kd (Hansesn y cols, 1984).

La molécula CD8 define una clara subpoblación de linfocitos T de sangre periférica con funciones citotóxica / supresora (Thomas y cols, 1981; Meuer y cols, 1982). Las células T CD8+ interaccionan en general con células dianas que expre-

san antígenos de histocompatibilidad de clase I en su membrana (Krensky y cols, 1982; Swain y cols, 1983; Biddison y cols, 1982). AcMo dirigidos contra la molécula CD8 inhiben la activación de la célula T y citotoxicidad mediada por linfocitos T, ensayos in vitro (Engleman y cols, 1981; Marrack y cols, 1983; Rogozinski y cols, 1984). Además, tanto la molécula CD4 como la CD8, parece ser que aumentan la avidez de la interacción de la célula T con su diana (Marrack y cols, 1983; Marrack y Kapler, 1985; Greenstein y cols, 1984).

Como ya se ha mencionado anteriormente en el apartado de CD4, Littman y cols (1985) han aislado y secuenciado un cDNA codificante para la molécula CD8; anteriormente Kavathas y cols (1984), habian aislado el gen de CD8. De estos estudios se ha deducido que esta proteina tiene una estructura típica de numerosas glicoprotinas de membrana: un péptido señal N-terminal precede a un dominio extracelular, seguido de un segmento de transmenbrana y un corto dominio intracitoplasmático altamente cargado. La secuencia N-terminal de la proteina CD8 madura comprede un dominio "inmunoglobulina-like", con homologia para la región variable de las cadenas ligeras.

La estructura "Ig-like" de CD8 puede tener particular importancia para sus funciones durante la diferenciación y en

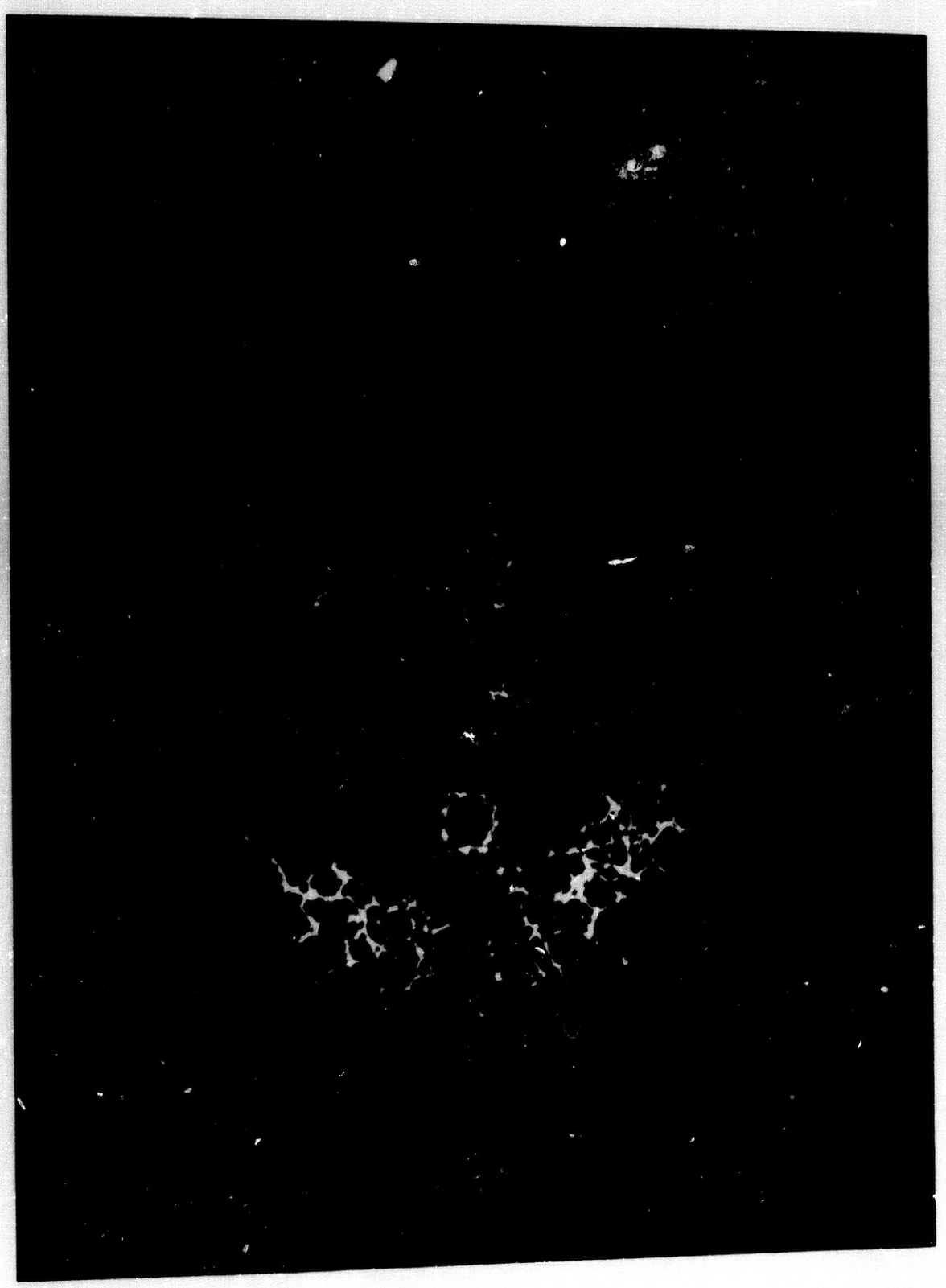
la respuesta inmune. Snow y Terhorst (1983), han demostrado que en células T de sangre periférica, la glicoproteina CD8 se presenta como formas multiméricas de 32 Kd. En timocitos, sin embargo, CD8 se une a través de puentes disulfuros con T6, que se trata de una molécula "CMH clase I like" que está presente solo en timocitos y nunca en células T maduras (Snow y cols, 1985). Este hecho apoya la idea de que las interacciones de los timocitos inmaduros con los productos del CMH presentes en el parénquima timico, son esenciales para la generación de una apropiada restricción del CMH y el establecimiento de clonos de células T con distintas funciones (Bevan, 1977). Es posible que $CD4^{+}$ y CD8, por su capacidad de interactuar con los productos del CMH, desempeñen un papel en estos procesos de diferenciación.

Existen además otros marcadores como CD2, CD25, CD45..., que por la naturaleza del trabajo no vamos a describir aqui

3.- RECONOCIMIENTO ANTIGENICO

Son tres los elementos que participan en el reconocimiento del antigeno, por una parte el receptor de células T y de otra el antigeno y las moléculas del CMH que van intimamente unidos ver figura 2.

Figura 2.- Representación por ordenador de los tres elementos participantes en el reconocimiento antigenico. El dibujo superior, seria el receptor de células T, donde se aprecia regiones en color amarillo que interaccionan con las proteinas del CMH y una porción altamente variable para reconocer el antigeno en rosa. El antigeno está representado por una espiral también en color rosa, encontrandose en la hendidura de la proteina del CMH de color amarillo.



3.1.- MOLECULAS DE CLASE I DEL CMH

Las moléculas de clase I del CMH son glicoproteinas de transmembrana, formadas por la unión mediante enlace no covalente de dos cadenas polipeptídicas; una denomina cadena alfa o pesada de 45 Kd, (Vitteta, 1978) y otra cadena ligera de 12 Kd identificada como beta2-microglobulina (Michaelson, 1977).

Recientemente se ha cristalizado una de estas moléculas de Clase I, la HLA-A2 (Bjorkman, 1987a) resultando clave para el conocimiento de la estructura de sus lugares de unión al antigeno y a linfocitos T.

La cadena pesada de estas moléculas es la sintetizada por el CMH, esta cadena polipeptídica puede ser dividida por su función y por su relación con la membrana en tres partes: intracitoplasmática, transmembrana y extracelular (Colligan, 1981; Strominger,1980). Esta última porción es la responsable de las propiedades antigénicas y serológicas de la molécula (Nathenson, 1974) asi como de sus fuciones que residen básicamente en los dominios alfa 1 y alfa 2, siendo el dominio alfa 3 el más próximo a la membrana y el alfa 1 el que porta el residuo N-terminal.

La cadena pesada es la responsable del polimorfismo genético a través de variaciones en los dominios alfa 1 y alfa 2, los cuales no están distribudos al azar, sino agrupados en cuatro regiones diferentes (Colligan, 1981; Lopez de Castro, 1982).

Estudios realizados con genes hibridos han demostrado que la mayoria de los determinantes alogénicos y lugares de reconocimiento para CTL se encuentran localizados en los dominios alfa 1 y alfa 2, siendo el dominio alfa 3 practicamente irrelevante para estas funciones (Allen,1984; Rusch,1983; Ozato, 1985).

La cadena ligera o beta 2 microglobulina es un polipéptido con un peso molecular de unos 12 Kd formado por 99 residuos de aminoàcidos sin ningùn grupo carbohidrato y con un puente disulfuro intracatenario. Este polipéptido oligomorfico està codificado por un locus que mapea en el cromosoma 2 (Michaelson, 1981; Goding, 1981; Robinson,1981). Es sumamente constante (Benacerraf y Unanue,1986) y su funciòn parece estar relacionada con la estabilizaciòn de la estructura terciaria de los antígenos de Clase I.

3.2.- MOLECULAS DE CLASE II DEL CMH

Las moléculas del CMH de clase II se componen de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente llamadas respectivamente alfa o cadena pesada con un peso molecular de 30 a 33 Kd y ligera o beta con un peso molecular de 27 a 28 Kd (Strominger, 1975; Cullen, 1976). La cadena alfa tiene dos carbohidratos, mientras que la beta tiene solamente uno (Shacckeford, 1982; Kauffman y Strominger,1983). Al igual que las moléculas de clase I, estas de clase II presentan una estructuración en tres regiones: citoplasmática, transmenbrana y extracelular, siendo esta última región la que soporta el polimorfismo y la funcionalidad de la molécula, estando formada a su vez por dos dominios estructurales, alfa 1 y alfa 2 para la cadena alfa y beta 1 , beta 2 para la cadena beta de aproximadamente noventa aminoácidos. El segundo dominio de la cadena alfa y los dos dominios de la cadena beta contienen puentes disulfuro .

Esta región es la responsable del polimorfismo de las moléculas de clase II . Las moléculas DR expresan poco o ningun polimorfismo estructural en la cadena pesada mientras que la beta presenta gran variabilidad (Silver y Ferrone, 1979; Charron y Mc Devitt, 1980), siendo el dominio beta 1 (N

terminal) màs polimòrfico que el dominio beta 2 (C terminal).

A diferencia de las moléculas DR, las cadenas alfa y beta de los antigenos DQ son polimòrficas (Goyert, 1982), correspondiendo la variabilidad de las cadenas alfa a la porciòn N terminal del dominio alfa 1 (Giles y Capra, 1985).

Los genes DP alfa y DP beta que codifican las cadenas alfa y beta de las moléculas DP son ambos polimòrficos (Hurley, 1982) siendo DP beta 1 màs polimòrfico que DP alfa 1 (Kappes, 1984). Dicho polimorfismo se ubica predominantemente en el primer dominio (Okada, 1985).

3.3.- PAPEL DEL CMH EN EL RECONOCIMIENTO ANTIGENICO

Se sabe desde hace tiempo que los genes que controlan la reactividad inmune estàn ligados a los que codifican los productos del CMH (Mc Devitt y Tyan, 1968). Benacerraf y Mc Devitt vieron que el elevado polimorfismo de las moléculas del CMH determina, que los individuos difieran en su capacidad de responder especificamente contra determinados antigenos. Shevach y Rosintha (1973) y Katz (1973) demostraron que las moléculas del CMH controlan las interacciones celulares entre diversas células del sistema inmune: células T y B. Màs

tarde Zinkernagel y Doherty, (1974) demostraron que los linfocitos T reconocen antigenos extraños cuando estos se presentaban en la superficie celular en conjunciòn con moléculas del CMH autòlogo. Por otra parte, Bevan en 1977 comprobò que los linfocitos T desarrollan receptores para el propio CMH durante la diferenciaciòn, encontrándose dichos receptores solo en los linfocitos maduros de sangre periférica.

Estas investigaciones dieron lugar a la definiciòn de los dos procesos màs importantes en los que estàn implicados los antigenos de histocompatibilidad: restricciòn de clase I y restricciòn de clse II.

3.3.1.- RESTRICCION DE CLASE I

Para que una célula T citotòxica pueda lisar a una posible célula diana que exhibe un antigeno reconocido por esta célua T citòtoxica, debe compartir con ella los antigenos de clase I, si no ocurre esto, la célula Tc, aunque sea especifica para el antigeno, no lisarà a la célula diana (Zinkernagel y Doherty, 1974).

3.3.2.- RESTRICCION DE CLASE II

La restricción de clase II en la respuesta inmune implica al linfocito T cooperador (CD4+). Este linfocito para reconocer el antígeno que muestran las células presentadoras de antígeno (CPA) debe compartir con ellas las moléculas de clase II (Rosenthal y Sevach, 1973; Katz, 1973).

Cuando el linfocito T colaborador ha sido activado puede a su vez activar al linfocito B, que reconocerá en la superficie de este, tanto la molécula de clase II como el antígeno. Este linfocito B activado producirá anticuerpos contra el antígeno extraño.

3.3.3.- ALOREACTIVIDAD

No representa una función biologica del CMH, puesto que su aparición requiere la presencia de células alogénicas. Tiene una importante implicación en los transplantes de órgan (Klein, 1982).

Consiste en la aparición de una intensa respuesta inmune, tanto humoral como celular, producida al introducir células de un individuo en otro de la mismo especie, con el que

no comparte alguno de los antígenos del CMH. Esta reacción es de gran magnitud sin que existan inmunizaciones previas y se dirige contra los antígenos de clase I y II no compartidos por ambos individuos.

Es esta la única situación en que los linfocitos T reconocen moléculas extrañas sin necesidad del CMH autólogo, es decir, no aparece el fenomeno de retricción para linfocitos T citotóxicos. Un linfocito Tc lisa por tanto directamente cualquier célula con diferencias en sus antígenos de histocompatibilidad. Concretamente, los antígenos de clase I tienen gran importancia en el rechazo de alotrasplantes y en la lisis mediada por los linfocitos T de células infectadas por virus (Zinkernagel y Doherty 1974). Intervienen también en la lisis de células transformadas químicamente (Shearer, 1974) o con degeneración neoplásica (Schmidt, 1981) mediada por linfocitos T.

Intervienen también estos antígeno de calse I en la inducción de los linfocitos T supresores TS1 y TS3, así como en interacciones entre el factor de los TS2 y los linfocitos TS3 (Benacerraf y Unanue, 1986).

Por otra parte está demostrada su participación en el fenómeno de hipersensibilidad retardada (Smith, 1979) y en la reacción mixta de linfocitos T (Duran, 1986).

Zaleski y Klein, en 1977, haciendo estudios sobre reacciones a antígenos en cepas mutantes que diferían en el locus H-2K [illegible] demostrado, que los antígenos de clase I son también productos de genes de respuesta inmune, al igual que se demostró con los genes de clase II (Mc Devitt y Chinitz, 1969).

Actualmente se piensa que los antígenos de superficie de la membrana celular están bajo el control de los genes Ir de clase I, mientras que los antígenos solubles o procesados, (incluyendo los antígenos de superficie procesados) tienden a estar bajo el control de los genes Ir de clase II (Paul, 1984).

Se ha demostrado también la participación de los antígenos de clase I en la regulación de la actividad NK (Kornbluth, 1985).

Bases experimentales demuestran en los últimos años, que alteraciones en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I, desempeñan un importante papel en el

grado de malignidad y en la capacidad metastàsica de un tumor, siendo la idea màs aceptada actualmente que la pérdida o disminuciòn en la expresiòn de estos antigenos es un mecanismo que permite a las células tumorales escapar a la acciòn del sistema inmune (Festenstein y Garrido, 1986; Harris y Hill, 1986).

3.4.- PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DEL ANTIGENO

En contraste con las inmunoglobulinas, el antigeno reconocido por el RcT no es un molécula intacta sino que es un pequeño peptido fragmentado de esta molécula (Ziegler y cols, 1987). Este péptido sera presentado tanto por las moléculas del CMH de clase I como de clase II dependiendo de la célula que elabore el antigeno.

3.4.1.-PRESENTACION POR MOLECULAS DE CLASE I

Desde los clàsicos trabajos de Zinkernagel y Doherty, donde se demuestra la necesidad de asociaciòn antigènica con las moléculas del CMH propio, se ha venido especulando sobre la naturaleza de esta asociaciòn, solo en los últimos años se ha podido dilucidar la intimidad de esta uniòn. Asi cuando las dianas son expuestas a los antigenos sin degradar (Bastin

y cols, 1987; Moore y cols 1988) no sufren la lisis por CTL específicos, sin embargo cuando estas mismas dianas son expuestas a péptidos de esto mismos antigenos la lisis es màxima.

Por otra parte cuando el antigeno no degradado es incubado con las dianas hubo presentaciòn por parte de las moléculas de clase II mientras que no lo hacian las moléculas de clase I, sin embargo la infeciòn con una vacuna recombinante del patògeno, permitia la presentaciòn por parte de las moléculas de clase I (Morrison y cols, 1986). Una interpretaciòn de estos hechos fue que los antigenos presentados por las moléculas de clase I estarian insertadas en la membrana mientras que los antigenos presentados por la clase II necesitarian ser degradados en un compartimento prelisomal (Unanue y cols, 1984). Sin embargo mutantes del antigeno eran reconocidos por CTLs restringidos para clase I del antigeno original no siendo expresados estos mutantes en la menbrana de las dianas (Townsen y col 1986), estos hechos se interpretan en el contexto de que también los CTL CMH clase I restringidos reconocen un producto degradado de la molécula (Wabuke-Bunoti y cols 1984 (Fig. 3b).

Se sabe que los CTLs restringidos para clase I no reconocen al antigeno si la fase postranscripcional, de las dia

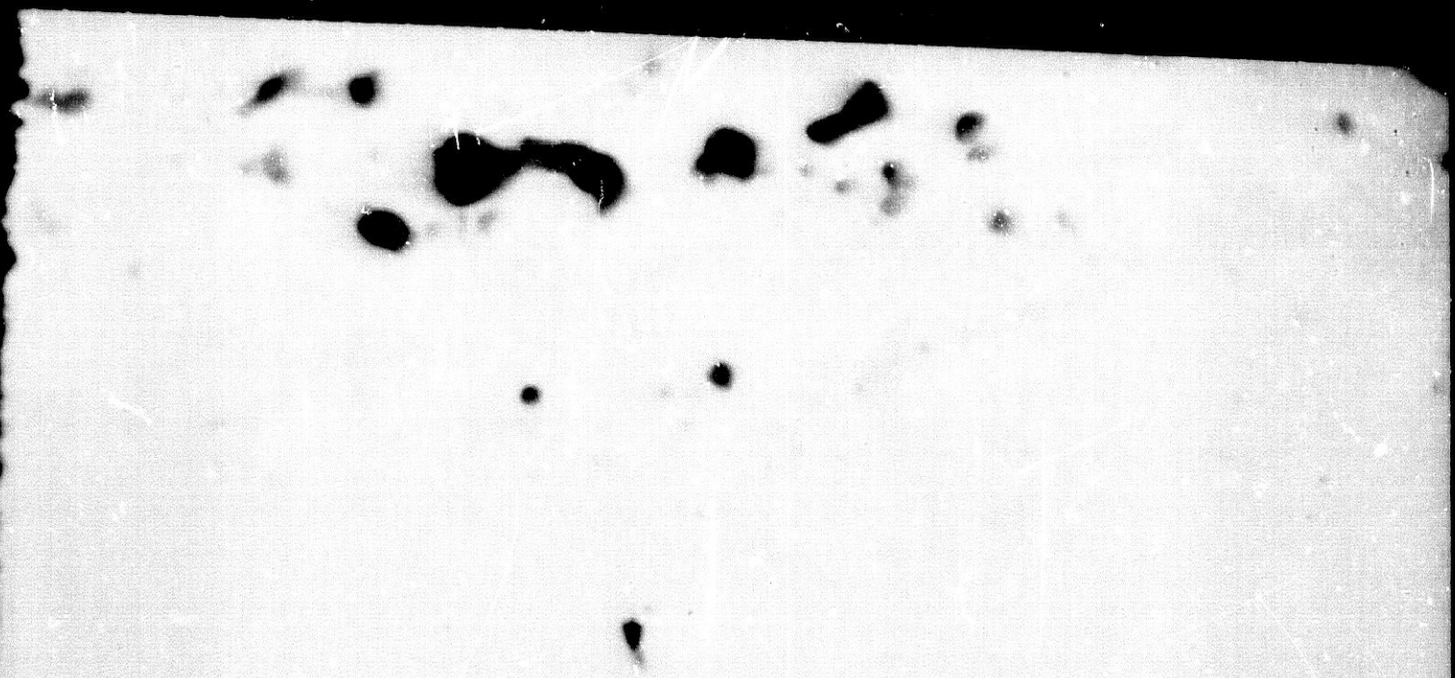
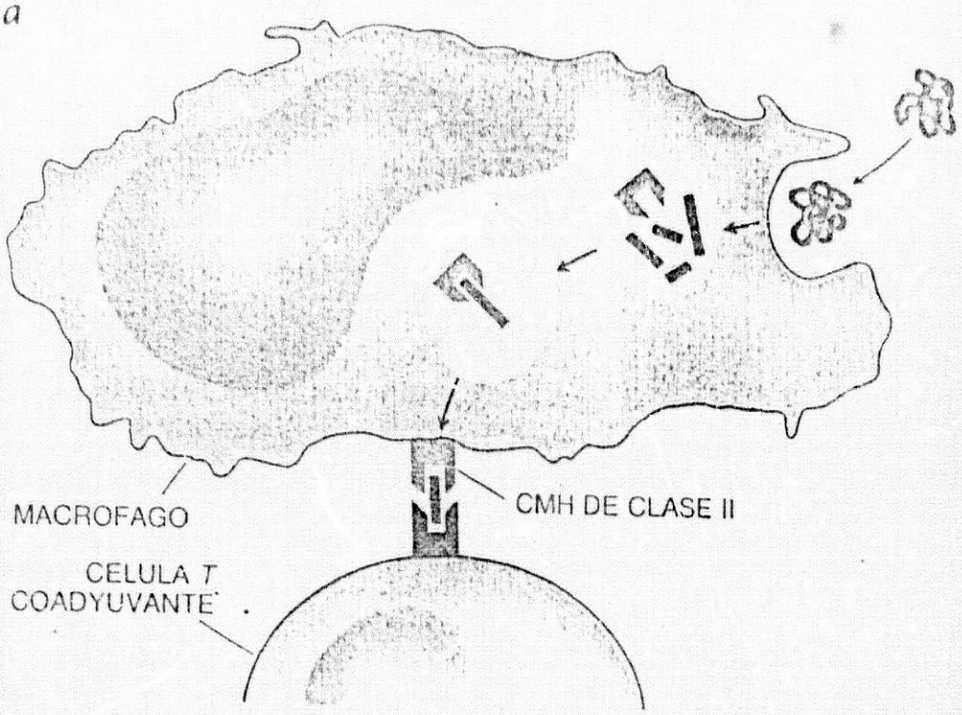
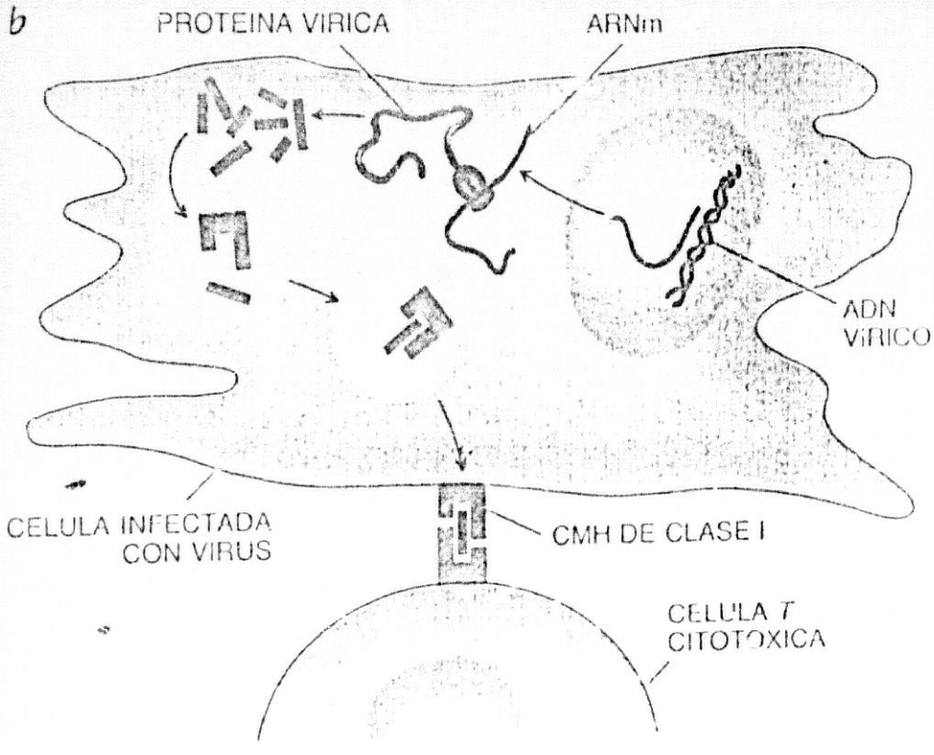


Figura 3.- Procesamiento del antigeno por dos vias distintas. En (a) el material extraño es procesado por la llamada via exogena donde participan células presentadoras de antigenos (macrofagos, células B etc.). Los productos de degradación de esta via se unen a moléculas del CMH de clase II y son presentados a linfocitos T CD4+. En (b) el material extraño es degradado por la via endogena, son células infectadas por virus o malignas, los productos de degradación se unen a las moleculas del CMH de clase I y son presentados a linfocitos T CD8+.

a


MACROFAGO
CMH DE CLASE II
CELULA T
COADYUVANTE

b


PROTEINA VIRICA
ARNm
ADN
VIRICO
CELULA INFECTADA
CON VIRUS
CMH DE CLASE I
CELULA T
CITOTOXICA

nas infectadas con una vacuna recombinante, es inhibida (Coupar y cols 1986). Similares pero selectivas inhibiciones fueron realizadas cuando se infectò con el epitopo C-terminal de la vacuna, se pudo restaurar el reconocimiento cuando el resto de la vacuna fue incorporada (Townsend y cols, 1988).

Indicando que no todos los péptidos son inmunogénicos y el caracter competitivo que presentan los diferentes péptidos formados en el citoplasma cuando estos se unen a la molécula de clase I.

Se piensa, aunque no existen evidencias experimentales, que la unión del péptido a la molécula de clase I se realiza en el reticuloendoplasmàtico y de alli es transportado a la membrana celular. La unión del péptido a la molécula de clase I se realiza entre los dominios alfa1 y alfa2 de esta molécula, como quedò demostrado recientemente en la cristalización de la molecula de clase HLA.A2 I por Bjorkman y cols,-(1987).

Varios trabajos sugieren que el péptido adopta una conformación en alfa elice en la unión con las moléculas del CMH presentando una conservación en los residuos que tienen con-

tacto con las moleculas del CMH en los diferentes péptidos (Rothbard y cols, 1987; Guilled y cols,1986).

3.4.2.-PRESENTACION POR MOLECULAS DE CLASE II

Un sitio critico en la regulaciòn de la respuesta inmune es la formaciòn del complejo trimolecular entre el RcT de las células T, las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y el antigeno.

Los productos de los genes de la regiòn del CMH de clase II estan expresados en las células presentadoras de antigenos (CPA), y su funciòn es unirse a fragmentos de proteinas (péptidos) y presentarlos al RcT de las células T CD4+ (Unanue y cols 1987). (Fig. 3a)

Que la molécula de clase II se une a un péptido concreto , se demostrò de una manera directa utilizando la técnica de diàlisis de equilibrio. Consiste en separar una càmara con una membrana semipermeable que deja pasar el péptido y no la molécula del CMH, al final se comprueba que el péptido se encuentra en mayor concentraciòn en el compartimento que contiene la molécula del CMH, esto demuestra que las dos moléculas terminan uniendose.

Los mecanismos mediante los cuales las moléculas de clase II eligen un péptido concreto en el seno de las CPA, dando lugar a la posterior activación de una subclase de célula CD4+ concreta y si todos estos complejos mecanimos esta regulados por los llamados genes de inmunorespuesta (Ir) es objeto de controversia. Una versión para explicar estos acontecimientos propone que las moléculas de clase II tienen especificidad para unirse a algunos péptidos pero no a todos los creados en la elaboración del antigeno (A.Rosenthal, 1978).

Recientemente Soren Buus y cols (1987) estudiando la capacidad de unión que tienen la moléculas de clase II del ratón (I-A) con los pétidos y la activación de la respuesta inmune a través de células T correspondientes, observan que no todos los péptidos unidos a la molécula del CMH provocan respuesta inmunitaria, probablemente debido a la ausencia de células T que reconozcan el complejo antigeno-CMH. Por otra parte demuestran también diferencias de afinidad de los distintos péptidos, que relacionan directamente con la capacidad de inhibición sobre otros pétidos, argumentan por último que solo hay un sitio de unión para el antigeno por parte de

la molécula del CMH de clase II y que se encuentra distribuido entre las cadenas beta y alfa de esta molécula. (Fig. 4)

4.- DESARROLLO TIMICO DE LAS CELULAS T

La maduración de las células T en el timo consiste en la incorporación sucesiva y ordenada de los marcadores que encontramos en las células T adultas, a su vez la presentación antigénica propia al RcT en el micromedioambiente timico, decide los elementos celulares T que saldrán a la periferia y montarán la respuesta inmune frente a un elemento extraño.

4.1- TIMOCITOS INMADUROS DOBLES NEGATIVOS (CD4- CD8-)

Se ha identificado la existencia en timocitos de una población capaz de reconstituir tanto la población de timocitos como de las células linfoides periféricas (Kadisk y Basch 1977). Estos timocitos fueron en su mayoria CD4-, CD8- (Fowlkes y cols 1985).

Aunque representan un pequeño número dentro de los timocitos adultos, sin embargo en estos CD4-, CD8- precursores se han identificado hasta 11 marcadores superficiales diferentes (Wilson y cols 1988). Dentro de los más estudiados se encuen-

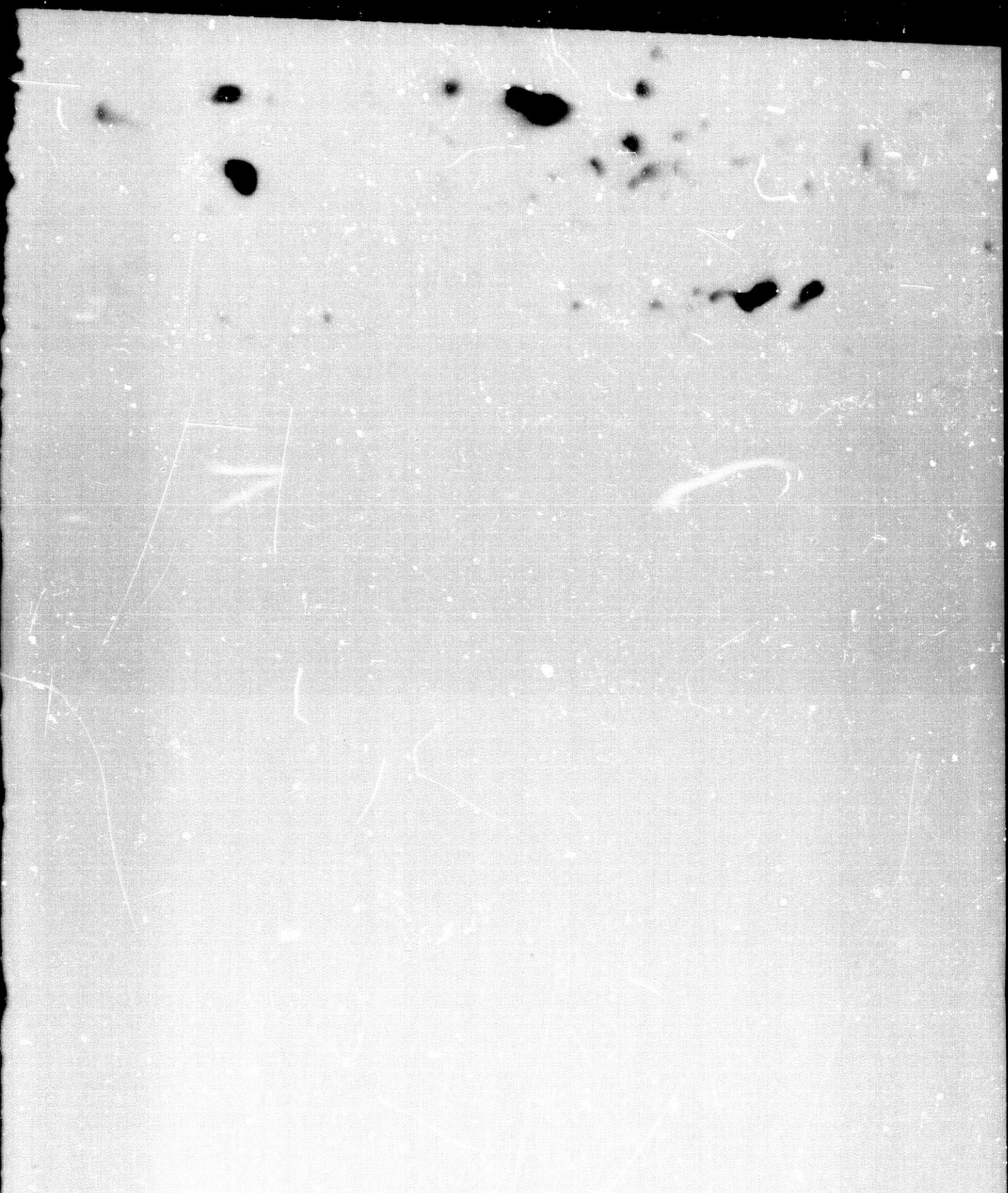


Figura 4.- La unión a una proteina del CMH parece condición necesaria, aunque no suficiente, para que un péptido desencadene una respuesta inmunitaria. En el esquema se ve que solo cinco péptidos se unen a las moléculas del CMH de los catorce posibles, siendo tan solo tres capaces de activar a la célula T.

UNION AL CMH
CELULA PRESENTADORA
DE ANTIGENO
CELULA T
ESTIMULACION
DE CELULAS T

tran el "heast-stable" (HSA) reconocido con el anticuerpo monoclonal BCA2 (Scollay y cols 1984) y J11d (Bruce y cols 1981). Thy1; Ly1; Pgp-1; receptor de PNA receptor de IL2 y MEL14 (Gallatin y cols 1983). En muchos casos la función de estos marcadores no es conocida.

Un tema muy discutido es si hay un grupo particular de marcadores que acompañe el desarrollo de los timocitos o los diferentes marcadores que se adquieren en la activación. Asi se ha relacionado la unión a altos niveles de PNA con células T inmaduras y con células T maduras activadas (Chervenak y cols 1982), otros marcadores que sufren variación son el receptor de IL2 (RIL2) que se incrementa asi como el marcador Pgp-1, descendiendo el MEL14 en células activadas. Scollay et al (1988) sugieren que los marcadores de las células inmaduras dobles negativas presentan el siguiente desarrollo:

1. Thy1- HSA- Pgp-1+ RIL2- TcR-
2. Thy1+ HSA- Pgp-1+ RIL2- TcR-
3. Thy1+ HSA+ Pgp-1- RIL2- TcR-
4. Thy1+ HSA+ Pgn-1- RIL2+ TcR-
5. Thy1+ HSA+ Pgp-1- RIL2- TcR-

Este desarrollo seguiria con la adquicisiòn de los marcadores CD4, CD8 y el receptor de células T.

4.2.- TIMOCITOS INMADUROS SIMPLES POSITIVOS (CD4+ CD8- CD4- CD8+)

La mayoria de esta poblaciòn son CD4-, CD8+ no expresando receptor para el antigeno, teniendo altos niveles de HSA y mayores aùn de Thy1 siendo MEL14- (Wilson y cols 1987).

Cuando son puestas en cultivo rapidamente se convierten en células CD4+, CD8+, sugiriendo ser células intermediarias entre CD4-, CD8 y CD4+, CD8+. En este complejo desarrollo, aparentemente es el antigeno CD8 el primero en aparecer.

4.3.- TIMOCITOS INMADUROS DOBLES POSITIVOS CD4+, CD8+)

A principios de los años 80 se dijo que los timocitos dobles positivos no presentaban expresiòn del antigeno CD3 en su superficie (Reinherz y cols 1980). Sin embargo en recientes investigaciones se ha comprobado que de todos los dobles positivos el 50% expresan bajos niveles de TCR-CD3 (Havran y cols 1987).

Por otra parte se sabe que el 4-9% de estas células tienen alta expresión de TCR-CD3, sugiriendo que sean intermediarias de las células maduras simples positivas (Blue y cols 1987). La mayor evidencia de que las células dobles positivas sean intermediarias en el desarrollo de las células maduras simples positivas es el trabajo de Smith (1987), donde demuestra que " in vivo " el anticuerpo monoclonal anti-CD8 bloquea el desarrollo de las células CD4+ periféricas. Sin embargo en ausencia de experimentos reciprocos y detallados analisis de los timocitos en cada tratamiento no se puede dar como definitivo.

4.4.- ADQUISICION DE TIMOCITOS MADUROS SIMPLES POSITIVOS

El desarrollo timico lleva consigo una serie de acontecimientos progresivos mediante los cuales la célula madre procedente de la médula osea, recibe su aprendizage, una revisión del tema se encuentra en Adkins y cols. (1987), aqui haremos un resumen de los eventos mas importantes que ocurren a lo largo de este desarrollo.

Precursores de los timocitos salen de la medula osea y del higado fetal y emigran al timo. En el timo estas células sufren el reordenamiento del RcT. Como se sabe son cuatro

grupos de genes los que codifican para los dos tipos de receptores alfa-beta y ganma-delta expresados en diferentes subpoblaciones de células T. Cada gen esta compuesto de multiples elementos génicos, V, D, J y C, cuyos reordenamientos y ensamblajes dan lugar a la traducción de una proteina funcional como vimos en un apartado anterior.

El linaje del receptor ganma-delta ha sido recientemente descrito, y no se conoce demasiado sobre su especificidad y función. Siendo el linaje alfa-beta el que tiene la mayor representación en el desarrollo de los linfocitos T. Dos moléculas denominadas CD4 y CD8, anteriormente descritas, aparecen en la superficie del timocito inmaduro con anterioridad a la expresión del RcT. Apareciendo en primer lugar la molecula CD8 seguida de la molécula CD4, estos timocitos CD4+ CD8+ (dobles positivos) sufre un proceso de selección del que emergerá el timocito adulto.

4.4.1- SELECCION POSITIVA

Durante la ontogenia de los linfocitos T en el timo, las células T presentan reordenamiento y expresión del receptor alfa beta sobre el dia 17 de gestación (Raulet y cols, 1985; Born y cols 1985). Sin embargo el repertorio de células T

adultas no es la consecuencia de estos aconteciminetos solamente sino que sufren una selecciòn despues de la expresiòn del receptor. Esta selecciòn esta mediada por la uniòn del receptor a las moléculas del CMH propias, cuando esto ocurre habra una selecciòn positiva mientras que seran eliminadas las que no lo hagan, asi resultara un repertorio de células periféricas que seran restringedas para su propio CMH y tolerantes para lo propio (Fink y Bevan 1978; Zinkernagel y cols 1978).

Por otra parte Marrack y cols 1988 tratan a ratones (A X B)F1 durante el desarrollo con altas dosis de un monoclonal contra la molécula del CMH del tipo A, este tratamiento reduce la aparición de células T periféricas capaces de reconocer antigenos en asociaciòn con el CMH de tipo A. Asi, el reconocimiento de un particular alelo del CMH parece ser requerido para el desarrollo de células T especificas para el péptido estraño y la molécula del CMH.

Una sorpresa de estos experimentos fue que los animales eran completamente tolerantes a la molecula A del CMH aunque la selecciòn positiva fue inhibida. Sin embargo un cuidadoso examen funcional del estroma timico revela la presencia de moléculas libres (Mizuochi y cols 1988). Se ha visto por otra

parte que se puede inducir tolerancia con baja concentración de antígenos (Pullen y cols 1988).

4.4.2.- DELECCION CLONAL

Experimentos utilizando dilución limite (Good y cols, 1983) demostraron que la frecuencia de células T reactivas contra un antigeno en particular, estan muy reducidas en animales tolerantes. Sin embargo son los experimentos de Kappler y cols. (1987) los que demuenestran con mas fiabilidad que la disminución de ciertas subpoblacione de de linfocitos T, está en relación con la tolerancia al antigeno correspondiente.

Ellos demuestran que células T que expresan un particular segmento variable de la cadena beta del receptor (V beta 17a), reconocido con el anticuerpo monoclonal llamado KJ23a, se encuentra entre el 9% y el 14% en ratones que no expresan una particular molécula del CMH de clase II (I-E), y que esta subpoblación estaba muy reducida en ratones que expresaban la molecula I-E.

Cuando ellos examinan células del timo, observan que las células que expresan V beta 17a estan representas en un núme-

ro normal en los timocitos inmaduros CD4+ CD8+ o dobles positivos, pero que estan drasticamente disminuidas en timocitos maduros simples positivos CD4+ CD8- y CD4- CD8+ en las cepas de ratòn que tienen la molecula de clase II, I-E.

Este hallazgo ha sido confirmado en otros cuatro sistemas (Marrack y Kappler,1988). En todos los casos la naturaleza exacta del antigeno propio es desconocida.

Es sorpredente encontrar que el proceso de delecciòn afecta tanto a las células T CD4+ CD8- como a las CD4- CD8+, ya que la molécula de clase II del CMH I-E reacciona solo con la molécula CD4 y no con la molécula CD8. Este resultado sugiere que el proceso de delecciòn ocurriò en el estadio de timocitos dobles positivos, antes de que la diferenciaciòn, hacia CD4+ CD8- y CD4- CD8+, ocurra.

Por otra parte en ratones transgénicos que llevan genes que codifican para un clon de células T, que reacciona contra la molécula de clase I Ld, se encuentran estas células, muy disminuidas en ratones que expresan la molécula Ld (Sha y cols. 1988).

4.4.3.- COEXISTENCIA DE LA DOBLE SELECCION

La cuestiòn que se plantea inmediatamente es: ¿ cual es la diferencia molecular entre la selecciòn positiva y negativa?. La primera explicaciòn para esta paradoja se basò en la afinidad del receptor de las células T (Sprent y cols, 1988). Precursores con alta y mediana afinidad por el propio CMH, con o sin péptido propio, serian seleccionados positivamente. Células que llevarán un receptor que tuviera baja afinidad serian seleccionadas negativamente.

Otro modelo propuesto por Marrack y cols,(1988); Marrack y Kappler, (1988), sugiere que las células epiteliales del timo presentan un péptido propio diferente del que presentan las células dendríticas de este organo. En este caso la selecciòn positiva se llevaria a cavo a través del reconocimiento del péptido presentado por las células epiteliales, mientras que la selecciòn negativa vendria a través del péptido presentado por las células dendriticas. Sin embargo hasta el presente ninguno de los dos modelos parece ser satisfactorio.

5. POBLACIONES PERIFERICAS DE CELULAS T

Como veiamos en el apartado anterior cuando la célula T a sufrido el llamado aprendizaje timico, se encuentra en condiciones de desarrollar sus funciones. Clasicamente en los organos secundarios del sistema inmune y en la sangre, es decir fuera de la médula osea y el timo, podiamos encontrar basicamente dos pablaciones de linfocitos T, los llamados citotóxicos/supresores (CD8+) y los cooperadores (CD4+). Hoy dia a esta familia se le ha incorporado recientemente dos nuevos elementos: CD4- CD8- y CD4+ CD8+ cuyas funciones son objeto de estudio todavia.

5.1.- LINFOCITO T MADURO COOPERADOR O CD4+

Es precisamente la molécula CD4 de este linfocito la que condiciona sus funciones, al unirse a las células que expresan moléculas del CMH de clase II (Greenstain y cols 1984), por lo tanto estos linfocitos T se activaràn a través del reconocimiento de péptidos presentados por las moléculas de clase II. Como veiamos en el apartado (3.4.2) el procesamiento del antigeno a través de la ruta de la molécula de clase II, corresponde a los antigenos exogenos, es decir aquellos antigenos capturados por las células presentadoras del anti-

geno como pueden ser el linfocito B, las células macrofágicas y dendríticas ver figura 5a.El sentido biológico de la activación de los linfociotos T a través de esta ruta es como se sabe; modular la respuesta inmune con secreción, por parte del linfocito T CD4+, de las linfoquinas corespondientes, asi una proteina bacteriana capturada por una célula B y procesada por la ruta exogena pone en marcha la ayuda de células T, tanto en el sentido de potenciar como de favorecer o de inhibir la producción de un isotipo de inmunoglobulina determinado, Mosmann y cols (1989).

Aunque se suponia la posibilidad de varias subpoblaciones de células T CD4+, no ha sido hasta fechas recientes ratificada su existencia, asi en humanos (Stuar y cols 1990) se ha podido diferenciar estas subpoblaciones por expresar marcadores diferentes relacionados con funcionalidades, también diferentes. En ratón Mosmann y cols (1989) han encontrado asi mismo subpoblaciones de células T cooperadoras que han denominado TH1 y TH2 estas subclases de células T cooperadoras se diferencian en la secreción también diferente de linfoquinas tabla 2. La respuesta inmune tendrá caracteristicas diferentes según se haya estimulado un tipo de célula u otro.

Figura 5.- Efecto de la activación de los linfocitos T según sea procesado el antigeno. La via exogena (a) lleva a los linfocitos a secretar sustancias que ayudan en este caso a la producción de anticuerpos. La via endogena (b) lleva a los linfocitos T a matar a una célula portadora de un virus o malig-na.

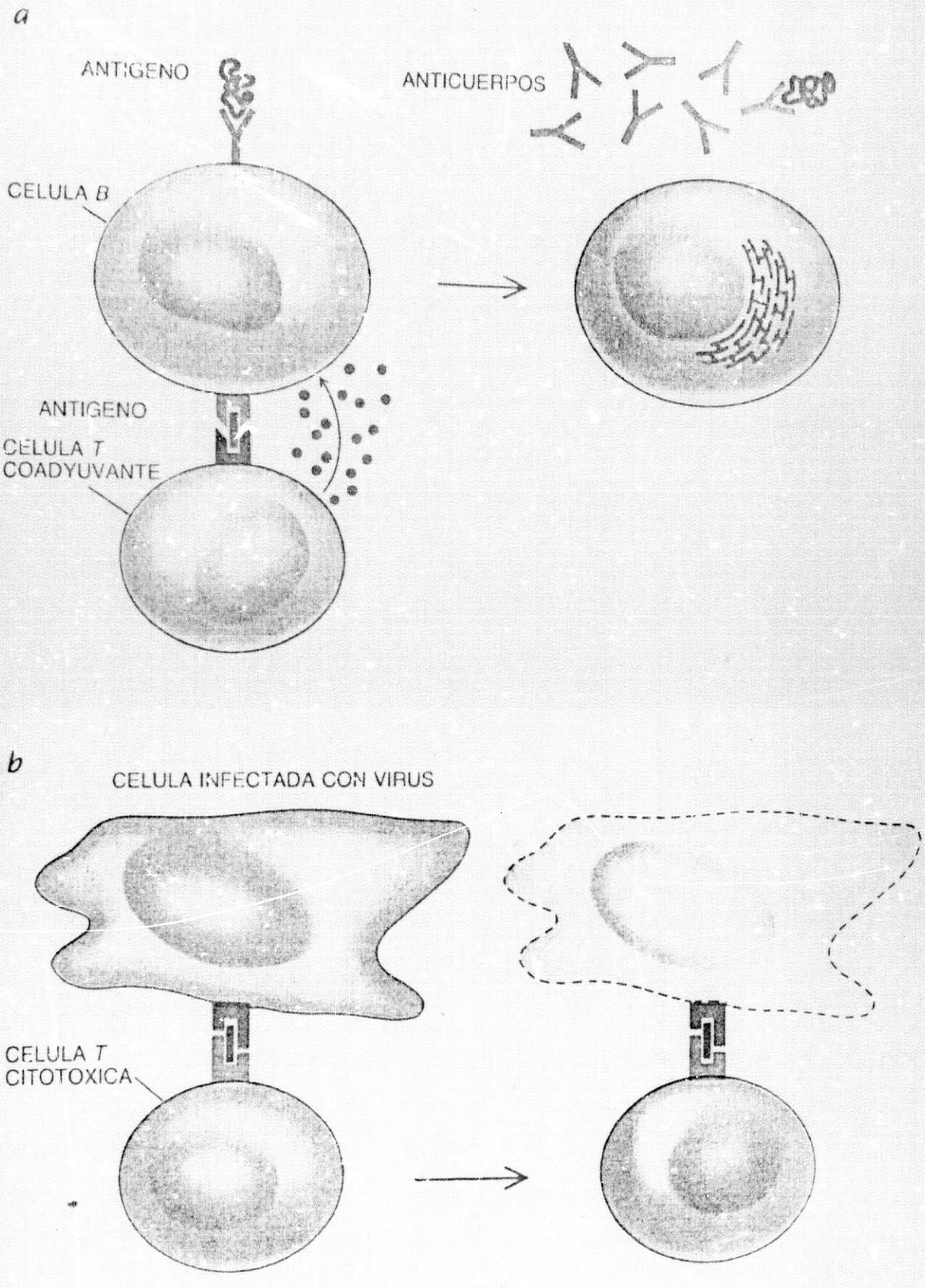

a
ANTIGENO
ANTICUERPOS
CELULA B
ANTIGENO
CELULA T
COADYUVANTE
b
CELULA INFECTADA CON VIRUS
CELULA T
CITOTOXICA

Tabla 2. Propiedades de los clonos de células T de ratòn

	TH1	CTL	TH2
Marcadores de Superficie			
LY1	+	–	+
L3T4	+	–	+
LYT2	–	+	–
Linfoquinas			
interferòn	+ +	+ +	–
IL-2	+ +	+/–[a]	–
Linfotoxina	+ +	+	–
GM-CFS	+ +	+ +	+
TNF	+ +	+	+
TY5	+ +	+ +	+
P500	+ +		+
H400	+ +		+
IL-3	+ +	+	+ +
IL-4	–	–	+ +
IL-5	–	–	+ +
IL-6	–	–	+ +
P600	–		+ +
Cooperaciòn con Células B			
IgM, IgG1, IgA	+		+ +
IgG2a	+ +		+
IgE	–		+ +
Hipersensibilidad retardada	+	+	–
Activaciòn de macrofagos	+	+	+

a- Algunos, no todos los clonos de CTL producen IL-2

La falta de estos linfocitos T CD4+ como se demuestra a nivel experimental (Martin y cols 1987) y en el S.I.D.A. provoca curiosamente la invasión del huesped por parasitos y patogenos llamados "oportunistas" y trastornos autoinmunes quizas relacionados con la falta de control en la respuesta inmune. Paradojicamente la abolición de esta población de linfocitos T CD4+, es un método terapéutico en algunos procesos autoinmunes como la artritis reumatoidea (Herzo y cols 1987) asi como en la encefalitis autoinmune de ratón (Urban y cols 1988). En cualquier caso todas estas experiencias demuestran el papel pibotante entre tolerancia y rechazo que juega el linfocito T CD4+.

5.2.- LINFOCITO T MADURO CITOTOXICO O CD8+

La ruta endogena de elaboración del antigeno fig 5b permite al sistema inmune presentar los antigenos extraños a través de las moléculas del CMH de clase I (Thomsen y cols 1988), es decir aquellos patógenos que quieran eludir el sistema inmune introduciendose en las células del organismo, como son los virus o bien las células transformadas, se encontraran con este segundo sistema de presentación antigénica, en el que estan involucrados el RcT de las células T CD8+ y las moléculas de clase I.

Si la molécula CD4 le servia a los linfocitos T para anclarse a las moléculas de clase II, la molécula CD8 le sirve a estos linfocitos para anclarse a las moléculas del CMH de clase I.

Mientras que la función de los linfocitos CD4+ era modular la respuesta inmune, la estimulación de linfocitos CD8+ a través del reconocimiento de antigenos extraños, presentados por las moléculas de clase I, provoca la muerte de la célula presentadora por mecanismos aun no bien conocidos.

5.3.- LINFOCITO T MADURO DOBLE NEGATIVO (CD4- CD8-)

Este linfocito T no ha sido descubierto hasta hace poco tiempo, quizás por carecer de marcadores propios y quizás también por estar en muy baja proporción en sangre periférica y organos secundarios (1-5%).

Aunque se sabe de su existencia en ratón (Haars y cols 1986) donde mejor han sido estudiadas es en humanos. Asi se ha encontrado que la característica descriptiva mas importante de estos linfocitos es que son portadores del receptor ganma/delta de células T (Lainer y cols 1986; Brenner y cols 1986).

Funcionalmente se sabe que presentan una citotoxicidad CMH no restringida (Janeway y cols 1988), encontrandose en algunas ocasiones que esta citotoxicidad estaba en funciòn del reconocimiento de un determinado CMH (Matis y cols 1987).

Hasta el momento su funciòn especifica dentro del sistema inmune no esta clara sin embargo el estudio comparativo con clonos simples positivos hace suponer que participen en funciones de inmunoregulaciòn e inmunovigilancia (Sunil y cols 1989).

6.- EL SISTEMA TUMORAL GR9

El GR9, es un fibrosarcoma murino inducido en ratones de la cepa BALB/c por inyecciònn subcutanea de un carcinògeno quìmico, el metilcolantreno (Pérez y cols 1985). Se adaptò a cultivo sin ningùn pase in vivo para evitar mecanismos de inmunoselecciòn.

Posteriormente, fué clonado bajo microscopio de contraste de fases para trabajar con células individuales (Garrido y cols 1986).

Los clonos de este tumor crecen en monocapa y se cultivan con RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal, glutamina y antibiòticos.

Estos clonos (G2, A7, B8, B7, B3, B10, B9...) presentan variaciones cuantitativas en los niveles de expresiòn de los antigenos de histocompatibilidad de clase I (Delgado cols 1986). Fueron tipados utilizando los anticuerpos monoclonales: 34-1-2 (anti H-2^d), K9-18 (anti H-2^d), 34-4-20 (anti H-2^d) y 34-5-8 (anti H-2^d) (Garrido y col 1986). Utilizando la técnica de radioinmunoensayo, podemos dividirlos, atendiendo a su fenotipo en tres grupos (Pérez y cols 1985): clonos H-2D, K y L positivos (G2, A7 y D8). Clonos con expresiòn intermedia (D6 y C5) y clonos con baja expresiòn H-2 (B10 y B9). Estos niveles de expresiòn fueron también confirmados por FACS (Algarra y col 1989).

La capacidad de desarrollar localmente en animales singénicos e inmunocompetes, està claramente relacionada con fenotipos negativos o con baja expresiòn H-2 (Garrido y col 1986).

En contraste, al inyectar clonos H-2 positivos, no desarrollaban tumores o, si lo hacian, crecian muy lentamente

aún inyectando dosis elevadas de células. Esto sugiere, que la inyección local de los clonos clase I positivos genera una repuesta de los linfocitos T que impide el que desarrollo local del tumor (Caballero y cols 1989).

Recientemente, se ha demostrado que los clonos con expresión baja o negativa de antígenos de clase I, son sensibles a la lisis por células NK, mientras que los clonos con expresión elevada de estos antígenos no lo son (Algarra y cols 1989).

Se ha estudiado también la influencia del nivel de expresión de los genes de clase I con la capacidad metastásica de los diferentes clonos de este tumor. Los clonos con niveles de expresión de antígenos de clase I elevados, producen gran número de metástasis espontaneas a diferencia de los negativos que son muy poco metastásicos.

Como vemos, la capacidad de generar metástasis espontaneas, presenta una correlación inversa con el grado de crecimiento local y con la capacidad de generar metástasis experimentales tras la inoculación intravenosa. Es posible, que los clono capaces de producir metástasis espontaneas, representen variantes de los clonos con alta expresión de clase I, resul-

tantes de una inmunoselecciòn inicial ocurrida durante el primer periodo de crecimiento local (Pérez y cols 1989).

El fenotipo de los clonos inyectados se comparò con el de células procedentes de distintas colonias metastàsicas de diferentes òrganos. Se observa una disminuciòn de H-2K en estas colonias independientemente del origen de esta, y a veces, la expresiòn de H-2D se encuentra elevada.

El cociente K/D es menor en células procedentes de colonias metàstasicas que en las céluas del tumor GR9 de donde derivaron estas colonias.

El clon B9, con baja expresiòn de clase I se tratò con interferòn recombinante (50 U/ml) y a las 24 horas el nivel de expresiòn de los antígenos de clase I in vitro se encontraba muy elevado, pero no se detectan diferencias con el clon B9 sin tratar en su capacidad de crecimiento local ni metastàsico.

OBJETO

Los clonos del sistema tumoral GR9, se caracterizan por su heterogeneidad, tanto en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I, como en su comportamiento "in vivo" (crecimiento local y capacidad metastasica).

Esta tesis intenta dar una respuesta a estas diferencias en el comportamiento "in vivo"; mediante el estudio de la respuesta celular de origen T.

En principio esta respuesta parece estar implicada en el rechazo tumoral, puesto que los clonos con mayor expresión para antígenos del CMH de clase I, parecen menos agresivos en su crecimiento local "in vivo".

Asi hemos escogido el clon tumoral GR9.A7, con expresión alta para los antígenos del CMH de clase I y un bajo crecimiento local "in vivo"; produciendo con gran facilidad ratones regresores.

El trabajo que aquí se presenta, responde inicialmente a esta idea, siendo su desarrollo posterior, fruto de los resultados y conclusiones que se iban alcanzando.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1.- RATONES

En nuestro trabajo hemos empleado principalmente ratones de la cepa BALB/c ($H\text{-}2^d$), además en menor número se han empleando animales de las siguientes cepas: DBA ($H\text{-}2^d$), B10D2 ($H\text{-}2^d$), B10 ($H\text{-}2^b$), B10BR ($H\text{-}2^k$), CBA/H ($H\text{-}2^k$), B10A ($H\text{-}2^a$), B10A2R ($H\text{-}2^{h2}$), B10A4R ($H\text{-}2^{h4}$) y B6CH2 ($H\text{-}2^b$). Los ratones fueron mantenidos en nuestro laboratorio, procedentes de parejas cedidas por el Profesor H. Festenstein (Departamento de Inmunologia del London Hospital Medical College) y por el Dr. C.S. David (Departamento de Inmunologia de la Clinica Mayo, Rochester USA).

2- LINEAS TUMORALES

Una serie de lineas tumorales originadas en diversas cepas de ratòn por varios carcinògenos, han sido usadas para la realizaciòn de este estudio. Seguidamente detallamos estas lineas indicando la cepa de origen, agente carcinògeno empleado en su induccièn y forma actual de propagaciòn en nuestro laboratorio.

GR9: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa BALB/c ($H\text{-}2^d$), se mantiene en cultivo in vitro creciendo en monocapa. una serie de clonos tumorales procedentes de este tumor han sido empleados en este estudio; GR9.A7, empleado como célula inmunizante, GR9.B3, GR9.B7, GR9.B9, GR9.B10, GR9.B11, GR9.C11, GR9.D6, GR9.D8, GR9.D11 y GR9.G2 todos ellos mantenidos en cultivo in vitro y con crecimiento en monocapa.

GRA5.1: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa BALB/c ($H\text{-}2^d$), se mantiene en cultivo in vitro, crece en monocapa.

GRB7.1: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa BALB/c ($H\text{-}2^d$), se mantiene en cultivo in vitro, crece en monocapa.

GRB7.2: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa BALB/c ($H\text{-}2^d$), se mantiene en cultivo in vitro, crece en monocapa.

GRIR.5: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa BALB/c ($H\text{-}2^d$), en un animal sometido a radiaciones, se mantiene en cultivo, crece en monocapa.

MCB6: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa B6CH2 (H-2^b), se mantiene en cultivo in vitro, crece en monocapa.

P815X2: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa DBA/2 (H-2^d), se mantiene en cultivo, crece en suspensión.

SL2: Leucemia espontanea originada en la cepa DBA/2 (H2d', se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

MBL2: Leucemia inducida por el virus Moloney en la cepa C57BL/6 (H-2^b), se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

L5178YE: Tumor espontaneo originado en la cepa DBA/2', (H-2d) se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

L1210: Tumor inducido por carcinógenos químicos en la cepa DBA/2 (H-2^d), se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

LSTRA: Leucemia inducida por el virus Moloney en la cepa BALB/C ($H-2^d$), se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

YCB: Leucemia inducida por el virus Moloney en un ratón neonato de la cepa BALB/c ($H-2^d$), se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

EL4: Leucemia inducida por dimetilbezantreno en la cepa C57BL/6, se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

TLX/9: Linfoma inducido por rayos X en la cepa C57BL/6 ($H-2^b$), se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

MC6A: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa B10 ($H-2^b$), se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

MethA: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa BALB/c ($H-2^d$), se mantiene en cultivo in vitro, crece en suspensión.

Gadner: Tumor inducido por metilcolantreno en la cepa CBA/H ($H-2^k$), se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

YAC-1: Leucemia inducida por el virus Moloney en la cepa A/jax ($H-2^a$), se mantiene en cultivo in vitro, crece en suspensión.

RBL/5: Leucemia inducida por el virus de Rauscher en la cepa C57BL/6 ($H-2^b$), se mantiene por pases intraperitoneales, crece en ascitis.

3- ANTISUEROS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES

Tres antisueros han sido usados en este estudio; dos de ellos son aloantisueros murinos procedentes del Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH); estos reconocen las moléculas de clase I para el haplotipo $H-2^d$, son los denominados anti D^d suero control (codigo Y1-8-03-29-04) positivo frente a las moléculas $H-2D^d$ y $H-2L^d$ y el suero D.31 (codigo Z1-7-11-01-01) que reconoce la molécula $H-2K^d$. El tercero es un heteroantisuero (conejo anti ratón) denominado anti axialo GM1 que reconoce estructuras presentes en las células NK (M. Kasay 1980).

Los anticuerpos monoclonales los podemos dividir en dos grupos. El primero formado por anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos usados en citometria de flujo, la mayoria de ellos obtenidos comercialmente: 1) Anticuerpo monoclonal anti Thy1.2 marcado con "avidina" suministrado por Becton-Dickinson codigo 22-1127-02, complementado con "estreptoavidina" marcada con ficoeritrina suministrado también por Becton-Dickinson con codigo 23-1270-00. 2) Anti L3T4 marcado con fluresceina suministrado por Sera-Lab codigo FMAS 110_c. 3) Anti Lyt2 marcado con fluoresceina, suministrado por Sera-Lab codigo FMAS 111_c. 4) Anti T3 marcado con fluoresceina sumunistrado amablemente por el Dr. Martinez Alonso (Centro de Biologia Molecular, Madrid).

El segundo grupo de anticuerpos monoclonales es el procedente de sobrenadantes de cultivo, de todos ellos se dispone de los hibridomas que fueron cultivados en nuestro laboratorio. Los anticuerpos monoclonales reconocen o bien moléculas H-2 de clase I o antigenos que definen subpoblaciones linfocitarias. En la tabla 3, aparecen relacionados todos estos hibridomas. Además usamos también el monoclonal anti Lyt 1.2, adquirido a la casa NEN (New England Nuclear ref. NEI-017.

Tabla 3. Relaciòn de los Hibridomas

Nombre Hibridoma	Antigeno reconocido	Tipo de Ig.	Procedente
30-H12[1]	THy1.2	Ig G2b (rata)	ATCC*
GK1.5[2]	L3T4	Ig G2b (rata)	ATCC
41-3-48[3]	Lyt2.2	Ig M (ratòn)	ATCC
34-1-2[4]	H-2K^d y D^d	Ig G2ak (ratòn)	ATCC
34-5-8[4]	H-2D^d	Ig G2ak (ratòn)	ATCC
34-4-20[4]	H-2D^d	Ig G2ak (ratòn)	ATCC
K9-18[5]	H-2K^k	Ig G2ak (ratòn)	ATCC

*- American Type Culture Collection

1- Ledbetter y cols (1979)

2- D.B.Wilde y cols.(1983), D.P.Dialinas y cols.(1983)

3- Shen y cols (1981)

4- K. Ozato (1982)

5- Cedido por el Dr. G. Hammerling

4- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

Solución Salina Tamponada con Fosfatos (PBS): Se disuelven diez tabletas de PBS (Flow ref.28-103-05) hasta un litro.

Solución PBS/Albumina: Se disuelven 100 mg de albumina (Sigma ref A-4503) en un litro de PBS.

Solución de Mitomicina C: Disolver un vial de mitomicina C (laboratorios Kyowa) en 5ml. de PBS o medio de cultivo. Guardar a 4°C, resguardado de la luz.

Medio de Cultivo: Disolver hasta un litro con agua bidestilada esteril:

10,41 g de RPMI 1640 Flow ref 10-601-26

27 ml de CO_3HNa al 7'5% Flow ref 16-883-49

10 ml de Hepes 1 M. Flow ref 16-884-49

0'6 g. de L-glutamina Flow ref 15-801-15

500 mg de ampicilina Labort. Llorente

40 mg. de gentamicina Andalucia Farmaceutica

Una vez preparado este medio es suplementado con un 10% de suero fetal de ternera (Flow ref 29-101-49). El medio es entonces dispensado en 100 ml. y congelado hasta su uso.

Medio de Cultivo para el "Cultivo Secundario": La base de este es semejante a la usada para los cultivos rutinarios con la salvedad de que el suero fetal empleado ha sido testado para evitar posibles efectos supresores, además al medio de cultivo se le añaden:

10 ml. de aminoacidos no esenciales, Gibco ref 043-01140.

10 ml de solución de piruvato sodico 100 mM (Flow, ref 16-820-49).

1ml de solución de 2-mercaptoetanol*

* Una dilución 1:500 de 2-mercaptoetanol (Bio-Rad ref 161-0710) en agua.

El medio es entonces dispensado en alicuiotas de 100ml. y almacenado a -40°C hasta su uso.

METODOS

5- GENERACION DE CELULAS CITOTOXICAS ANTITUMORALES.

Para la inducción de células citotoxicas antitumorales elegimos el clon GR9.A7, perteneciente al sistema tumoral GR9, este clon presenta un crecimiento local poco agresivo cuando se inocula subcutaneamente que parece estar controlado por mecamismos radiosensibles (A. Garrido 1986). Lo que en

principio le hacia ser un candidato ideal para tratar de generar una respuesta celular de tipo "T".

Estas células citotóxicas se obtubieron tras cultivo secundario de esplenocitos de ratones BALB/c previamente inmunizados.

Inmunización: Ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad fueron inyectados subcutaneamente en el pabellón auricular con 5 10^5 células del clon inmunizante, estas células proceden de cultivo in vitro y son recolectadas, lavadas con PBS y contadas momentos antes de su inoculación. Una nueva inoculación de células del clon GR9.A7 se repite en las mismas condiciones siete días más tarde. Trascurrida una semana los animales son sacrificados y sus células esplenicas usadas para cultivo secundario.

Cultivo secundario: En el cultivo secundario células esplénicas procedentes de animales inmunizados son incubadas con las células inmunizantes, tratadas con mitomicina-C, a una razón de 50:1 (efectora:inmunizante) y a una concentración de 2 10^6 por ml. El cultivo se incuba en frascos de 400 ml. de capacidad mantenidos en posición vertical durante cuatro dias, a 37 °C en una atmosfera con un 5% de CO_2. Cada

frasco de cultivo contiene hasta un maximo de 50 ml de medio de cultivo.

Tratamiento con mitomicina C: 2'5 10^6 células del clon inmunizante GR9.A7, provinientes de cultivo in vitro se incuban en un ml. de medio de cultivo con 2 μg de mitomicina C (Lab. Kyowa), durante 45 minutos a 37 °C. Una vez terminada la incubación las células son lavadas con PBS al menos por tres veces quedando listas para su uso en el cultivo secundario.

De otra parte CTLs frente al tumor YC8 se obtuvieron también, tras cultivo secundario de esplenocitos de ratones BALB/c previamente inmunizados.

Inmunización: Ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad fueron inyectados subcutaneamente en el lomo, con dosis crecientes del tumor YC8. Siendo la primera dosis de 2'5 10^6 células tumorales tratadas con mitomicina, seguida una semana después, de la inoculación de 5 10^6 células tumorales tratadas con mitomicina y una ultima dosis de 10^6 células viables del tumor YC8.

Las células tumorales proceden de cultivo in vitro y son recolectadas, lavadas con PBS, contadas momentos antes de la inoculación y tratadas con mitomicina o no, según la dosis. Una semana después de la última inoculación y tras comprobar la ausencia de crecimiento tumoral los animales son sacrificados y sus células esplenicas se recojen para cultivo secundario. El cutivo secundario y el tratamiento con mitomicina C se realizó como se ha descrito para el clon tumoral GR9.A7.

6- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

Como prueba para determinar la actividad lítica de las células provinientes del cultivo secundario, hemos efectuado ensayos de liberación de ^{51}Cr.

Se incubaron, en placas de 96 pocillos de fondo en "U" por 16 horas en el caso de las efectoras anti-A7 y por 4 horas con las efectoras anti-YC8, a 37 °C, con diferentes células diana marcadas con ^{51}Cr. en relaciones 50:1, 25:1, 12:1, 6:1 y 3:1 (efectora:diana). Terminado el tiempo de incubación las placas son centrifugadas y los sobrenadantes testados para la presencia de radioactividad. Como control negativo (liberación espontanea) usamos pocillos donde se han

introducido solo las células diana y como control de maxima liberación usamos pocillos donde a las células diana le agregamos 100 µl de SDS.

Preparación de células diana: Como células diana hemos empleado tanto, lineas tumorales mantenidas en cultivo o por pases intraperitoneales, como blastos de Con-A procedentes de linfocitos normales de diferentes cepas de ratón: a) Cuando se trata de lineas tumorales, estan son incubadas en un ml. de medio de cultivo por una hora con 50 Ci de ^{51}Cr (Cis-Bioindustries ref. CR-51-S1) a 37 °C, despues de este tiempo, son lavadas por tres veces con 25 ml de PBS y resuspendidas en medio de cultivo hasta una concentración de 10^{6} células/ml, en el ensayo de citotoxicidad 100 µl de esta suspensión son empleados por pocillo. b) Los blastos de Con-A son generados incubando 10^{7} de linfocitos normales, en 10 ml de medio, con 50 1 de Con-A (2 g/ml), durante 48 horas en estufa de cultivo a 37 °C y 5% de CO_2. Una vez obtenidos son lavados (tres veces con 25ml. de PBS), e incubados durante tres horas con la misma cantidad de ^{51}Cr que las lineas tumorales. Una vez marcadas son tratadas de igual manera que las lineas tumorales.

El porcenmtaje de liberaciòn de ^{51}Cr, se calcula segùn la formula:

$$\% \text{ liber.} = \frac{\text{cpm probl.} - \text{cpm liber. espont.}}{\text{cpm liber. total} - \text{cpm liber. espont.}}$$

Este porcentaje de liberaciòn estarà en relaciòn con la mayor o menor citotoxicidad existente.

7- DEPLECIONES DE LAS CELULAS CITOTOXICAS ANTITUMORALES.

Para investigar la aportaciòn a la citotoxicidad total de las distintas subpoblaciones celulares hemos usado anticuerpos monoclonales (anti Thy1.2, anti lyt2.2 y anti L3T4) y un heteroantisuero convencional (anti asialo GM1) que definen una o varias de estas subpoblaciones. La idea es eliminar una subpoblaciòn mediante la acciòn citolitica del complemento, activado por la uniòn antigeno-anticuerpo y comprobar como se afecta la citotoxicidad total en nuestras células efectoras. A mayor aportaciòn litica màs disminuira la citotoxicidad total.

Asi, las células citotóxicas procedentes del cultivo secundario (10^7) son incubadas por 45 minutos a 4 °C con los anticuerpos monoclonales o el heteroantisuero, en cantidad necesaria (1ml. de sobrenadante de cultivo neto para los anticuerpos monoclonales y 20 µl diluido a 1/20 para el anti asialo), tras esta incubación se le agrega complemento de conejo (100 µl) y se incuba durante otra hora a 37 °C. Las células son entonces lavadas (dos veces con PBS), repitiendo-se la depleción con igual protocolo para reducir en lo posible las células portadoras del antigeno reconocido por nuestro anticuerpo monoclonal o heteroantisuero.

Las células supervivientes son entonces ensayadas para su capacidad citotóxica, frente a la diana adecuada según el ensayo de citotoxicidad descrito anteriormente.

8- ENSAYO DE INHIBICION DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A ANTIGENOS DE CLASE I.

Los antigenos de histocompatibilidad de clase I son las estructuras de membrana que restringen la actuación de los clásicos linfocitos T citotóxicos (CTL). Este ensayo se realiza para dilucidar la aportación de estos CTL a la citotoxidad total generada tras el cultivo secundario.

Bloqueando los àntigenos de clase I de las células diana con anticuerpos los CTLs no podran actuar y su efecto citotoxico desaparecerà, por lo tanto si su aportaciòn fuese importante, la citotoxicidad total deberia disminuir considerablemente.

Para este estudio se han usado anticuerpos monoclonales y aloantisueros que definen las moleculas de clase I del haplotipo H-2^d (ver materiales 3). Asi en un volumen total de 100 l las células diana (10^4) fueron tratadas con varias cantidades de anticerpos monoclonales y aloantisueros (10, 25, 50 y 100 l para los anticuerpos monoclonales y 5, 10, 25 y 50 l para los aloantisueros) por una hora a 4 °C, en las placas de 96 pocillos usadas para los ensayos de citotoxicidad. Una vez finalizada esta incubaciòn las células efectoras son añadidas; en una proporciòn de 25:1 frente a las dianas y su actividad lìtica medida como se describiò anteriormente.

La inhibiciòn de la citotoxicidad es medida, comparando la alcanzada al usar los distintos anticuerpos monoclonales y aloantisueros, con aquella lograda cuando enfrentamos nuestras células diana y efectoras, en la misma proporciòn, sin añadir reactivo alguno.

9- ESTUDIO FENOTIPICO POR CITOMETRIA DE FLUJO.

La citometria de flujo es una técnica que permite cuantificar objetivamente la fluorescencia emitida por una población celular acotada por tamaño y complejidad celular; esta cuantificación se referirá tanto a intensidad de fluorescencia como a tanto por ciento de células positivas. Así dentro de una población celular compleja podemos elegir una porción de esta y cuantificar con exactitud el porcentaje de células positivas para un determinado antígeno; para ello solo necesitamos un anticuerpo específico para dicho antígeno, conjugado con un fluorocromo (sustancia que en contacto con determinadas radiaciones U.V., laser... , emite luz), o bien el uso de este mismo anticuerpo y de un segundo anticuerpo específico (anti-inmunoglobulina) marcado con un fluorocromo.

Cuatro anticuerpos monoclonales han sido empleados en nuestro estudio de citometria de flujo, tres de ellos marcados directamente con fluoresceina (Lyt2.2, L3T4, T3) y el cuarto marcado con avidina (Thy1.2) que requiere el complejo estreptoavidina/ficoeritrina para desarrollar color; la fluoresceina desarrolla color verde y la ficoeritrina rojo.

Estos anticuerpos monoclonales nos han permitido la realización de dos tipos de estudios: a) Marcaje simple: Enfrentando uno solo de estos anticuerpos monoclonales a la población citotóxica. Obteniendo entonces el porcentaje de células positivas para el antígeno reconocido por nuestro anticuerpo monoclonal. b) Marcajes dobles: Enfrentando conjuntamente el anticuerpo monoclonal Thy1.2 que desarrolla color rojo, con otro u otros anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceina que desarrollan color verde; pudiedo así, dentro de una población positiva para un anticuerpo monoclonal, ver el porcentaje de células positivas para el otro.

Marcaje simple.- 2 10^5 células citotóxicas procedentes del cultivo secudario o supervivientes de alguna depleción son incubadas en tubos de 3 ml. (especiales para nuestro citometro) con los anticuerpos monoclonales (1 μl para Lyt2, L3T4, 30 μl para T3 y 20 μl para Thy1.2) durante 45 minutos a 4 °C, después de esta incubación las células son lavadas dos veces con PBS/albumina y estudiadas en el citómetro (FAS-SCAN, Becton-Dickinsón) en el caso de los anticuerpos monoclonales Lyt2, L3T4 y T3. Para el Thy1.2 es necesaria otra incubación con 20 μl del complejo estreptoavidina/ficoe-

ritrina por 45 min. a 4ºC, tras lo cual y despues de dos lavados con PBS/albumina se analiza en el citômetro.

Marcajes dobles.- Esta modalidad de estudio en citometria de flujo la hemos desarollado para dos caso: a) Thy1.2 (rojo) y Lyt2 + L3T4 (verde). b) Thy1.2 (rojo) y T3 (verde).

2 10^5 células problema son tratadas en ambos casos primero con el anticuerpo monoclonal Thy1.2 màs el complejo estreptoavidina/ficoeritrina; una vez desarollado este sistema, agregamos el segundo anticuerpo monoclonal (L3T4 + Lyt2 ò T3) que se desarrolla tal como lo indicamos en el apartado anterior. Las células son entonces estudiadas simultaneamente para las dos fluorescencias (roja y verde).

9- INHIBICION DEL CRECIMIENTO IN VIVO POR TRATAMIENTO CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI L3T4.

En este ensayo ratones BALB/c fueron tratados con anti L3T4 afin de observar: a) Las variaciones en el crecimiento "in vivo" de un clon tumoral (GR9.B9). b) Las variaciones en la respuesta inmune entre estos ratones y otros usados como control.

Para este ensayo se hicieron dos grupos de cinco ratones de 6 a 8 semanas de edad, tratandosede la siguiente manera.

Grupo "a" (ratones tratados con anti L3T4).

Dia 1: Primera inyección de anti L3T4; intraperitonealmente 0'2 ml de PBS conteniendo 5mg. del monoclonal.

Dia 7: Segunda inyección de anti L3T4.

Dia 10: Inyección subcutanea de 5 10^6 células del clon tumoral GR9.B9, resuspendidas en 0'2 ml de PBS.

Dia 14: Tercera inyección de anti L3T4.

Dia 21: Cuarta inyección de anti L3T4.

Dia 28: Quinta y última inyección de anti L3T4.

Grupo "b"(ratones controles).

Dia 1: Primera inyección de 0'2ml de PBS.

Dia 7: Segunda inyección de PBS.

Dia 10: Inyección del clon tumoral GR9.B9, realizada en iguales condiciones que para el grupo "a".

Dia 14: Tercera inyección de PBS.

Dia 21: Cuarta inyección de PBS.

Dia 28: Quinta y última inyección de PBS.

El crecimiento tumoral fue vigilado en los dos grupo de ratones, cada cinco dias desde la inoculación; el tamaño del tumor se expresa en mm. de diametro suponiendo el tumor esférico. En cada grupo se indica el número de animales con crecimiento tumoral y la media de este crecimiento.

La respuesta inmune fue estudiada midiendo tanto las poblaciones T, como la citotoxicidad en bazo de los ratones tratados con L3T4.

Para ello siete dias despues de la ultima inyección (dia 28). Los ratones fueron sacrificados, midiendose entonces, en bazo, las poblaciones T y la citotoxicidad antes y despues de

deplecionar con Thy1.2 y Lyt2.2 + L3T4; usando como dianas el mismo clon tumoral GR9.B9 y la linea YAC-1. Asi mismo se realizó un cultivo secundario frente al clon tumoral GR9.B9. Las células procedentes de este cultivo secundario fueron estudiadas de igual manera que las procedentes directamente del bazo.

La citotoxicidad fue medida como se detalla en "III.7".

Las supoblaciones T, fueron medidas por citometria de flujo. Las poblciones positivas para Thy1.2, L3T4 y Lyt2.2 fueron definidas por marcaje simple, usando sus respectivos anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo, para su definición.

Para definir las células doble negativas se realizó un marcaje doble, usando Thy1.2 y L3T4 + Lyt2.2. Las células doble negativas se definen como aquellas positivas para Thy1.2 y negativas para Lyt2.2 + L3T4.

Los resultados se expresan en tanto por ciento de células positivas para un detrerminado antigeno con respecto a las células totales del bazo o del cultivo secundario.

El anticuerpo monoclonal anti L3T4 procedia de ascitis de ratones inyectados con el hibridoma "GK1.5". Partiendo de 30 ml. de ascitis el monoclonal fue precipitado añadiendo $SO_4(NH_4)_2$ hasta un 40% de saturación, lavado con una solución de $SO_4(NH_4)_2$ al 40% de saturación disuelto en PBS y dializado también frente a PBS hasta la ausencia de sales amonicas, en el tampon de dialisis. El monoclonal fue entonces ajustado al concentración de inyección (5mg/ml) y su funcionabilidad comprobada frente a células L3T4 positivas.

RESULTADOS

1- GENERACION DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Tras el cultivo secundario, se comprobó que las células procedentes de este, eran capaces de lisar a la célula inmunizante, osea de que se habia generado una respuesta celular capaz de reconocer y lisar a la célula tumoral.

Para ello enfrentamos, en un ensayo de liberación de ^{51}Cr. los linfocitos procedentes del cultivo secundario a células del clon inmunizante (GR9.A7). En la figura 6 (parte izquierda), aparece representado mediante un histograma de barras uno de los resultados típicos, obtenidos al efectuar este anàlisis. Como vemos, nuestras células citotóxicas son capaces de lisar muy eficientemente a la célula inmunizante, con porcentajes de liberación de ^{51}Cr que llegan casi hasta un 40% con una relación 50:1 y que se mantienen hasta un 15% con una relación 6:1.

Este mismo ensayo fue realizado usando como células diana blastos procedentes de linfocitos normales de diversas cepas. En la parte derecha de la figura 6, quedan reflejados los resultados de estos ensayos que fueron idénticos en todos los casos. Las células efectoras procedentes del cultivo

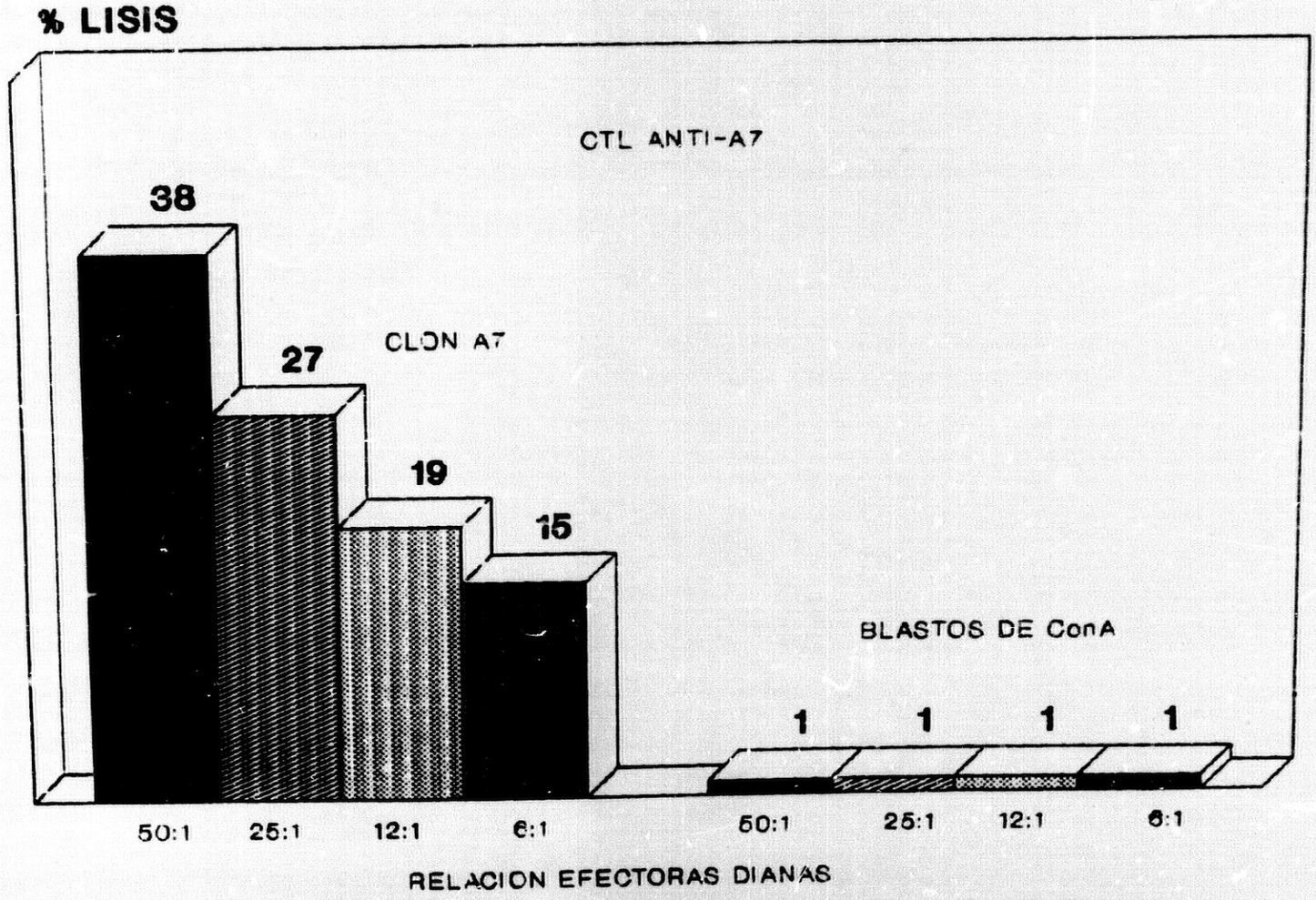


Figura 6.- Diferencia de suceptibilidad a la lisis del clon GR9.A7, frente a blastos de ConA de diferentes cepas.

secundario no fueron capaces de lisar a ninguno de los blastos de ConA, frente a los que fueron enfrentados.

Esto parece indicar que nuestras células efectoras no reconocen estructuras presentes en blastos de ConA normales y si son capaces reconocer en la célula inmunizante estructuras propias de la célula tumoral, siendo capaces de discriminar entre la célula tumoral (GR9.A7) y células normales.

Un dato a tener en cuenta sobre estos ensayos de citotoxicidad, es el hecho de necesitar 16 hr. para que la lisis sea medible. En ensayos clàsicos de 4 hr., la liberaciòn de ^{51}Cr fue en todos los casos de igual nivel que la liberciòn espontanea (datos no mostrados). Esto puede deberse a la generaciòn de células con actividad citotoxica muy lenta ò a que se generen en muy bajo nùmero.

2- ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES EFECTORAS.

Despues de comprobar la generaciòn de una respuesta antitumoral, nos planteamos averiguar cuantos tipos de células efectoras partipaban en la respuesta antitumoral.

En la figura 7, observamos los resultados de citotoxicidad obtenidos frente al clon inmunizante, usando como

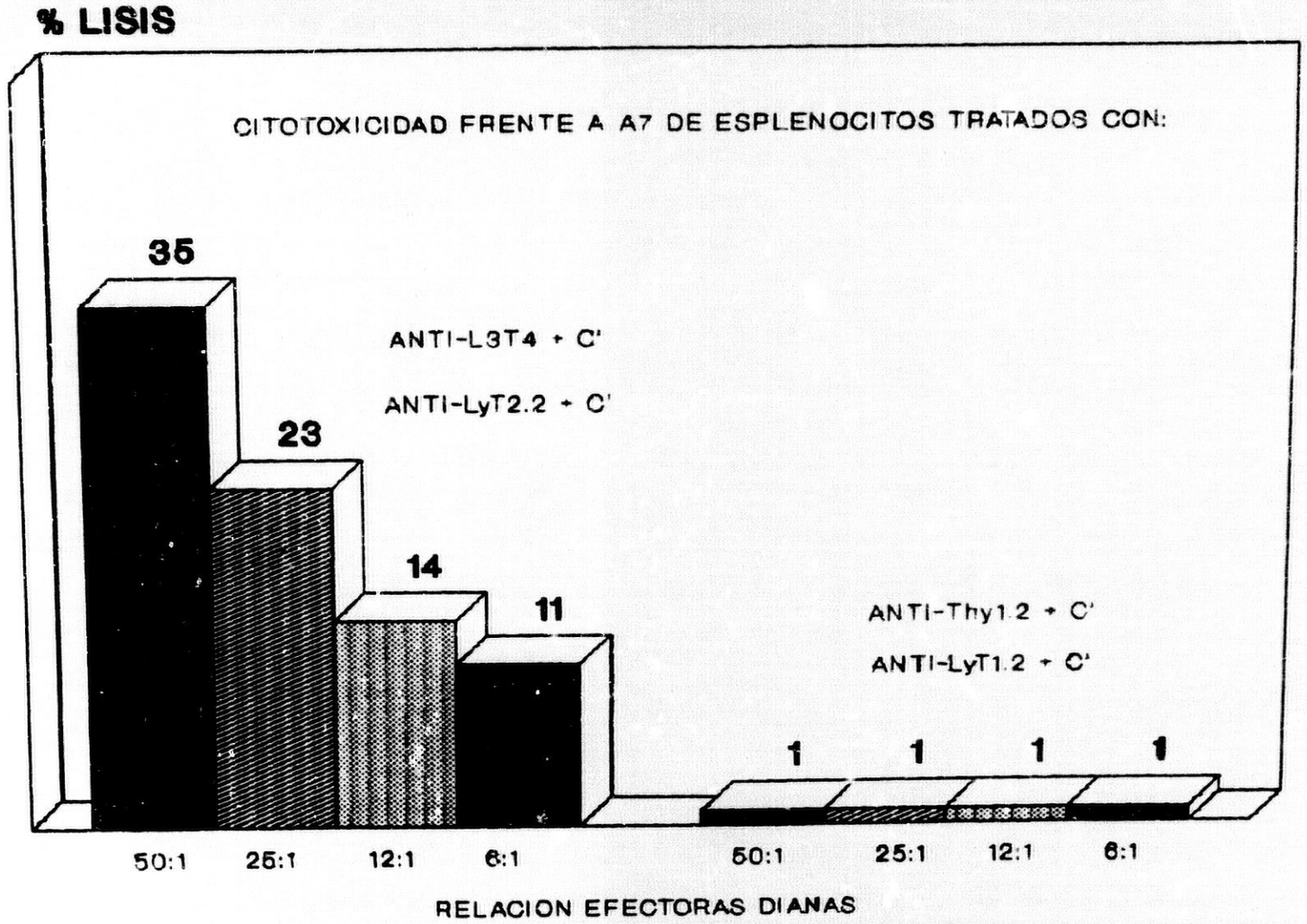


Figura 7.- Caracterización de la efectora, procedente del cultivo secundario Utilizando los anticuerpos monoclonales Lyt2.2, L3T4, Thy1.2 y Lyt1.2, en ensayos de depleción.

células efectoras en ensayo de liberación de ^{51}Cr., aquellas supervivientes de las depleciones con anti L3T4, anti Lyt2.2, anti Lyt1.2 y anti Thy1.2. Solo cuando usamos anti Thy1.2 ó anti Lyt1.2 la citotoxicidad pudo ser abolida. El uso de anti L3T4 o ant Lyt2.2 no alterò la capacidad citotòxica de nuestra células. Estos resultados llaman la atenciòn puesto que excluyen a los linfocitos T_c clasicos, restringidos por los antigenos del CMH ,como participantes en la poblaciòn efectora, resultante tras el cultivo secundario.

Los resultados de la figura 8, confirman los ya obtenidos anteriormente, la depleciòn conjunta de L3T4 + Lyt2.2 no altera la capacidad citotòxica de nuestra poblaciòn efectora. Queda descartada la posibilidad de que dos poblaciones citotòxicas una L3T4 y otra Lyt2.2, convivan dentro de nuestra poblaciòn efectora total, viendose compensada la eliminaciòn de una de ellas por la otra que quedaria intacta y enriquecida en las depleciones simples.

Sin embargo en la figura 9 podemos observar los resultados obtenidos con los CTLs anti-YC8 usando como diana el mismo tumor YC8, el diagrama de la izquierda muestra una citotoxicidad frente a este tumor del 35% en la proporciòn 50:1, esta citotoxicidad queda reducida al 10% cuando

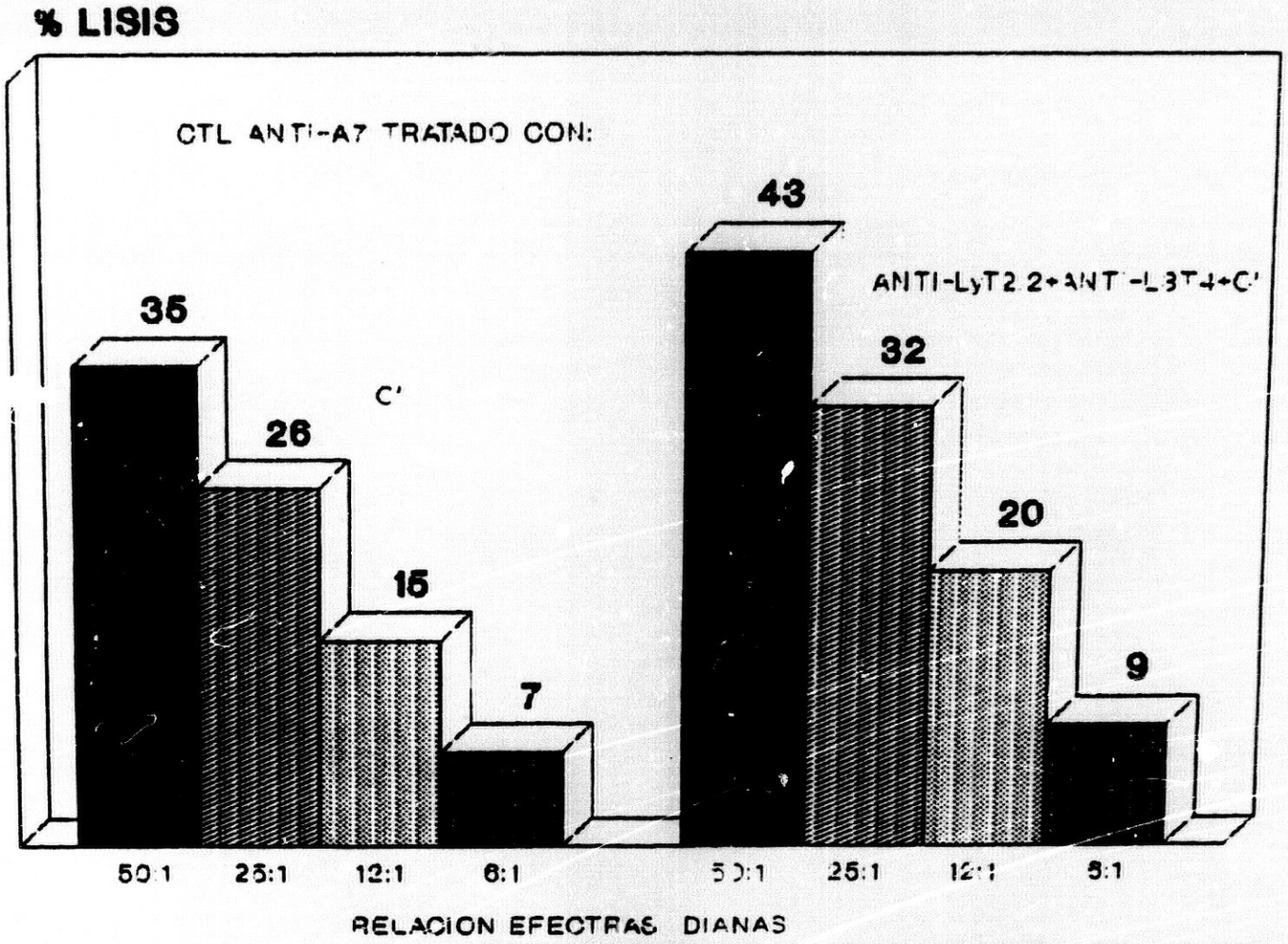


Figura 8.- Caracterización de la población doble negativa utilizando conjuntamente los anticuerpos monoclonales Lyt2.2 y L3T4, por ensayos de depleción.

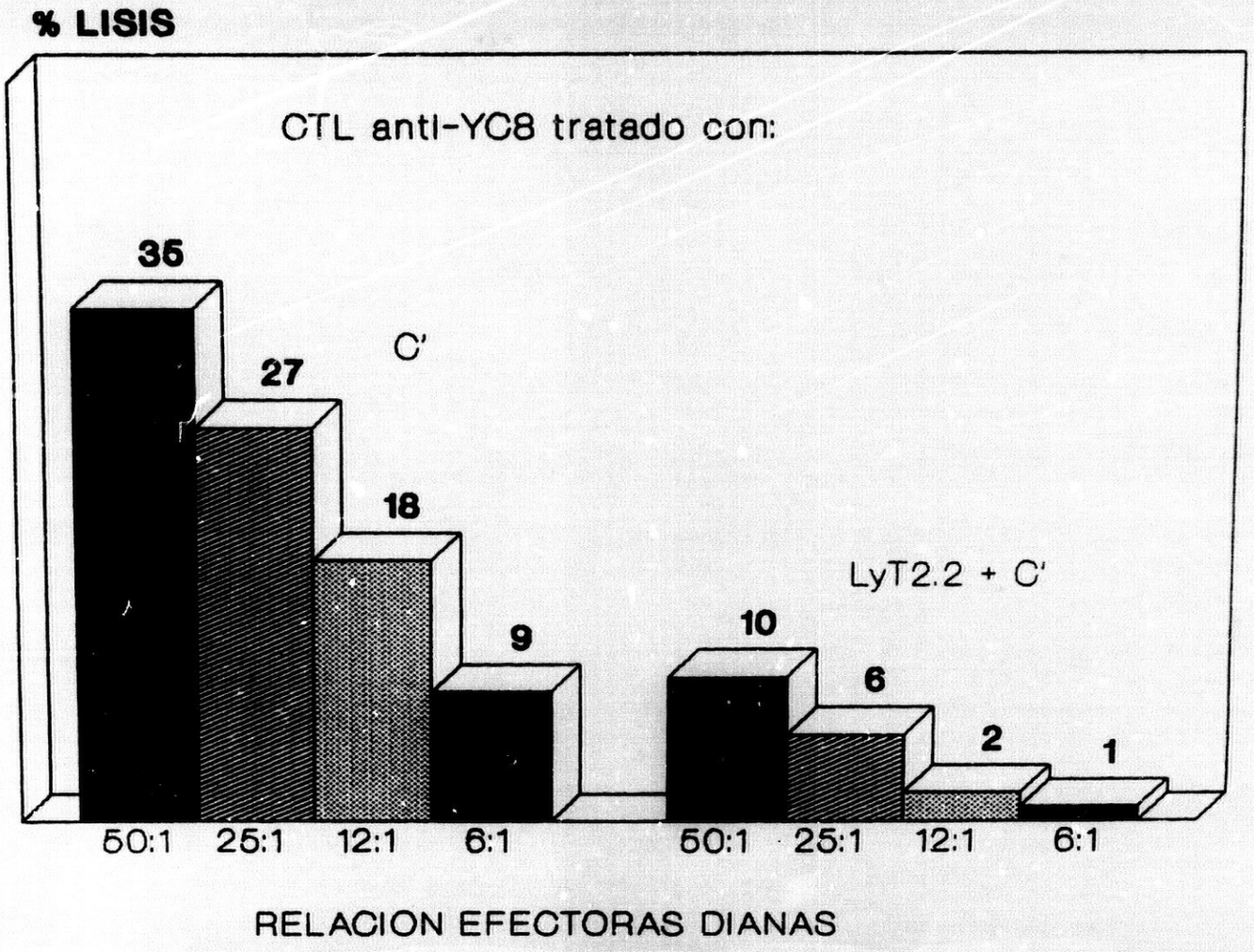


Fig.9. Estudio de la población efectora presente en el cultivo secundario anti-YC8. El tratamiento con el monoclonal ant-Lyt2.2, mas complemento, elimina el efecto citotóxico frente a la célula inmunizante (diagrama situado a la derecha).

eliminamos la subpoblación clasica de CTLs mediante el monoclonal Lyt2.2 y complemento. Este resultado junto con el efecto citotóxico a las 4 horas nos hace pensar en la obtención de CTLs clasicos, es decir, células T citotoxicas CD8+ restringidas por el CMH. La utilización de este mismo protocolo con el clon tumoral GR9.A7 como célula inmunizante dio resultados negativos para la generación de células citotóxicas.

Por consiguiente podemos afirmar que los linfocitos T_c (Lyt2.2) no tienen participación alguna en la citotoxicidad antitumoral, generada tras el cultivo secundario frente al clon tumoral GR9.A7 con el método utilizado, esta afirmación obtiene mayor consistencia al ser imposible, mediante el uso de anticuerpos monoclonales o aloantisueros dirigidos

contra las moleculas de clase I, bloquear la capacidad citotóxica de nuestras células efectoras. La tabla 4, recoge estos resultados, mostrando los reactivos usados, su especificidad y la "no" inhibición lograda al usarlos según se especifica en el anterior capitulo.

En las figuras 10 y 11 se pone claramente de manifiesto que en nuestra población efectora la aportación de las

Tabla 4. Inhibicion de la citotoxicidad mediante antisueros y anticuerpos monoclonales anti moleculas de clase I

ANTISUERO	Ant. Moncl.	ESPECIFICIDAD	Inhibicion
D control		D^d , L^d	No
D31		K^d	No
	34-1-2	D^d , L^d	No
	34-5-8	D^d	No
	34-4-20	D^d	No
	K9.18	K^d	No

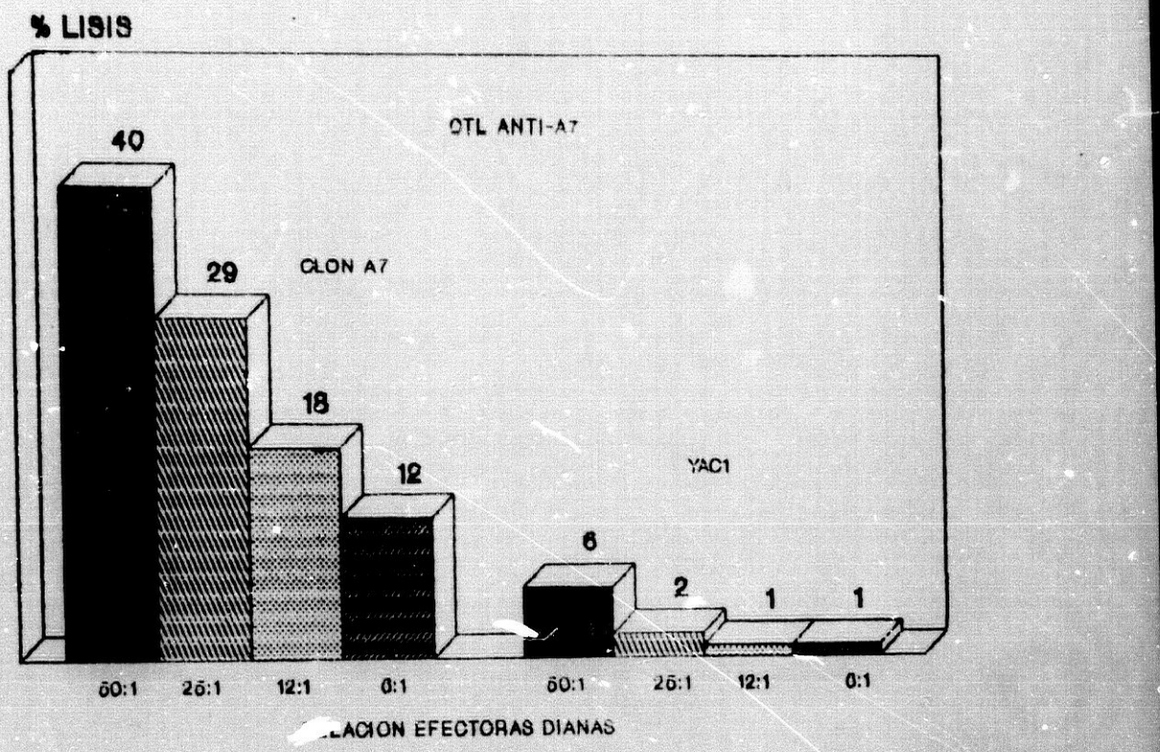


Figura 10.-Estudio de la actividad NK de las células efectoras procedentes del cultivo secundario, frente a Yac-1.

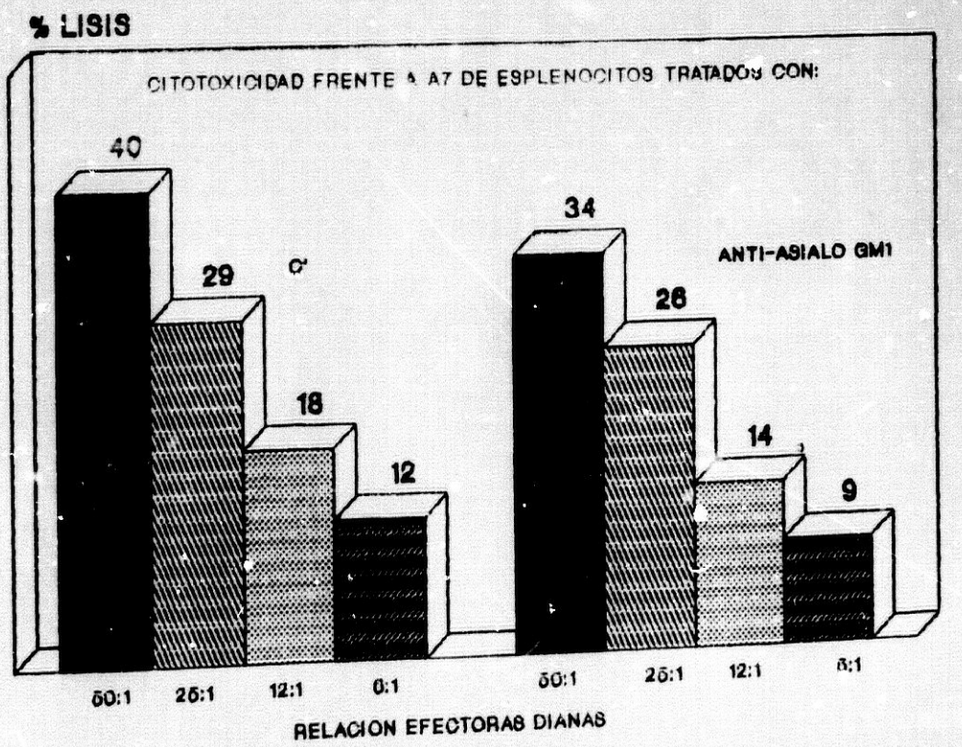


Figura 11.-Ensayo de depleción con anti Asialo GM1, de las células efectoras procedentes del cultivo secundario.

células NK es también poco significativa. En la figura 10 comparamos la capacidad de lisis de nuestras células efectoras frente al clon inmunizante y frente a la linea tumoral YAC-1, medida otra vez en ensayo de liberación de ^{51}Cr. Nuestra células, como claramente observamos, no tienen capacidad de lisar a las células YAC-1, que son dianas suceptibles a la acción de las células NK. En la figura 11, observamos que la depleción de las células procedentes del cultivo secundario, con el heteroantisuero anti asialo GM1, no disminuye significativamente la capacidad citotóxica en nuestra población efectora, recordamos que el asialo GM1 es un marcador universal para la población NK (M.Kasay 1980).

Por los datos hasta ahora expuestos podemos afirmar de nuestra población efectora:a) Carece de los clásicos linfocitos T_c (Lyt2.2, restringidos por el CMH). b) Carece de actividad NK. c) Sus células portan los antigenos Thy1.2 y Lyt1.2.

3.3- ESTUDIOS FENOTIPICOS POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Para caracterizar la población efectora generada tras el cultivo secundario, se procedió primero a su enriquecimiento, mediante depleción conjunta de las poblaciones Lyt2.2 y L3T4

que como sabemos no forman parte de la población efectora. En las células supervivientes se analizó por citometria de flujo, la presencia de los antigenos T3, Thy1.2, Lyt2.2 y L3T4 en ensayos de marcaje simple y doble.

En el ensayo de marcaje simple se analizó la presencia de Thy1.2, Lyt2.2 y L3T4 (figura 12), comparando los resultados obtenidos con nuestras células efectoras (figura 12c) a aquellos obtenidos con células procedentes de bazo de ratón BALB/c normal (figura 12a) y con los obtenidos con bazo de ratón BALB/c normal, deplecionado de la misma forma que nuestras células efectoras (figura 12b).

De este ensayo cabe reseñar: a) La ausencia de células positivas para los antigenos L3T4 y Lyt2.2 tanto en el bazo normal deplecionado como en nuestra población efectora (lo que indica la bondad de las depleciones usadas). b) En nuestra población efectora aparecen unas células Thy1.2+ que no estan presentes en bazo normal deplecionado, por tanto, se habrian generado durante la inmunización y el cultivo secundario.

Asi de estos resultados podemos concluir que la pobla

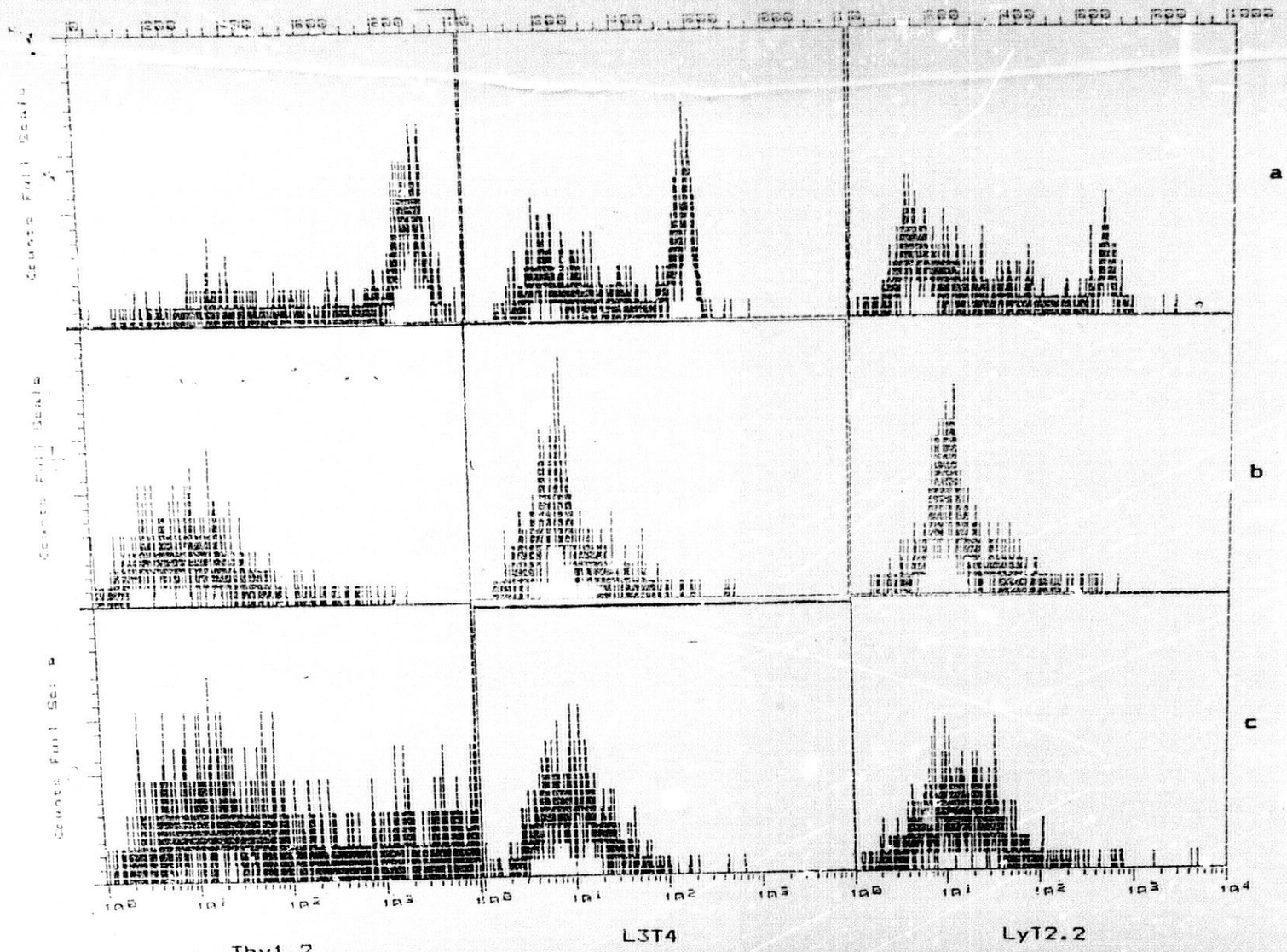


Figura 12.- Anàlisis por citometria de flujo y marcaje simple, con los siguientes anticuerpos monoclonales: Thy1.2, L3T4 y Lyt2.2. El anàlisis se aplica a tres poblaciones celulares. a) Linfocitos procedentes de bazo de ratòn BALB/c normal. b) Los mismos linfocitos, deplecionados con L3T4 + Lyt2.2. c) Células efectoras anti tumorales procedentes del cultivo secundario, deplecionadas de la misma forma que las anteriores.

ción responsable de la citotoxicidad antitumoral, exhibe un fenotipo Thy1.2+, L3T4-, Lyt2.2-.

Por marcaje doble analizamos la relación entre los antígenos Thy1.2 con L3T4 + Lyt2.2 (figura 13a) y Thy1.2 + T3 (figura 13b). Del análisis del primer marcaje deducimos ,la total ausencia de células Thy1.2+ (sector 1) que compartan los marcadores Lyt2.2 ó L3T4 (sector 2). Al analizar el segundo marcaje doble, vemos que la mayoria de las células Thy1.2+ se desplazan hacia el sector 2, pertenecientes a células positivas para los dos marcadores Thy1.2 y T3.

Asi pues podemos afirmar que nuestras células efectoras son linfocitos T (T3+) negativos para los marcadores L3T4 y Lyt2.2 pero positivos para el Thy1.2 y Lyt2.2.

3.4 ESTUDIOS DE REACTIVIDAD.

Nuestras células efectoras fueron enfrentadas con una gran cantidad de lineas tumorales, diferentes tanto por la cepa donde se originaron como por el agente carcinogeno usado para su inducción.

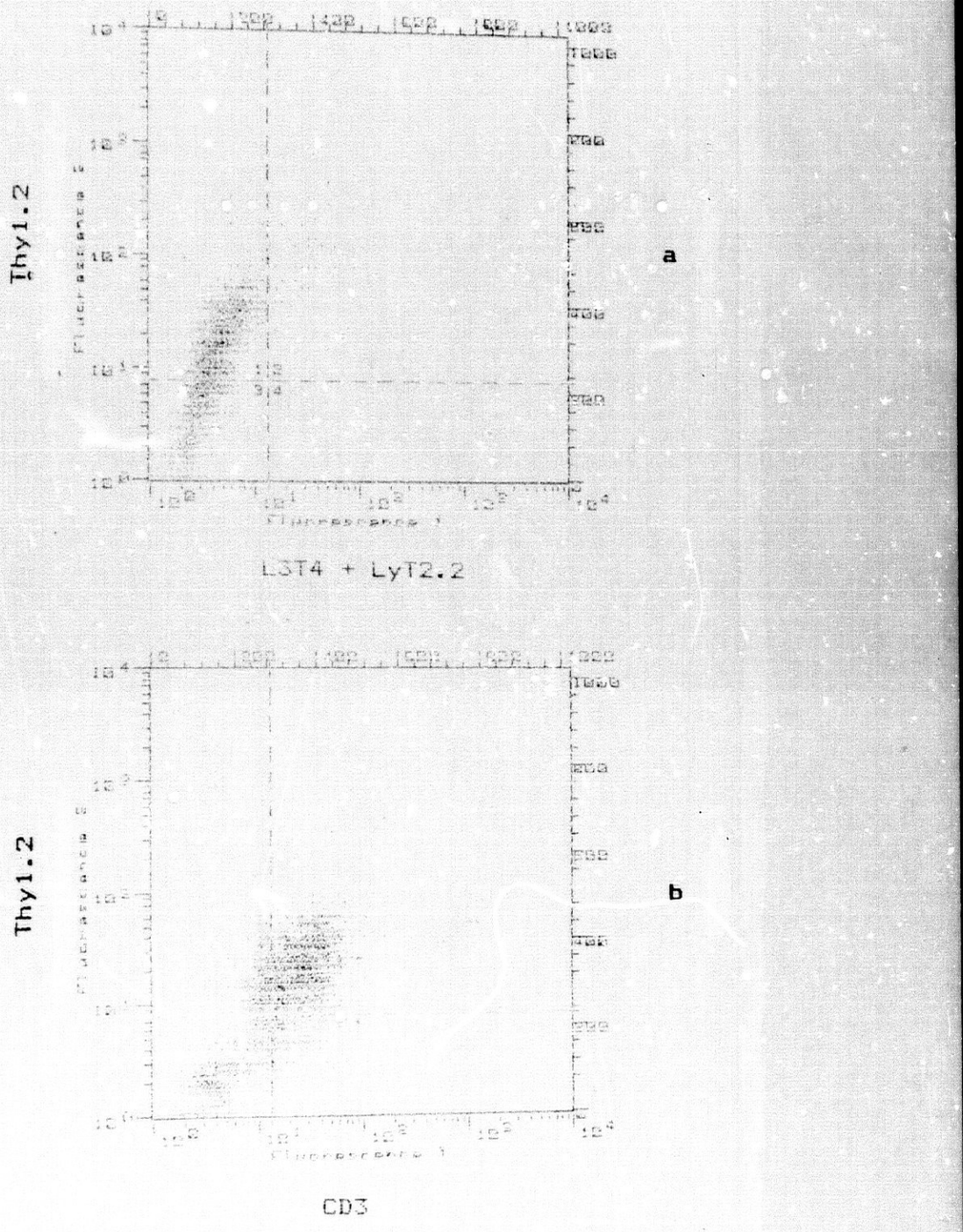


Fig 13.- Análisis por citometria de flujo y doble marcaje, de las células efectoras procedentes del cultivo secundario y depleccionadas con L3T4 + Lyt2.2. a) Análisis conjunto de poblaciones Thy1.2 y L3T4+Lyt2.2. b) Análisi conjunto de las poblaciones Thy1.2 y T3.

En la tabla 5, aparecen recogidos los resultados obtenidos de este anàlisis. Las lineas celulares se distribuyen en positivas y negativas, segùn la suceptibilidad de ser lisadas por nuestras células efectoras. Las lineas sensibles a la lisis o positivas, siempre presentaron una liberaciòn de ^{51}Cr proxima a los valores obtenidos para las células inmunizantes (GR9.A7), las lineas negativas, nunca presentaron unos porcentages de liberaciòn de ^{51}Cr superiores al 5% .

En la tabla 5, las lineas tumorales aparecen tambien distribuidas en otros dos grupos. uno formado por el sistema tumoral GR9 y el otro, formado por el resto de lineas tumorales.

Dentro del sistema tumoral GR9, cabe destacar la existencia de tres clonos negativos: B3, B7 y B10, sin que por el momento hayamos encontrado una propiedad comun a los tres, a la que se le pueda responsabilizar por esta falta de suceptibilidad a la lisis.

En el grupo de clonos positivos hay que mencionar la presencia del clon B9, de expresiòn negativa para los antigenos del CMH de clase I y de una gran malignidad en el

Tabla 5. Reactividad de las células efectoras anti A7

	SISTEMA TUMORAL GR9	LINEAS TUMORALES
POSITIVOS	GR9, A7, D8, D6 C11, B11, B9, G2	GRB7.1, GRB7.2 GRA5.1, GRIR.5 MC.B6
NEGATIVOS	B3, B7, B10	MethA, YC8, LSTRA YAC-1, EL4 P815X2 SL2, TLX/9, MBL2 Gadner, MC6A, RBL/5 L5178YE, L1210

crecimiento local "in vivo" (A Garrido y cols. 1986).

De los resultados obtenidos con el resto de las lineas tumorales, debemos hacer notar dos hechos: a) Todas las lineas tumorales inducidas por metilcolantreno, mantenidas "in vitro" con crecimiento en monocapa, fueron sensibles a la lisis. Las demas lineas ensayadas, mantenidas "in vivo" por pases intraperitoneales o "in vitro" como células en suspensiòn, fueron siempre resistentes a la lisis. b) Una de las lineas tumorales sensible a la lisis, la denominada MC.B6, es de haplotipo distinto y no compatible, con el haplotipo H-2^d de nuestras células efectoras.

Para confirmar que el mismo tipo de células efectoras analizadas con el clon inmunizante como diana, son las responsables de la lisis de las otras lineas tumorales positivas. Realizamos depleciones usando los anticuerpos monclonales anti Thy1.2, anti Lyt2.2, anti Lyt1.2 y anti L3T4; la capacidad lìtica de las células supervivientes fue ensayada, en anàlisis de liberaciòn de ^{51}Cr, usando como diana el clon GR9.B9. Este clon fue escogido al ser el que exhibia mayores diferencias con el clon inmunizante.

Los resultados se muestran en la figura 14, donde lo mismo que ocurria cuando usabamos como diana el clon GR9.A7; solo es posible inhibir la citotoxicidad usando anticuerpos monoclonales que reconocen los antigenos Thy1.2 o Lyt1.2. Usando los dirigidos contra los antigenos Lyt2.2 o L3T4 no se aprecia disminución en la lisis. Resultados que implican al mismo tipo de células en la lisis de los dos clonos tumorales GR9.A7 y GR9.B9.

3.5 ENSAYOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DEL CLON TUMORAL GR9.B9

De los resultados expuestos hasta el momento podemos concluir que tras inmunización in vivo y cultivo secundario, hemos sido capaces de generar una respuesta antitumoral que parece estar mediada por células con fenotipo T3+, Thy1.2+, Lyt1.2+, L3T4- y Lyt2.2-. A estas células se les conoce en la literatura científica como células doble negativas, haciendo mención a que no llevan ni el marcador de los linfocitos T_c (Lyt2.2) ni el de los linfocitos T_h (L3T4), portando sin embargo el marcador T3, generico para todos los linfocitos T. De una forma resumida se les identifica como células CD3+, CD4-, CD8- usando la terminologia de los "CD" o "Clusters Differentiation".

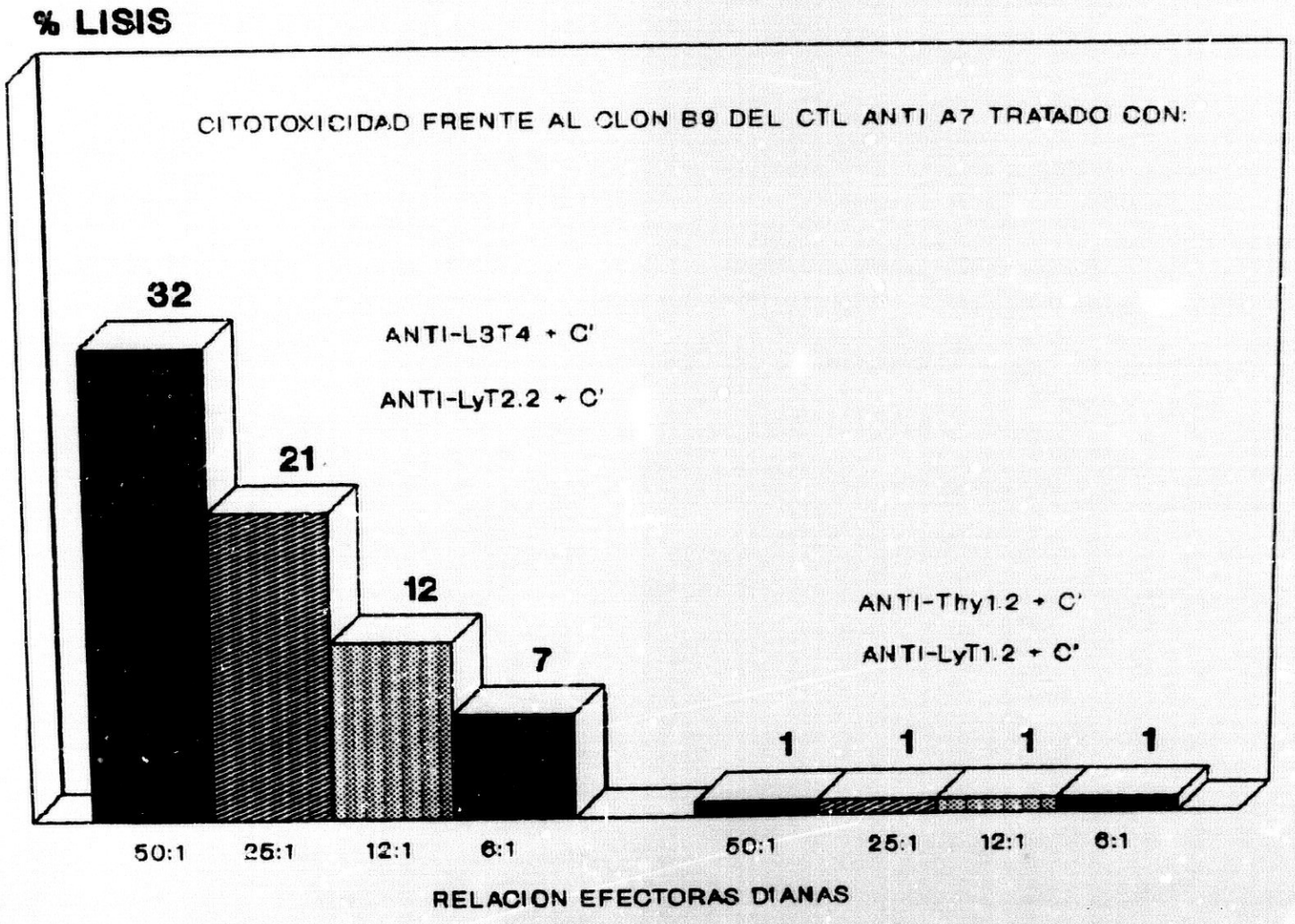


Figura 14.- Análisis de la reactividad frente al clon GR9.B9, de nuestras células efectoras; deplecionadas con Thy1.2, L3T4, LytZ.2 y Lyt1.2.

Ha sido publicado, a su vez que ratones tratados con anti L3T4, exhibian en bazo un aumento espectacular de la población doble negativa.

Nosotros hemos inyectado subcutaneamente el clon GR9.B9 (de gran malignidad), a dos grupos de ratones BALB/c; uno de ellos tratado con anti L3T4.

En las figuras 15 y 16 aparecen los resultados de esta experiencia. La figura 15, expone el número de ratones a los que se le aprecia un crecimiento tumoral, en cada uno de los grupos. A los "10" dias de la inoculación existia poca diferencia entre ambos grupos; en el tratado con anti L3T4 habia dos animales a los que se le podia apreciar cierta masa tumoral, mientras que en el grupo control este número era de tres. A los "15" dias las diferencias eran ya, mucho más claras. En el grupo control todos los ratones exhibian masa tumoral mientras que en el grupo tratado con anti L3T4; uno de los ratones, al que anteriormente se le habia apreciado una pequeña masa tumoral, habia rechazado dicho tumor, quedando un solo animal al que se le podia apreciar una masa tumoral de dimensiones reducidas. Esta diferencia se hizo total a los "20" dias, cuando en ninguno de los ratones tratados con anti L3T4 se podia apreciar crecimiento tumoral.

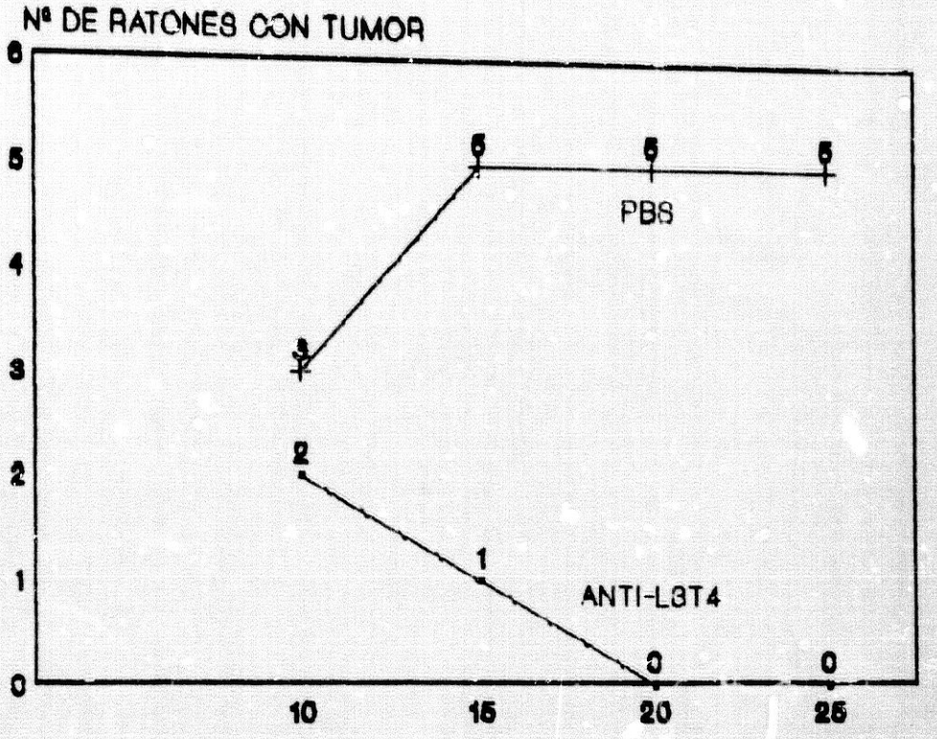


Figura 15.- Estudios de inhibición del crecimiento, para el clon tumoral GR9.B9, en ratones tratados con anti L3T4 (Linea inferior); se compara dicho crecimiento con un grupo de ratones tratados con PBS. Representamos el número de ratones que exhiben masa tumoral.

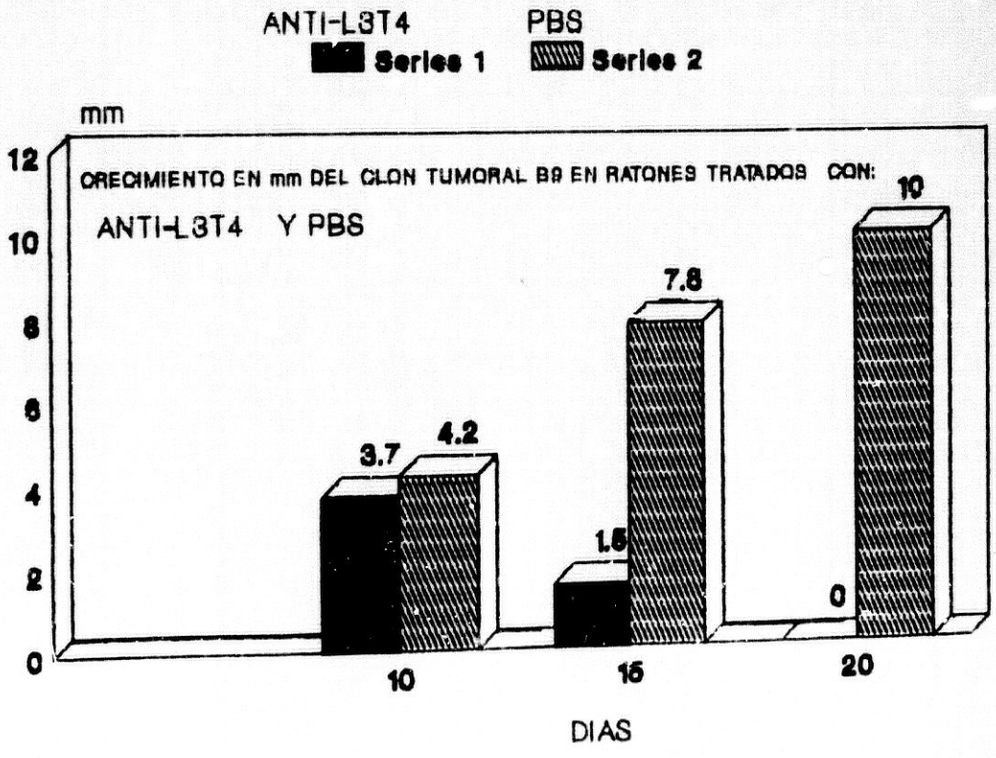


Figura 16.- El mismo ensayo que para la figura 13, representando el tamaño medio de la masa tumoral para cada grupo de ratones.

La figura 16, muestra los mismos resultados, pero expresando el tamaño medio de la masa tumoral, para cada uno de los grupos. Las conclusiones que obtenemos de esta, seran identicas a las obtenidas con la anterior figura.

Los resultados obtenidos al analizar la respuesta inmune de los ratones tratados con anti L3T4, queda reflejada en las figuras 17, 18, 19, 20 y 21.

La figura 17, refleja el porcentage de células Thy1.2, L3T4, Lyt2.2 y dobles negativas que encontramos en un bazo normal (izquierda), bazo de ratones tratados con L3T4 (centro) y células procedentes de un cultivo secundario, realizado con bazo, procedente de ratones tratados con anti L3T4. Observamos que la población doble negativa esta aumentada en el bazo de ratones tratados con L3T4 (10%) y aun màs tras su cultivo secundario (16%). La población L3T4+ se encuentra en un porcentaje menor tanto en el bazo de los ratones tratados con L3T4 (dato totalmente logico) y en las células procedentes del cultivo secundario.

Al analizar la citotoxicidad espontanea de las células de las células procedentes del bazo de animales tratados con anti L3T4 (figuras 18 y 19). Observamos que mientras no se

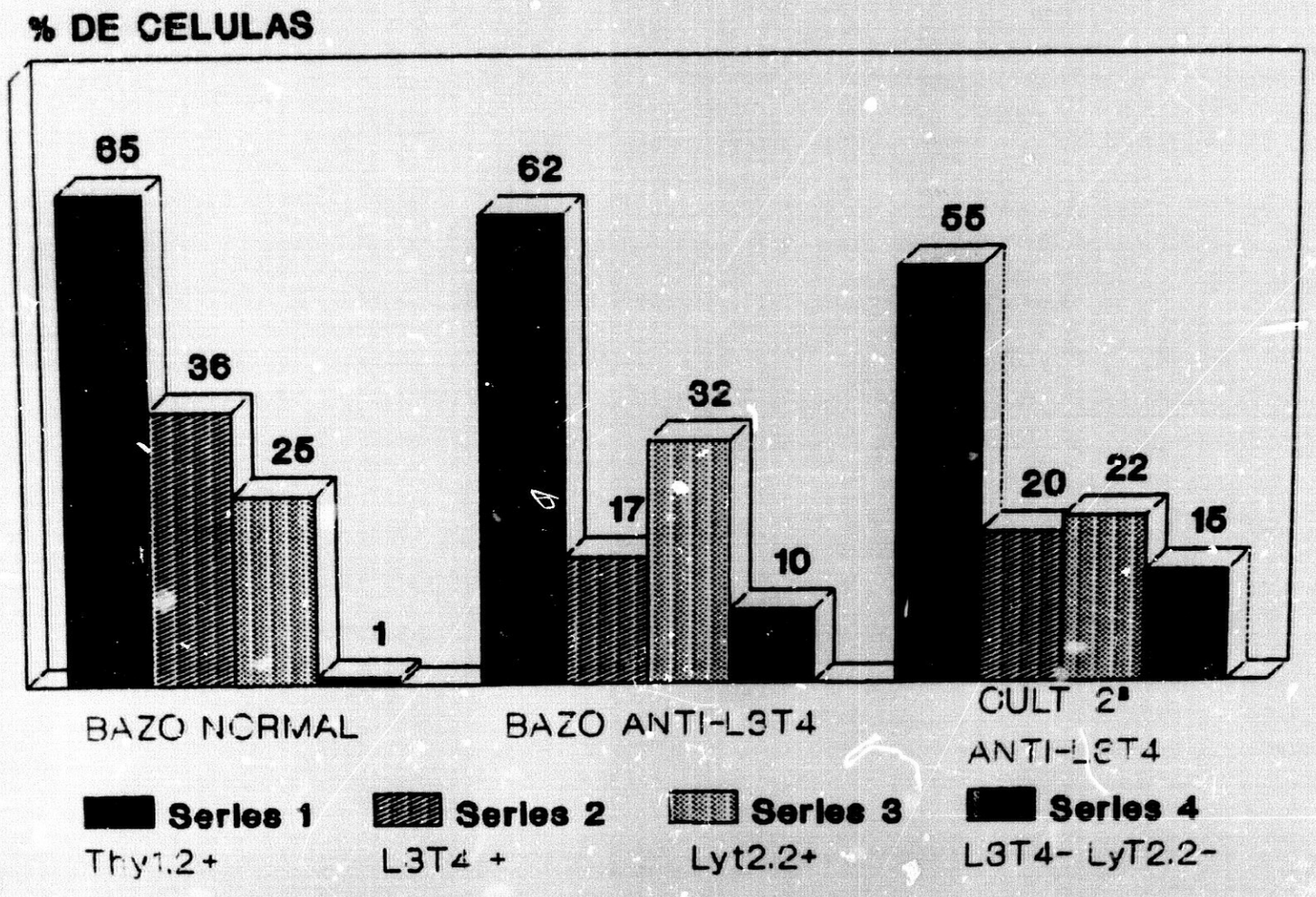


Figura 17.- Analisis de las subpoblaciones linfocitarias T, por citometria de flujo en :a) Bazo normal.b) Bazo de ratones tratados con anti L3T4 inyectados con GR9.B9.c) Cultivo secundario de bazo, procedentes de ratones tratados con anti L3T4 e inyectados con GR9.B9.

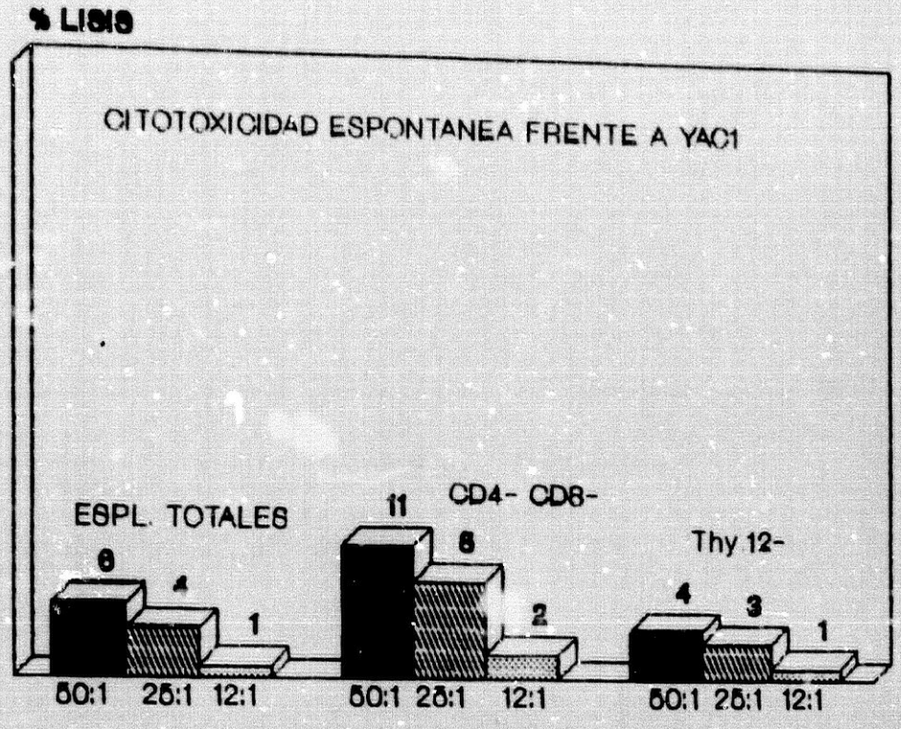


Figura 18.- Estudio de actividad NK frente a YAC-1 de: Células de bazo de los ratones tratados con anti L3T4 e inyectados con GR9.B9 (izq.).las mismas células deplecionadas con L3T4 + Lyt2.2 (centro). Las mismas células deplecionadas con Thy1.2 (derc.).

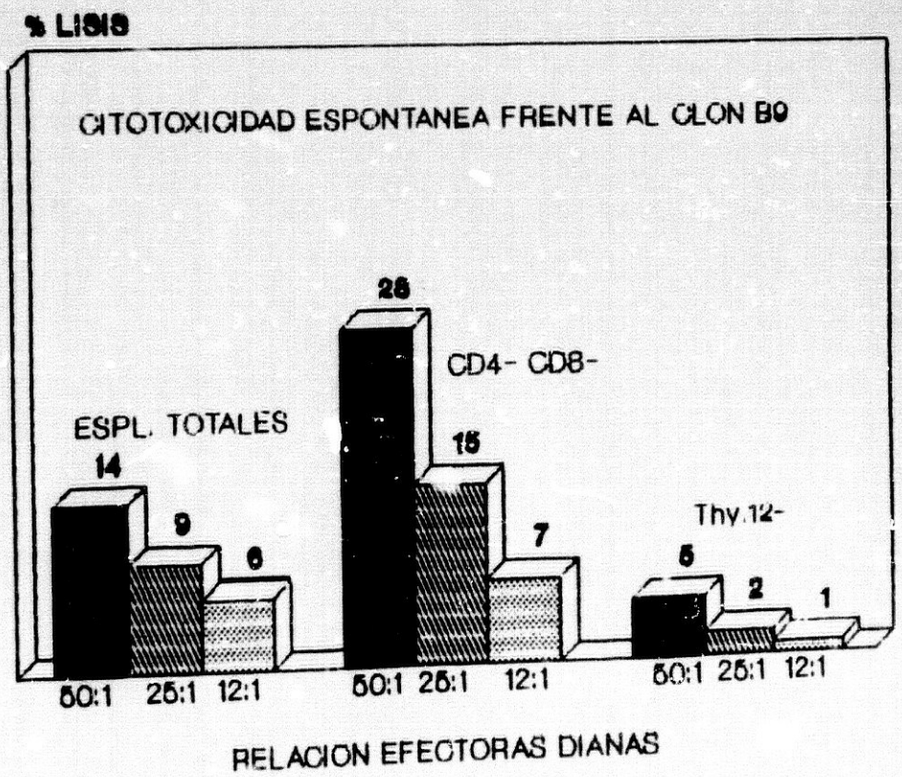


Figura 19.- Estudio de la citotoxicidad frente al clon GR9.B9 de células de bazo de ratones tratados con anti L3T4 (izq.). Las mismas células deplecionadas con anti L3T4 + Lyt2.2 (centro). Las mismas células deplecionadas con Thy1..

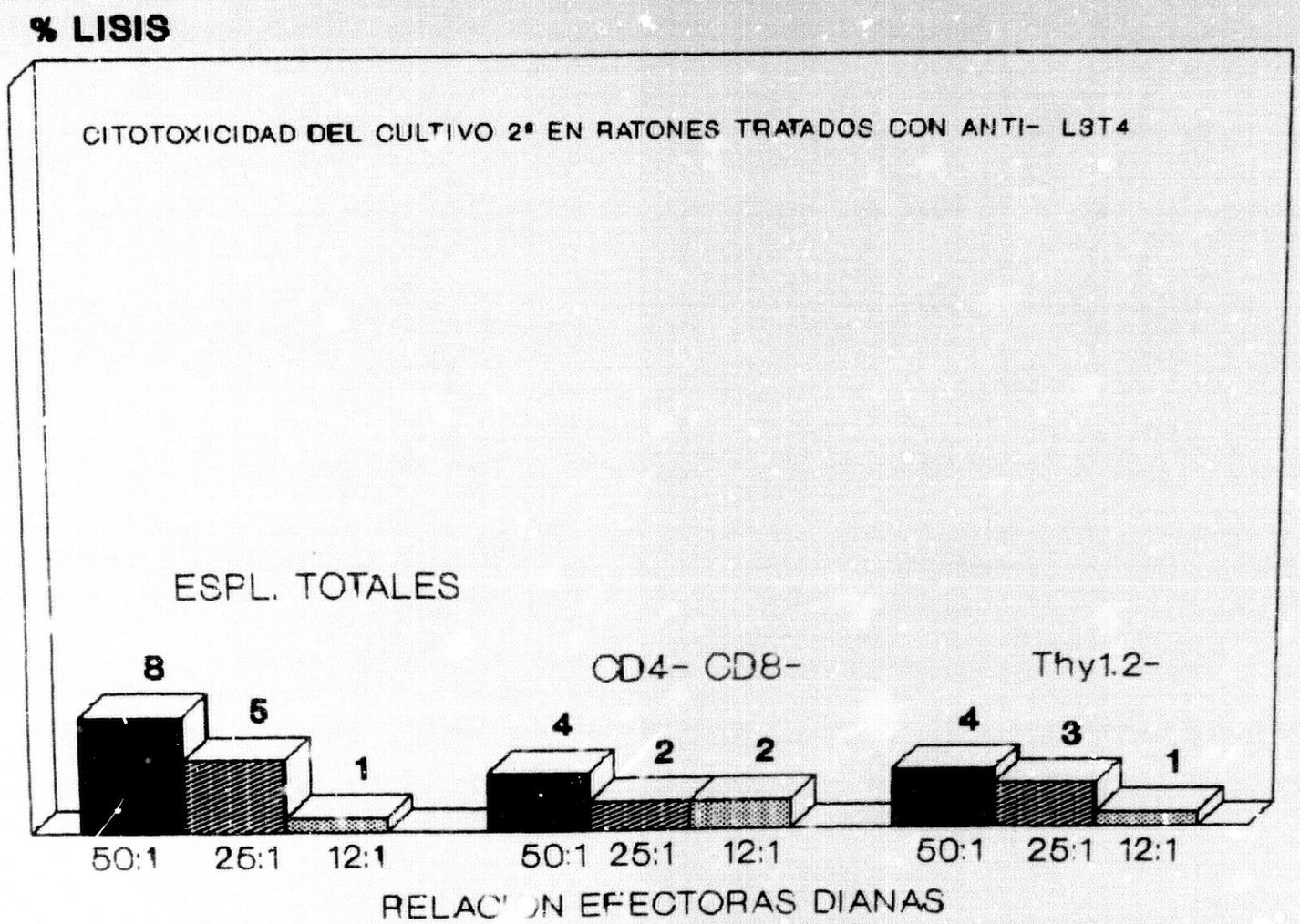


Figura 20.- Estudio de la actividad NK, frente a YAC-1, de células procedentes del cultivo secundario de bazo de ratones tratados con anti L3T4 (izq.). Las mismas células tratadas con L3T4 + Lyt2.2 (centro). Las mismas células tratadas con anti Thy1.2 (derc.).

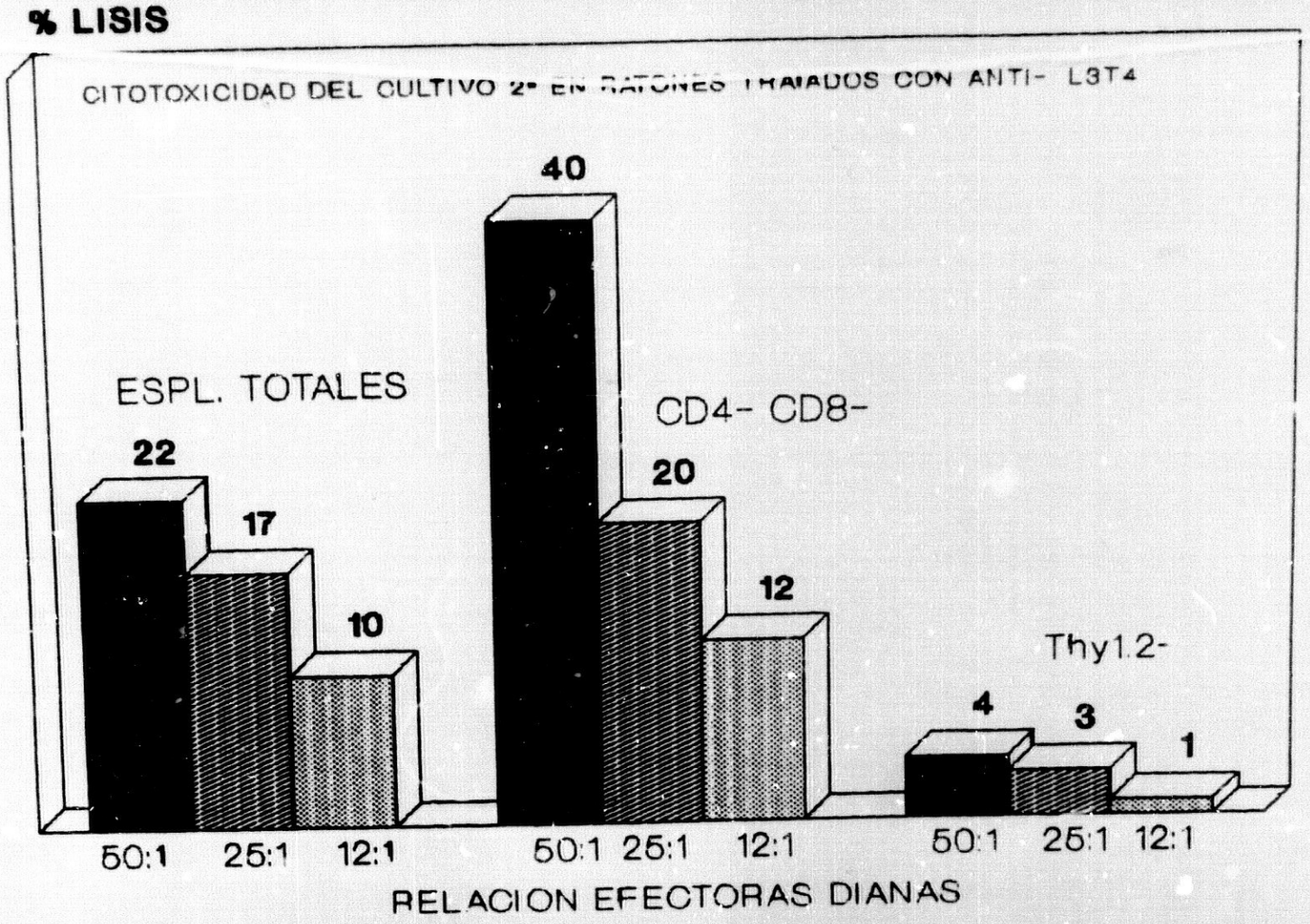


Figura 21.- Citotoxicidad frente al clon GR9.B9 de células procedentes del cultivo secundario de bazo de ratones tratados con anti L3T4 (izq.). Las mismas células deplecionadas con anti L3T4 + Lyt2.2 (centro). Las mismas células tratadas con anti Thy1.2 (derc.).

efectua la depleciòn de células L3T4 y Lyt2.2 positivas, las citotoxicidades alcanzadas frente a YAC-1, ver figura 18, (actividad NK), o frente al clon tumoral GR9.B9 (figura 19), son realmente bajas. Al deplecionar, la citotoxicidad aumenta sobre todo frente al clon GR9.B9. Estos datos estàn a favor de la existencia de una poblaciòn doble negativa con capacidad citotòxica que esta actuando "in vivo". Debemos mencionar a su vez que la citotoxicidad se reduce practicamente a cero, cuando se depleciona con Thy1.2.

Tras el cultivo secundario la repeticiòn de este anàlisis muestra una disminuciòn de actividad NK (figura 20) hasta casi hacerla despreciable. Sin embargo, la actividad frente al clon GR9.B9 (actividad doble negativa), ver figura 21 se incrementa. Asi tras la doble depleciòn (L3T4 + Lyt2.2), la citotoxicidad se eleva hasta un 40%

DISCUSION

En este trabajo hemos generado una respuesta antitumoral especifica de origen T frente a un clon tumoral llamado GR9.A7 procedente de un tumor inducido por metilcolantreno, esta respuesta es capaz de diferenciar entre células tumorales y blastos normales de ConA procedentes de diferentes cepas (Fig. 6); indicando el caracter antitumoral de esta respuesta.

El estudio de la respuesta celular T frente a los tumores es compleja y esta llena de contradiciones, probablemente porque aun estamos lejos de entender las bases moleculares de esta respuesta. Asi se argumenta por Wagner y cols (1980), la especificidad lítica de células T citotóxicas (CD8+) y el papel fundamental que desenpeñan en el rechazo tumoral, esta idea es apoyada por otros autores que demuestran la necesidad para la regresión tumoral, de la presencia de células T citotóxicas (Mills y cols 1983; Rosenstein y cols 1984).

Para otros autores, células T purificadas no citoliticas, LyT-1+ LyT2.2- (células cooperadoras) del ratón, y sus anàlogas en la rata, son especificas en la terapia o prevención de tumores inducidos químicamente y en sarcomas inducidos por virus (Fernandes-Cruz y cols 1980),en un plasmocitoma espontaneo(Fujiwara y cols 1984), en un hepatoma inducido químicamente (Fukuzawa y cols 1985) y en una leucemia inducida por

virus (Greenberg y cols 1982), también han publicado que el efecto antitumoral se lleva a cabo sin la participación de células T citotóxicas (Fujiwara y cols; Greenberg y cols 1982).

Por otra parte North y Bursuker (1984) trabajando con el sarcoma inducido químicamente Meth A demuestran que células T LyT.1+ 2- (células T cooperadoras) son responsables del crecimiento tumoral al ejercer una regulación negativa o supresión sobre células citotóxicas LyT.1- 2+ (CD8+).

Resumiendo podemos decir que probablemente existe más de un mecanismo relacionado con la regresión tumoral y que dependerá quizás del propio tumor y de los genes de inmunorespuesta (Ir) del huesped (Benacerraf y Mc Devitt 1972).

En nuestro caso hemos encontrado gran dificultad, para la generación de una respuesta celular T; solo empleando un método no tradicinal (Inmunización subcutanea en pabellón auricular y ensayo citotóxico de 16 h.) nos fue posible demostrar la generación de una respuesta citotóxica antitumoral. Esta dificultad en generar linfocitos T citotóxicos frente a tumores inducidos por metilcolantreno, ha sido reseñada por otros autores (Schreiber y cols 1988). No obstante, nosotros hemos generado facilmente una respuesta T citotóxica CD8+ y

por lo tanto restringida por el CMH, frente al tumor YCB de origen viral (Fig.9). Esto demuestra la importancia del agente inductor en las caracteristicas de la respuesta inmune frente a cada tipo de tumor.

En un principio se planteó el estudio de esta respuesta T, a la luz de las diferencias en el crecimiento local de los clonos negativos y positivos para las moléculas del CMH de clase I del sistema tumoral GR9 (A.Garrido y cols 1986; M.L. Garrido y cols 1986). Estas diferencias apuntaban a que los linfocitos Tc (CD8+) fuesen los responsables, ya que los clonos carentes del elemento de restricción para estos linfocitos escapaban al control inmune en ratones inmunocompetentes, mientras que clonos positivos para estos elementos eran fácilmente controlados; además este control inmune desaparecia en ratones radiados, implicando a un sistema radiosensible como el responsable de esta respuesta (A. Garrido y cols 1986).

Sorprendéntemente la respuesta efectora generada, no correspondia a los clásicos linfocitos Tc (CD8+). Nuestras células efectoras lisaban por igual clonos positivos y negativos para los antígenos del CMH de clase I (Tabla. 5). Anticuerpos monoclonales anti-clase I no inhibian la citotoxicidad. Las células efectoras eran capaces de lisar a la linea

tumoral M.C.B6 (Tabla. 5) de haplotipo no compatible, demostrando que nuestras células efectoras a diferencia de los clàsicos Tc no utilizan los antigenos del CMH de clase I de las células dianas para su actividad citotòxica.

En consonancia con estos resultados la citotoxicidad no era afectada cuando deplecionamos con el anticuerpo monoclonal anti-LyT2.2 (CD8), marcador de los linfocitos Tc restringidos para clase I.

Ciertos autores han indicado el posible papel citotòxico de las células (CD4+) para algunos sistemas tumorales (Braakman y cols, 1987). En nuestro trabajo las células efectoras no portan el marcador CD4 como se demuestra por experimentos de depleciòn (Figs. 7 y 8) y por estudios fenotípicos (Fig. 12).

Podriamos argumentar la existencia de dos poblaciones citotòxicas, una CD4+ y otra CD8+ sin embargo la depleciòn conjunta de ambas subpoblaciones (Fig. 8) no afecta la capacidad citotòxica de nuestra poblaciòn efectora.

Estas poblaciones quedarán por lo tanto descartadas como participantes en la citotoxicidad generada tras el cultivo secundario.

Una población efectora, ampliamente descrita en inmunología tumoral son las células NK. Las células NK o quizás la actividad NK se define como la habilidad de lisar células tumorales sin previa sensibilización y no empleando a los antígenos del CMH como elementos de restricción (Rosenberg y col 1972).

Se conoce que las celulas NK participan en la resistencia a producir metástasis de ciertos tumores (Hanna 1985), además se ha sugerido que la actividad lítica se favorece en dianas con baja expresión para los antígenos del CMH de clase I (Algarra y cols 1989). Se piensa que las células NK actuarían en primera línea de defensa contra células tumorales recién desarrollada jugando un papel importante en la resistencia contra la formación y desarrollo de tumores inducidos o inoculados en animales de experimentación

En nuestro trabajo la aportación de las células NK a la citotoxicidad encontrada tras el cultivo secundario parece practicamente nula.

Dos datos avalan esta afirmación : a) la incapacidad de nuestras células efectoras de lisar la linea tumoral YAC.1(Fig.

10), diana de referencia para toda actividad NK y b) la ausencia del marcador "asialo GM1" en las células efectoras ya que ensayos de depleción con un heteroantisuero anti-asialo GM1 no afecta a la capacidad lítica de nuestras células efectoras(Fig. 11)

Sin embargo hemos de reseñar que el método empleado (cultivo secundario) no es adecuado para el estudio de la actividad NK, puesto que la capacidad de estas células para sobrevivir in vitro es muy limitada. Así es posible que exista actividad NK in vivo tras la inmunización con nuestro clon GR9 A7, acompañando a la actividad lítica de las células efectoras que estudiamos.

Usando para las depleciones anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos presentes en células T (Thy1.2, LyT1.2) la citotoxicidad pudo ser totalmente abolida (fig. 7)

Es evidente que una población célular portando el fenotipo Thy1.2+ LyT1.2+, L3 T4-, LyT2.2- es responsable de la citotoxicidad generada tras el cultivo secundario.

Estos datos fueron confirmados por estudio de citometria de flujo (Fig. 12) donde después de la depleción con L3T4 más

LyT2.2, presiste una población Thy1.2+ (CD4- CD8-), CD3+ (fig. 13).

Este fenotipo se corresponde con el de las células T recientemente descritas en la literatura y genéricamente denominadas dobles negativas (CD4- CD8-). Estas células aparecen tanto en timo como en sangre periférica (Fowlkes y cols 1985; Van de Griend 1981).

En el timo son principalmente consideradas precursoras de las células CD4+ o CD8+ (Scollay y cols 1984), sin embargo algunos autores describen vias alternativas para la maduración en el timo de estas células dobles negativas y por lo tanto parte de timocitos dobles negativos pueden considerarse como células T funcionalmente maduras (Palacios y Pelkonen, 1988).

En sangre periférica y organos secundarios del sistema inmune las células dobles negativas suponen entre el 1-5% de las células T de un organismo inmunocompetente.

Estas células se han encontrado en mayor extensión en ratones atímicos(Macdonal y cols 1986) y con alteraciones de tipo autoinmune, lo que ha llevado a algunos autores a invo-

lucrar a estas células en procesos autoinmunes(Hashimoto y cols 1987).

Una de las mas excitantes características, exhibidas por estas células dobles negativas es la actividad antitumoral que pueden desplegar de una forma expontanea (Borst y cols 1987;) o después de incubación con IL2(De la Hera y cols 1985; Bluesstone y cols 1987).Teniendo una función de linfocitos T citotóxicos no restringidos para el CMH y son portadoras del llamado segundo receptor de celulas T o gamma/delta(Brenner y cols 1987). Trabajos recientes argumentan su participación en fenómenos de regulación e inmunovigilancia (Patel y cols 1989), de ahí el interes que ha despertado el estudio de estas células y que se ve reflejado en los numerosos trabajos de investigación que hay sobre estas prometedoras células en los ultimos tiempos.

Los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran en esta dirección demostrando no ya la clara actividad antitumoral de estas células dobles negativas,sino que además se sugiere la posiblilidad de que algunas de estas células tengan la capacidad de desarrollar especificidad antitumoral, algo exclusivo por el momento de la estirpe CD4+ o CD8+ portadoras del RcT alfa/beta.

En los trabajos hasta ahora publicados la actividad antitumoral debida a celulas dobles negativas muestra un patrón de reactividad homólogo al desarrollado por células NK por lo que los autores hablan de actividad "NK like", donde se describe mas una forma de lisis que una especificidad (Borst y cols 1987).

En nuestro estudio cuando enfrentamos las células efectoras a clonos del sistema tumoral GR9 nos encontramos con que la mayoria de ellos son lisados con la salvedad de los clonos GR9.B3, GR9.B7, GR9.B10 (Tabla.5)

Es lógico pensar que en estos clonos, nuestras células efectoras o no son capaces de reconocer el antigeno tumoral o son clonos deficitarios en el posible elemento de restricción usado por estas células efectoras.

Algunos autores han apuntado la posibilidad de que sean los antigenos del CMH de clase I, situados a la derecha de la región D, osea los denominados antigenos Qa y TLa los elementos de restricción usados por estas células dobles negativas portadoras del RcT ganma/delta (Vidovic y cols 1989).

Hasta la fecha no conocemos ninguna característica común a los tres clonos que explique la resistencia a la lisis.

Hay que hacer notar la imposibilidad de tipar los clonos del sistema GR9 para los antigenos Qa y TLa, debido a la carencia de reactivos adecuados que cubrir todos las posibilidades.

Usando como dianas otras lineas tumorales encontramos que todas las lineas sensibles a la lisis por nuestras células efectoras son procedentes de tumores inducidos por metilcolantreno y que crecen in vitro en monocapa, mientras que ninguna de las lineas tumorales de crecimiento en suspensión entre las que se encuentran tumores inducidos por metilcolantreno y otros carcinogenos químicos (meth A, P815X2, Gadner, M.C.6,), fueron sensibles a la lisis(Tabla. 5).

Esta característica exibida por nuestras células efectoras no existe para ninguna de las células dobles negativas con actividad antitumoral, descritas hasta ahora en la literatura. Este hecho nos ratifica en la posibilidad de que estas células puedan exibir especificidad antitumoral a través del RcT gamma/delta.

Esta claro por lo hasta aqui expuesto que la inmunizaciòn y posterior cultivo secundario lleva a la generaciòn de una respuesta antitumoral"especifica" desarrollada por células efectoras con fenotipo Thy1.2+, LyT1.2+, L3T4-, LyT2.2- .

Este tipo de célula hasta ahora ha sido poco descrita en los anàlisis de la respuesta antitumoral, entonces cabe hacerse la siguiente pregunta ¿ Estàn estas células presente habitualmente en la respuesta antitumoral?

Por los datos publicados en la literatura la respuesta lògica seria negativa; es decir este tipo de célula efectora no participaria habitualmente en la respuesta celular antitumoral.

No obstante debemos decir que en la mayoria de los casos, al estudiar la respuesta celular se busca una actividad efectora concreta que satisfaga nuestras hipòtesis no analizando otras posibilidades quizà por falta de elementos de juicio.

Es evidente también que la poblaciòn efectora doble negativa si se genera puede en muchos casos quedar enmascarada por la aparición de otras poblaciones efectoras mas conocidas y por lo tanto de mas facil descripciòn, en nuestro caso la

caracterizaciòn de la poblaciòn doble negativa vino tras la imposibilidad, con los métodos empleados, de generar los clàsicos linfocitos Tc (CD8+), sin descartar que estos puedan actuar in vivo.

Es obvio que para responder a la pregunta anterior habria que analizar mas selectivamente la respuesta celular antitumoral usando como célula inmunizante una serie amplia de lineas tumorales.

Fujimoto y cols (1978), reportaron no obstante la existencia de células de fenotipo Thy1.2+, LyT1.2+, LyT2.2- con actividad citotòxica, que ellos consideraban como células de fenotipo colaborador. Hoy dia al disponer del marcador L3T4, sabemos que no todas las células con el fenotipo anterior corresponden a la poblaciòn cooperadora; pudiendo pensar entonces que se trata de células homòlogas a las nuestras, sobre todo por su actividad citotòxica, esto demostraria que las células dobles negativas pueden ser generadas en otros sistemas tumorales.

En nuestro caso concreto, las células dobles negativas participan en la respuesta antitumoral, sin embargo su sola presencia es insuficiente para explicar nuestra interrogante

inicial, que hacia mención a las diferencias en el crecimiento local de clonos con diferente expresión para las moléculas del CMH de clase I y que presentan la misma susceptibilidad a la lisis (GR9.A7 y GR9.B9). Haciendo pensar que in vivo participan mecanismos de rechazo que escapan por ahora a la detección in vitro, o bien, sea debido a otras diferencias entre los clonos fuera del àmbito del reconocimiento antigénico, como puede ser los enzimas proteoliticos o diferencias en la capacida mitòtica.

Por otra parte desde los trabajos de Phren y cols (1957), se sabe que los tumores inducidos con carcinògenos químicos no presentan crosprotección argumentàndose las diferencias en sus antigenos tumorales como causa de esta falta de crosprotección. Perez y cols (1989) demuestran en trabajos de crosprotección con los clonos del sistema tumoral GR9 que el clon GR9.A7 puede crosproteger al clon GR9.B9, este hecho contrasta con los experimentos clàsicos pero sin embargo podria ser explicado por la presencia de las células dobles negativas, ya que ambos clonos son sensibles a la lisis por estas células.

En nuestro trabajo hemos comprobado que la población dc le negativa tiene una clara actividad antitumoral, ademàs

los trabajos de Algarra y cols (1989) demuestran que los clonos con expresiòn negativa para los antigenos de histocompatibilidad de clase I son mas susceptibles a la lisis por células NK como es el caso del clon GR9.39, por lo tanto este clon podria ser lisado al menos por dos células diferentes, cabe preguntarse entonces ¿ como este clon tumoral crece de froma local en ratones inmunocompetentes, llevando al huesped hasta la muerte?

Entre las posibles respuestas debemos destacar los mecanismos supresores que controlan la actividad de las celulas efectoras.

Para Martin y Benacerraf (1984) la actividad supresora se centraria en una subpoblaciòn de células CD8+ que a través de complejos mecanismos que no vienen al caso discutir aqui, serian los reponsables del control supresor de la respuesta inmune.

De otra parte North y cols (1984) argumentan que células con fenotipo cooperador favorecen el crecimiento tumoral regulando la acciòn de las células efectoras. Asi comprueban que hasta los 6 ò 9 dias de la inoculaciòn del tumor meth A existe una respuesta célular efectora eficaz y que despues de

este tiempo esta respuesta decrece siendo asociado a la aparición de estas células de fenotipo cooperador y función supresora.

Se sabe por otra parte, que la desaparición de células cooperadoras favorece el incremento de las células con fenotipo doble negativo (Ermak y Steger 1988), sugiriendo la posibilidad de que las células cooperadoras ejerzan un control sobre las células dobles negativas.

Dado que nuestras células efectoras son portadoras del fenotipo doble negativo es lógico pensar que ellas se encuentren por lo dicho hasta ahora, bajo el control de las células cooperadoras. Apoyándonos en el argumento anterior, podriamos deducir que a partir de 6 ó 9 dias de la inoculación de nuestro clon tumoral, aparecerian las células supresoras de fenotipo cooperador impidiendo el efecto anti-tumoral de las células dobles negativas. Este argumento explicaria por qué crece un tumor que soporta la acción de varias células efectoras.

En este contexto, la posibildidad de eliminar las células CD4+ que teoricamente son responsables del efecto supresor, permitiria prolongar la acción de las células efectoras y de esta manera darian lugar al rechazo tumoral.

Este planteamiento parece confirmarse en nuestro sistema tumoral, ya que se produce la inhibición del crecimiento local del clon tumoral GR9.B9, en ratones tratados con anti-L3T4(figs. 15 y 16). Observando que todos los ratones que han recibido el tratamiento rechazaron el tumor, en contraposición a los ratones controles, donde hubo un 100% de crecimiento tumoral.

El análisis de los esplenocitos de ratones tratados con anti-L3T4 muestra una actividad citotóxica importante debida a células dobles negativas aun antes del cultivo secundario (fig. 19), esta actividad se ve incrementada tras dicho cultivo (fig. 21); esto se relaciona con un aumento de la población doble negativa en ambas situaciones (fig. 17).

Hasta aquí queda claro la participación de la población doble negativa en el rechazo del clon tumoral GR9.B9. Pero como vimos en parrafos anteriores las células NK lisan también eficazmente a este clon tumoral, por lo tanto, se puede pensar que al menos estas dos poblaciones, formarían parte de esta regresión tumoral.

Este rechazo eficaz, no se cumple en los ratones utilizados como control, y los mecanismos que lo impiden es evidente que tienen un componente imprescindible en la población CD4+, según muestran nuestros resultados.

Resumiendo y de acuerdo con otros autores (North y Bursuker 1984) podemos pensar que el desarrollo de un tumor conlleva, en primer lugar, una respuesta efectora seguida a continuación de mecanismos supresores; la regresión del tumor dependerá lógicamente de que la respuesta efectora sea capaz de eliminarlo antes de la aparición de una actividad supresora que lo impida.

La inmunoterapia encaminada al rechazo tumoral, tiene como objetivo habitualmente, el aumento y la persistencia en el tiempo de la actividad efectora del sistema inmune. Por lo expuesto en esta tesis este objetivo puede complirse,no solo manipulando las propias células efectoras (Rosenberg y cols, 1986), sino a través de una actuación sobre los mecanismos supresores, como se ha demostrado con gran eficacia en nuestro sistema tumoral.

CONCLUSIONES

1.- Hemos generado tras inmunización y posterior cultivo secundario, con el clon tumoral GR9.A7, una respuesta T anti-tumoral que es capaz de discriminar entre las células tumorales y blastos normales de ConA.

2.- La población efectora responde al fenotipo: CD3+, Thy1.2+, Lyt2.2- y L3T4-. Subpoblación de linfocitos T, denominada "Doble Negativa".

3.- Esta población doble negativa tiene en nuestro estudio una especificidad restringida a lineas tumorales inducidas por metilcolantreno y crecimiento en monocapa.

4.- Ratones tratados con el anticuerpo monoclonal anti-L3T4 rechazaron el clon tumoral GR9.B9, frente a ratones control tratados con PBS que no lo hicieron.

5.- La respuesta antitumoral "T", en los ratones regresores del tumor GR9.B9, era mediada principalmente por la población doble negativa.

6.- La población doble negativa participa en la defensa anti-tumoral, estando su actuación controlada por las células CD4+.

BIBLIOGRAFIA

Acuto, O., Hussey, R. E., Fitzgerald, K. A., Protentis, J. P., Meuer, S. C., Schlossman, S. F. and Reinherz, E. L. 1983. The human T cell receptor: appearance in ontogeny and biochemical relationship of alfa and beta subunits on Il-2 dependent clones and T cell tumors. Cell. 34, 717.

Adkins, B., Mueller, C., Okadac. Y., Reichert, R. A., Weissman, I. L., Spangrude, G. J. 1987. Early events in T-cell maturation. Ann. Rev. Immunol. 5, 325.

Algarra, I.,Ohlen, C., Perez, M., Ljunggren, H.G., Klein, G., Garrido, F., Karre, K. 1989. MHC class I deficient cells Within a heterogeneous fibrosarcoma show elevated NK sensitivity and reduced survival in the lungs after intravenous administration. Int. J. of Cancer. 44, 675.

Allen, H., Wraith, D., Pala,P., Askonas, B., Flavell, R.A. 1984. Domains interactions of H-2 class I antigen alter cytotoxic T cell recognition sites. Nature. 309, 279.

Benacerraf, B., McDevitt, H. 1972. Histocompatibility linked immuneresponse genes. A new class of genes that control the formation of specific immune response has been identified. Science. 175, 273.

Benacerraf, B.,Unanue, E. R. 1986. Inmunologia. 2 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 105.

Benjamini E., Rennick D. M., Stewart S. Tumor inmunology. In: Stites D. P., Stobo J. D., Funderberg. H. H., Wells J. V. 1982 Basic and clinical inmunology Lanje Medical Publications. 4 edicion pag 233.

Bevan, M. J. 1977. In a radiation chimera host H-2 antigens determine the immune responsiv ness of donor cytotoxic cells. Nature 269, 417.

Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., Wiley, D. C. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 329, 506.

Bjorkman, P. J.,Saper, M. A.,Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., Wiley, D. C. 1987. The foreing antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibity antigens. Nature 329, 512

Blue, M. L., Daley, J. F., Levine, H., Craig, K. A. and Schlossman,S.F. 1987. Identification and isolation of a T4+ T8+ cell Whith high T3 expresion in human thymus: a possible late intermediate in thymocyte differentiation. J. Immunol. 139, 1065.

Bluestone, J. A., Pardoli, D., Sharrow, S. O. and Fowlkes, B. J. 1987. Characterization of murine thymocytes with CD3-associated T-cell receptor structures. Nature, 326, 82.

Bolhuis, R. L. H., Storter, G. and van de Griend, R. J. 1987. A novel T cell population with antitumour activity expresses a gamma-CD3 receptor:Applicability for immunotherapy. In:Cellular Immunotherapy of Cancer (Ed. by R.L.Truitt, R.P.Gale and M.M.Bortin), p.230. Alan R.Liss Inc., New York.

Born, W., Yague, J., Palmer, E., Kappler, J., Marrack, P. 1985. Rearrangent of T-cell receptor beta-chain genes during T-cell development.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 925

Borst, J., van de Grien, R. J., van Oostveen, J. W. et al. 1987. A T-cell receptor gamma/CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. Nature, 325, 683.

Braakman, E., Rotteveel, T. M., van Bleek, G., van Seventer, G. A., and Cornelis, J. L. 1987. Are MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes important? Immunology Today, 8, 9.

Brenner, M. B., McLean, J., Scheft, H., Riberdy, J., Ang, S-L., Seidman, J. G., Devlin, P. and Krangel M. S. 1987. Nature. 325, 689.

Brenner, M. B., McLean, J., Deno, D. P., Strominger, J. L., Smith, J. A.,OWen, F. L., Seidman, J. G., Rosen, F., Krangel, M. S. 1986. Identification of a putative second T-cell receptor. Nature 322, 145.

Bruce, J., Symington,F. W., Mckean, T. J. and Sprent, J.1981. A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells.J. Immunol.127, 2496.

Budd, R. C., Macdonald, H. R., Lowenthal, J. W. Davignon, J. L., Izui, S. and Cerotini, J. C. 1985. Growth and differentiation in vitro of accumulating Ly2-L3t4- subset in lpr mice. J. of Immunol. 135, 3704.

Burnet F. M. 1970 The concept of inmunological surveillance. Prog. Exp. Tumor. Res. 13, 1.

Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Miles, C., Grey, H. M.- 1987. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restricton and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. Science 235, 1353.

Caballero, A., Garrido, A., Algarra, I., Perez, M., and Garrido, F. 1989. Generation of syngeneic anti-tumour doble negative cells (CD4- CD8-), With cytotoxic activity against clones of different MHC class I expression. J. of Immunog. en prensa.

Colligan, J. E., Kindt, T. J., Vehara, H., Martinko, J., Nathenson, S. G. 1981. Primary structre of a murine transplantation antigen. Nature. 219, 35.

Collins, T., Lapierre, L. A., Fiers, W., Strominger, J. L., Power,J.S. 1986. Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigenx in vascular endothelial cells and dermal fibroblast in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 83, 446.

Coupar, B. E., Andrew, M. E., Both, G. W., Boyle, D. B. 1986. Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in

vaccinia virus recombinants and effects on the immune reponse. Eur. J. Immunol.16, 1479.

Crispe, I. N., Moore, M. W., Husmann, L. A., Smith, L., Levan, B. J. and Shimonkevitz, R. P. 1987. Nature. 329, 336.

Cullen, S. E., Freed, J. H., Natheson, G. 1976. Structural and serological properties of murine Ia alloantigens. Transplant. Rev. 30, 236.

Charron' D, J., McDevitt, H. O. 1980. Characterization of HLA-D region antigens by two dimensional gel electrophoresis. Molecular genotyping. J. Exp. Med. 152, 18.

Chervenak, R. and Cohan, J. J. (1982). Peanut lectin binding as a marker for activated Tlineage lymphocytes. Thymus 4, 61.

Chien, Y., Gascoigne, N. R. J., Kavaler, J., Lee, M. E., Davis, M. M. 1984. Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. Nature 309, 322.

Chien, Y., Becker. D. M., Lindsten, T., Okamura, M., Cohen, D. I., Davis, M. M. 1984. A third type of murine T-cell receptor gene. Nature 312, 31.

Chien, Y., Iwashima, M., Kaplan, K. B., Elliott, J. F., Davis, M. M. 1987. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. Nature 327, 667.

De La Hera, A., Toribio, M. L., Marquez, C. and Martinez-A., C. 1985. Interleukin 2 promotes growth and cytolytic activity in human T3+ 4- 8- thimocytes Proc. Nat. Aca. Science., USA., 82, 6268.

Dembic, Z., Bannwarth, W., Taylor, B. A., Steinmetz, M. 1985. The gene encoding the T-cell recptor alpha-chain maps close to the Np-2 locus on mouse chromosome 14. Nature 314: 271.

Dialynas, D. P., Uuan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M., and Fitch, F. W. 1983. Characteritation of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: Similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. J. Immunol. 131, 2445.

Duran, L. W., Pease, L. R. 1986. Relating the structure of

mayor transplantation antigens to inmune function. Transplantation 41, 279.

Elliott, J. F., Rock, E. P., Patten, P. A., Davis, M. M., Chien, Y. 1988. The adult T-cell receptor delta chain is diverse and distinct from that of fetal thymocytes. Nature 331, 627.

Engleman, E. G., Benike, C. J., Grumet, F. C. and Evans, R. L. 1981. Activation of human T lymphocyte subsets; helper and suppressor/cytotoxic T cells recognize and respond to distinct histocompatibility antigens. J. Immunol. 127, 2124.

Ewestein, B. H., Freed, J. H., Mole, L., Nathenson, S. G. 1976. Studies on the chemicale basic of variability and the complex cellular expression oj the H-2k and H-2D products. Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 73, 915.

Fernandez-Cruz, E., Woda, B. A. and Felman, J. D. 1980. Elimination of syngeneic sarcoma in rats by a subset of T lymphocytes. J. Exp. Med. 152, 823.

Festenstein, H., Garrido, F. 1986. MHC antigens and malignancy. Nature. 322, 502.

Fathman, C.G., Frelinger, J. G. 1983. T-lymphocyte clones. Ann. Rev. Inmunol. 1, 633.

Fowlkes, B. L., Edison, L., Mathieson, B. J. and Chused, T. M. 1985. Early T lymphocytes: Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells. J. Exp. Med. 162, 802.

Fink, P. J., Bevan, M .J. 1978. H-2 antigen of the Thymus determines lymphocytes specificity. J. Exp. Med. 148, 766.

Foley E. J. 1953. Antigenic properties of methylcholantrene-induce tumors in mice of the strain of origen. Cancer Res. 13, 835.

Fujimoto, S., Matsuzawa, K., and Tada, T., 1978. Cellular interactions between cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumors in the mouse. Cell. Immunol. 38, 378.

Fujiwara, H., Fukuzawa, M., Yoshioka, T., Nakajima, H. and Hamaoka, T. 1984. The role of tumor-specific Lyt-1+2- T cells

in eradicating tumor cells in vivo. J. Immunol. 133, 1671.

Fukuzawa, M., Fujiwara, H., Yoshioka, T., Itoh, k. and Hamoka, T. 1985. Tumor-specific Lyt-1+2- T cells can reject tumor cells in vivo Without inducing cytotoxic T Lymphocyte tresponses. Transplant Proc. 17, 599.

Gallatin, W. M., Weissman, I. L. and Butcher, E. C. 1983. A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. Nature 304, 30.

Garrido, A., Perez, M., Delgado, C., Garrido, M. L., Rojano, J., Algarra, I., Garrido, F. 1986a. The influencia of class I gene obtained from clones derived of a solid Balb/C tumor. Exp.Clin.Immnogen. 13, 98.

Garrido, M. L., Perez, M., Delgado, C., Rojano, J., Algarra, I., Garrido, A., Garrido, F. 1986. Immunogenenicity of H-2 positive and H-2 negative clones of a murine tumour GR9. J.of immunogen. 13, 159.

Gascoigne, N. R., Chien, Y., Becker, D. M., Kavaler, J., Davis, M. M. 1984. Genomic organization and sequence of T-

cell receptor beta-chain constan and joining-region genes. Nature 310, 387.

Giles, R. C., Capra, J. D. 1985. Biochemistry of MHC class II molecules. Tissue Antigens. 25, 57.

Goding, J. W. 1981. Evidence for linkage of murine microglobuline to H-3 and Ly-4. J. of Immunology. 126, 1644.

Good, M, F., Pyke, K. W., and Nossal, G. J. V 1983. Functional clnal deletion of cytotoxic T-lymphocyte precursors in chimeric thymus produced in vitro from embryonec Analagen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 3045.

Goverman, J., Minard, K., Shastri, N., Hunkapiller, T., Hansburg, D., Sercarz, E., Hood.L. 1985. Rearranged beta T cell recptor genes in a helper T cell clone specific for lysozyme: No correlation between V and MHC restriction. Cell 40, 859.

Goyert, S. M., Shively, J. E., Silver, J. 1982. Biochemi l characterization of a second family of human Ia molecules, HLA-DS, equivalent to murine I-A aubregion molecules. J. Exp. Med. 156, 550.

Greenberg, P. D., Kern, D. E. and Cheever, M. A. 1985. Therapy of disseminated murine leukemia With cyclophosphamide and immune Lyt-1+,2- T cells tumor eradication does not requiere participation of cytotoxic T cells. J. Exp. Med. 161, 1122.

Greenstein, J. L., Kappler, J., Marrack, R. and Burakoff, S. J. 1984. The role of L3T4 in recognition of Ia by a cytotoxic, H-2d-specific T cell hybridoma. J. Exp. Med. 159, 1213.

Haars, R., Kronenberg. M., Gallatin, W. M., Weissman, I. L., Owen, F. L., Hood, L. 1986. Rearrangement and expression of T-cell antigen receptor and ganma genes during thymic development. J. Exp. Med. 164, 1.

Hanna, N. 1985. The role of natural killer cells in the control of tumor growth and metastasis. Biophys. Acta. 780, 213.

Hansen, J. A., Martin, P. J., Beatty, P. G., Clark, E. A., Jedbette, R. 1984. Human T lymphocyte cell surface molecules

defined by the workshop monoclonal antibodies ("T cell protocol"). In: Leukocyte Typing, S.F., eds, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 195.

Harris, H. W., Gill, T. J. 1986. Expresion of class I transplantation antigens. Transplantation. 42, 109.

Hashimoto, Y., Yui, K., Littman D. and Greene M. I. 1987. T-cell receptor genes in autoimmune mice:T-cell subset have unexpected T-cell receptor gene programs. Proc. Nat. Aca. Sience. USA., 84, 5883.

Havran, W. L. Poenie, M., Kimura, J., Tsien, R., Weiss, A. and Allison, J. P. 1987. Expresion and funtion of the CD3-antigen on murine CD4+ CD8+ Thymocytes. Nature 300, 170.

Hayday, A. C., Saito, H., Gillies, S. D., Kranz, T. M., Tanigawa, G., Eysen, H. N., Tonegawa, S. 1985. Structure, organitation and somatic rearrangement of T-cell gamma genes. Cell. 40, 259.

Hayday, A. C., Diamond, D., Tanigawa, G., Heilig, J., Folsom, V., Saito, H., Tonegawa. 1985b. Unusual features of the

organization diversity of T-cell receptor alfa chain genes. Nature 316, 828.

Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A., Davis, M. 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature 320, 272.

Herzog, Ch., Walker, Ch., Pichler. W., Aeschlimann. A., Wassmer. P., Stockinger. H., Knapp. W., Rieber. P., Müller. W., 1987. Monoclonal anti-CD4 in arthritis. The Lancet, December 19, 1461.

Hood, L., Kronenberg, M. and Hunkapiller, T. 1985. T cell antigen receptors and the inmunoglobulin supergene family. Cell 40, 225.

Hood L. E., Weissman I. L., Woop B. W. Inmunology. The Benjamin/Cummings pp 401, 1978.

Hurly, C. K., Shaw, S., Nadler, L., Schlosman, S., Capra, J. D. 1982. Alpha and beta chains of SB and DR antigens are structurally distinct. J. Exp. Med. 156, 1557.

Kadish, J. L. and Basch, R. S. 1977. Haematopoietic thymocyte precursors.III. A population of thymocytes with the capacity to return (home) to the thymus. Cell. Immunol. 30, 12.

Kappes, D. J., Arnot, D., Okada, K., Strominger, J. L. 1984. Structure and polymorphism of the HLA class II SB ligth chain gene. EMBO Journal. 3, 2985.

Kappler, J., Kubo, R., Haskins, K., Hannum, C., Marrack, P., Piggeon, M., McIntyre, B., Allison, J., Trowbridge, I. 1983. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cell in mouse and man: Identifecation of constant and variable peptides. Cell 35, 265.

Kappler, J., Roehm, N.,and Marrack, P. 1987. T celi tolerance by clonal elimination in the thymus. Cell 49, 273.

Kasai, M., Iwamori, M., Nagai, Y., Okumura, K. and Tada, T. 1980. A glycolipid on tne surface of mouse natural killer cells. Eur. J. Immuunol. 10, 175.

Katz, D. H., Hamaoka, T., Benacerraf, B. 1973. B. Cell interactions between histocompatible T and B Lymphocytes. Failyte or physiologic cooperative interactions between T and

B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral tesponse to haptenprotein conjugates. J. Exp. Med. 1[illegible]7, 1405.

Kaufman, J.F. and Strominger, J. L. 1983 . The extracelular region oj ligh chains from human and murine MHC class II antigens consist of two domains. J. Immunol. 130, 808.

Kavathas, P., Sukhatme, V. P., Herzenberg, L. A. and Parnes, J. R. 1984. Isolation of the gene encoding for the by gene transfer and cDNA subtraction. Proc. Natl, Acad. Sci. USA. 81, 7688.

Klein G. Inmunology. The Science of self-nonself discrimination. A Wiley Inter-science publication. pp. 623, 1982.

Klein G., Sjogren H. C., Klein E., Hellstrom K. E. 1960 Demostration of resistance against methycholanthrene-induced sarcoma in the primary autochthomus host. Cancer Res. 20, 156..

Kornbluth, J., Spear, B., Ra[illegible]b, S. S., Wilson, D.B. 1985 Evidence for the role of class I and class II HLA antigens in

the lymphocytic function of a cloned line of human natural killer cells. J. Immunol. 4, 529.

Kranz, D. M., Saito, H., Disteche, C. M., Swisshelm, K., Pravtcheva, D., Ruddle, F. H., Eisen, H. N, Tonegawa, S. 1985. Choromosomal locations of the murine T-cell receptor alpha-chain gene and the T-cell ganma gene. Science 227, 941

Lee, N. E., D'Eustachio, P., Pravtcheva, D., Ruddle, F. H., Hedrick, S.M., Davis, M. M. 1987. Murine T cell recptor beta chain is encoded on cromosome 6. J. Exp. Med. 160, 905.

Littman, D. R., Thomas, Y., Maddon, P. J., Chessm L., Axel, R. 1985. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. Cell. 40, 237.

Lopez de Castro, J. A., Strominger, L. L., Strong, D. M., ORR, H. T. 1982. Structure of cross reative human histocompatibility antigens HLA-A28 and HLA-A2:passible implication for generation of HLA polymorphismn. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 3813.

Maddon, P. J., Littman, D. R., Godfrey, M., Maddon, D. E., Chess, L., Axel, R., 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. Cell, 42, 93.

Malissen, M., Minard. K., Mjolsness, S., Kronenberg, M., Goverman, J., Humncapiller, T., Pristowsky, M. B., Yoshikai, Y., Fitch, F., Mak, T. W., Hood L. 1984. Mouse T cell antigen receptor: Structure and organization of constant and joining gene segments encoding the beta polypeptide. Cell 37, 1101.

Martin, E. D., and Benacerraf, B. 1984. Suppressor cells and immunoregulation. Ann. Rev. Immunol. 2, 127.

Marrack, P., Endres, R., Schimon- Kevitz, R., Zlotnik, A., Dialynas, D., Fitch, F. and Kappler, J. 1983. The receptor on T cells, II. Role of the L3T4 product. J. Exp. Med. 158: 1077.

Marrack, P. and Kappler, J. 1988. The T-cell repertoire for antigen and MHC. Immunol. Today. 9, 308.

Marrack, P., Lo, D., Brinster, R., Palmiter, R., Burkly, L., Flavell, R. H. and Kappler,J.1988a. The effect of the thymus

environment on T cell development and tolerance. Cell 53, 627.

Marrack, P., Kushnir, E., Born, W., McDuffie, M., and Kappler, J. 1988. The development of helper T cell precursors in mouse thymus. J. Immunol. 140, 2508.

McDevitt, M. O., Chinitz, A. 1969. Genetic control of antibody response. Relatonship between inmune response and histocompatibility (H-2) type. Science. 163, 1207.

McDevitt, M .O., Tyan, M. L. 1968. Genetic control of the antibody response in imbred mice. Transfer of response by spleen cells and linkage to the major histocompatiblity (H-2) locus. J. Exp. Med. 128, 1.

McDonald, H. B., Blanc, C., Lees, R. K. and Sordat, B. 1986. Abnormal distribution of T cell subsets in athymic mice. J. Immunol, 136, 4337.

Mellor, A. 1986. The class I MHC gene family in mice. Immunology Today 7, 1.

Meuer, S. C., Schlossman, S. F. and Reinherzx, E. L. 1982. Cloral analysis of human cytotoxic T lymphocytes T4 and T8 effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 4395.

Michalson, J. 1981. Genetic polymorphism of 2 microglobulin (2m) maps to the H-3 region of chromosome 2. Immunogenetics 13, 167.

Michaelson, J., Flaherty, L., Puolek, M. D. 1977. Molecular similirities berween the Qa-2 alloantigen and other products of the 17th chromosome of the mouse. J. Exp. Med. 145, 1066.

Mills, C. D. and North, R. J. 1983. Expression of passively transferred immunityñ against an established tumor depends on generation of cytolytic T cells in recipient. Inhibition by suppresor T cells. J. Exp. Med. 157, 1448.

Mizuochi, T., Teotori, L., Sharroq, S. O., Kruisbeek, A. M., and Singer, A. 1988. Differentiation of Ia-reactive CD8+ murine T cells does not require Ia engagemen. Implications for the role of CD4 and CD8 accessory molecules in T cell defferentatiaon. J. Esp. Med. 168, 437.

Morimoto, C., Reinherz, E. L., Borel, Y., Schlossman, S. F. 1983. Direct demonstration of the human suppressor inducer subset by anti-T cell antibodies. J. Immunol 130, 157.

Morrison, L. A.,Lukacher, A. E., Braciale, V. L., Fan, D., Braciale, T. J. 1986. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clon. J. Exp. Med. 163, 903.

Natheson, S. G., Culler, S. E. 1974. Biochemical properties and immunochemical relationships of mouse H-2 alloantigens.Biochem. Biophys. Acta. 344, 1.

North, R. J., and Bursuker, I. 1984. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. J. Exp. Med. vol. 159, 1295.

Oettgen, H., Pettey, C., Maloy, W., Terhorst,C., 1986. A T3-like protein complex associated with an antigen receptor on murine T cells. Nature 320, 272.

Okada, K., Prentice, H. L., Boss, J. M. et al. 1985. SB subregion of the human major histocompatibility complex:Gene organization, allelic polymorphism and expression in transformed cells. EMBO. J. 4, 739.

Ozato, K., Mayer, N. M., and Sachs, D. H. 1982. Monoclonal antibodies to mouse mayor histocompatibility complex antigens. Transplantation. 34, 3.

Ozato, K., Takamashis, H., Apella, E., Sears, D. W., Murre, C., Seidman, J. G., Kimura, S., Tada, N. 1985. Polymorphism of murine major histocompatibility class I antigen: assignment of putativa allodeterminants to distinct position of the aminoacid sequence within the first external domain of the antigen. J. of Immunology. 3, 1749.

Palacios, R., Pelkomen, J. 1988. Prethymic and intrathymic mouse T-cell progenitors. Growth requirements and analysis of the expression or genes encoding TCR/T3 components and other T-cell specific molecules. Immunol. Rev. No. 104, 5.

Patel, S., Wacholtz, M., Duby, A., Thiele, D., and Lipsky, P. 1989. Analysis of the functional capabilities of CD3+ CD4-

CD8- and CD3+ CD4+ CD8+ cell clones. J. of Immunol. 143, 1108.

Patten, P., Yokota, T., Rothbard, J., Chien, Y., Arai, K., Davis, M. M. 1984. Structure, expression and divergence of T-cell receptor beta-chain variable regions. Nature 312, 40.

Paul, W. E. 1984. Immune response genes. En: Paul, W.E., ed. Fundamental Immunology. New YorK: Raven Press. 439.

Perez, M., Garrido, A., Algarra, I., Caballero, A., Delgado, C., Collado, M. D., Fernadez Cruz, E., Garrido, F.1989. H-2 antigens and tumor-associated transplantation antigens in clones derived from a methylcholanthrene-induced BALB/c tumour: Their influence on the generation in vitro and in vivo of the specific anti-tumour immune response . Exp. Clin. Immunogenet. 6, 204.

Pernis, B., Vogel, J. H. 1985. Cell biology of the major histocompatibility complex..1 ed. Orlado: Academic Press Inc. XXI.

Prehn R. T., Main J. M. 1957. Inmunity to methylcholantrene induced-sarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 18, 769.

Pullen, A. M., Marrack, P.L., and Kappler, J. W. 1988. The T-cell repertorie is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. Nature 335, 796.

Raulet, D. H., Garman, R. D., Saito, H., Tonegawa, S. 1985. Developmental regulation of T-cell receptor gene expresion. Nature 314, 103.

Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levey, R. H. and Schlossman, S. F. 1980. Discrete stages of intrathymic differentiatiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T cell linage Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 1588.

Reinherz, E. L. Kung, P. C., Pesando, J. M., Ritz, J., Goldstein, G., Schlossman, S. F. 1979. Ia determinants on human T cell subsets defined by monoclonal antibody: activation stimuli required for expression. J. Exp. Med. 150, 1472.

Reinherz, E. L., and Schlossman, S. F. 1980b. The differentiatiation function of human T cells. Cell 19, 821.

Robinson, P. J., Lundin, L., Sege, K., Graft, L., Wigzell, M., Peterson, P. A. 1981. Location of the mouse 2-microglobulin gene B2m-determined by linkage analysis. Immunogenetics. 14, 449.

Rogozinski, L., Bass, A., Glickman, E., Talle, M. A., Goldstein, G., Wang, J., Chess, L. and Thomas, Y. 1984. The T4 surface antigen is involved in the induction of helper function. J. Immunol. 132, 735.

Roitt I., Brostoff J., Male D. 1985. Inmunology. Gower Medical Publishing. pp 18. 1-18. 16,

Rosenberg, E. B., Heberman, R. B., Lenne, P. H., Halterman, R. H., Mc Coy, Y. L. and Wunderlich, J. R. 1972. Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia associated antigens in identical twins. Int. J. Cancer. 19, 648.

Rosenberg, S. A., and Lotze, M. T. 1986. Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2 activated lymphocytes. Ann. Rev. Immunol. 4, 681.

Rosenstein, M., Eberlein, J. T., and Rosenberg, A. S. 1984.

Adoptive immunotherapy of established syngeneic solid tumors: role of T lymphoid subpopulations. J. of Immun. 132, 2117.

Rosenthal, A. S. (1978). Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response. Immunol. Rev. 40, 136.

Rusch, E., Kvan, W. and Hammerling, G. J. 1983. Target sites for antibodies and citotoxic T lymphocites on H-2molecules. Transplantation. Proc. 15, 2093.

Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C, Eisen, H. N., Tonegawa, S. 1984. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell reeptor dedeuced from cDNA sequences. Nature 309, 757.

Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H. N., Tonegawa, S. 1984. A Third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. Nature 312, 31.

Schmidt, W., Alonso, A., Leben, L., Festenstein, H. 1981. Differential regulation of H-2 antigen expression in tumors and its biologic consequences. Transplant. Proc. 13, 1814.

Schreiber, H., Ward, P. L., Rowley, D. A., and Stauss, H. J. 1988. Unique tumor-specific antigens. Ann. Rev. Immunol. 6, 465.

Scollay, R., Bartlett, P. and Shortman, K. 1984 T cell development in the adult murine thymus: changes in the expression of the surface antigens Ly2, L3T4 and B2A2 during development from early precursor cells to emigrants. Immunol Rev. 82, 79.

Scollay, R., Wilson, A., D'Amico A., Kelly, A., Egerton, M., Pearse, M., Wu, L., and Shortman, K. 1988. Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. Immuno. Rev. 104, 81.

Sevach, E. M., Rosenthal, A. S. 1973. Function of macrophages in antigens recognition by guiness pig T lymphocytes. II Role of the macrophage in the regulation oj genetic control of immune system. J. Exp. Med. 138, 1213.

Sha, W. C., Nelson, C. A., Newberry, R. D., Kranz, D. M., Russell, J. H. and Loh, D. Y. 1988. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. Nature 336, 73.

Shackelford, D. A., Kaufman, J. F., Koran, A. J., Strominger, J. L. 1985. HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulation, gene cloning and function. Immunol. Rev. 66, 133.

Shearer, C. M. 1974. Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes. Eur. J. Immunol. 4, 527.

Silver, J., Ferrone, S. 1979. Structural polymorphism of human DR antigens. Nature. 279, 436.

Siu, G., Kronenberg, M., Strauss, E., Haars, R., Mak, T. W., Hood, L. 1984. The structure, rearrangement and expression of D beta gene segments of the murine T-cell antigen receptor. Nature 311, 344.

Siu, G.,Clark, S. P., Yoshikai, Y., Malissen, M., Yanagi, Y., Strauss, E., Mak, T., Hood, L. 1984b. The human T-cell antigen receptor is encoded by variable, diversity and joining gene segments that rearrange to genrate a complete V gene. Cell 37, 393.

Smith, H. 1987. CD4+ murine T cells develop from CD8+ precursors in vivo. Nature. 326, 798.

Smith, F., Miller, F.A.P. 1979. Delayed type hypersensitivity to allogeneic cells in mice.III. Sensitivity to cell surface antigens coded by the major histocompatibility complex and by other genes. J. Exp. Med. 150, 965.

Snow, P. M., Van de Rijn, M. and Terhorst, C. 1983. Association between the human thymic differentiation antigens T6 and T8. Eur. J. Immunol, (en prensa)

Snow, P. M., and Terhorst, C. 1985. The T8 antigen is a multimeric complex of two distinct subnits on human thymocytes but consists of homomultimeric forms on peripheral blood T lymphocytes. J. Biol. Chem. 258: 14675.

Sprent, J., Lo, D., Gao, E. K. and Ron, Y. 1988. T cell slection in the thymus. Immunol. Rev. 101, 173.

Strominger, J. L., Chess, L., Herrman, H. C., Humphreys, R. E., Halenka, D., Hann, D., McDune, J. M., Parham, P., Robb, R., Springer, T. A., Trehost, C. 1975. Isolation of several B

cell spwecific proteins from cultured human lymphocytes. In: Histocompatibility Testing. pp. 719. Hunksgaard, Copenhagen.

Strominger, J. L., Orr, H. T., Robb, R. J., Parman, P., Ploegt, H. L., Hann, D. L., Bilofsky, M., Saroff, H. A., Wu, T. T., Kabat, E. A. 1980. Homology of amino acids in human histocompatibility antigens (HLA-A and HLA-B) with those in immunoglobulins. Scan. J.Immunology. 11, 573.

Stuarf, F., Schlossman, Chikao. M.,Michel, S., Paul, A.,and Christopher, R. 1990. Surface strctures defining functional T-cell subsets. Leucocyte Typing IV. 1070.

Swain, S. L. 1983. T cell subsets and the recognition of MHC class. Immunol. Rev. 74, 129.

Terhorst, C., van Agthoven, A., Reinherz, E. and Schlossman, S. 1980. Biochemical analysis of human T lymphccyte differentiation antigens T4 and T5. Science 209, 520.

Thomas L. 1959. Reaction to homologous tissue antigens in relation ship to hyperssensitivity " in celular and humoral aspects of hypersensitive states", Lawrence H. S. (ed) Hoeber-Harber, New York. pp. 529-532.

Thomas, Y., Rogozinski, L., Irigoyen, O., Friedman, S. M., Kung, P. C., Goldstein, G. and Chess, L. 1981. Functonal analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. IV induction of suppresor cells Within the OKT4+ population. J. Exp. Med. 154, 459.

Townsend, A. R. M., Bastin, J., Gould, K., Brownlee, G. G. 1986. Cytotoxic T lymphocytes recognise influenza haemagglutinin that lacks a signal sequence. Nature 234, 575.

Townsend, A., Bastin, J., Gould, K., Brownlee, G., Andrew, M., Coupar, B., Boyle, D., Chan, S., Smith, G. 1988. Defective presentation to class I-restricted cytotoxic lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. J. Exp. Med. en prensa.

Unanue, E. R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. Annu. Rev. Immunol. 2, 395.

Urban, J. L., Kumar, V., Kono, D. H.,Gomez, C.,Horvath, S. J., Clayton,J., Ando, D. G., Sercarz, E. E., and Hood, L.1988. Restricted use of T cell receptor V genes in murine

autoimmune encephalomyelitis raises possibbilities for antibody therapy. Cell 54, 577.

Van de Griend, R. J., van Krimpen, B. A., Ronteltap, C. P. M. and Bolhuis, R. L. H. 1984. Rapidly expanded activated human killer cell clones have strong antitumoru cell activity and have the surface phenotype of either T gamma, T-non-gamma or null cells. J. Immunol, 132, 3185.

Vidovic, D., Roglic, M., Mckune, K., Guerder, S., Mackay, C., and Dembic, Z. 1989. Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a ganma/delta T-cell hybridoma. Nature 340, 647.

Vitetta, E. S., Capra, J. D. 1978. The protein products oj the murine 17th chromosome: genetics and structure. Adv. immunol. 26, 147.

Wabuke-Bunoti, M.A.N., Taku, A., Fan, D., Kent, S., Webster, R. G. 1984. Cytolytic T lymphcyte and antibody responses to synthetic peptides of influenza virus hemagglutinin. J. Immunol. 133, 2194.

Wagner, H., Hardt, C., Heeg, K. et al. 1980. T-T cell interactions during cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses: T

cell derived helper factor (IL2) as a probe to analyse CTL responsivenes and thymie maduration or CTL progenitors. Immunol. Rev. 51, 215.

Wilde, D. B., Marrack, P., Kappler, J., Dialinas, D. P., and Fitch, F. W. 1983. Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigens reactivity; monoclonal antibody GK1.5 (anti-L3T4a) blocks class II MHC antigen-specific proliferation, release of lynphokines, and binding by cloned murine helper T lymphocytes lines. J. Immunol. 131, 5.

Wilson, A., D'Amico, A., Ewing, T., Scollay, R. and Shortman, K. 1988. Subpopulation oj esrly thymocytes: A cross-correlation flow-cytometric analysis of adult mouse Lyt2-L3T4-(CD4- CD8-) thymocytes using eight different markers. J. Immunol. en prensa.

Wilson, A., Scollay, R., Reichert, R. A., Butcher, E. C., Weissman, I.L. and Shortman K. (1987). Correlation of lectin-stimulated proliferation and cytotoxicity in murine thymocytes with expression of the MEL-4 defined homing receptor. J.Imunol 138, 352.

Winoto, A., Mjolsness, S., Hood, L. 1985. Genomic organization of the genes encoding mouse T-cell receptor alpha chain. Nature 316, 832.

Yague, J., White, J., Coleclough, C., Kappler, J., Palmer E., Marrack, P. 1985. The T cell receptor: The alpha and Beta chain define idiotypek, and MHC specifity. Cell 42, 81.

Yanagi, Y., Yoshikai, Y.,Leggerr, K., Clark, S. P., Alesander, I., Mak, T. W. 1984. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensivehomology to immunoglobulin chains. Nature 308, 145.

Yokoyama, K., Natheson, S. G. 1983. Intramolecular organizatior of class I H-2 MHC antigens; Localization of the alloantigenic determinants and the beta2m binding site to different regions of the H-2K gliconrotein. J.of Immunology. 3, 1419.

Yoshikai, Y., Klark, S. P., Taylor, S., Sohn, U., Wilson, B., Minden, M., Mak, T. W. 1985. Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T-cell receptor gamma chain. Nature 316, 837.

Zinkernagel, R., Callahan, G., Althage, A., Cooper, S., Klein, P. and Klein, J. 1978. On the thymus in the differentiation of H-2 self-recognition by T cells: Evidence for dual recognition?. J. Exp. Med. 147, 882.

Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. 1974. Restriction of in vitro T-cell mediated cytotoxicity in lymphocyte chorioningitis within a syngeneic or semi-allogenic system. Nature. 248, 701.

Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. 1979. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction, specificity, function, and responsiveness. Avd. Immunol. 27, 52.