

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DIFERENCIAL DE FACTORES
PRESENTES EN SUERO Y FLUIDOS
ASCITICOS DE RATONES PORTADORES
DE TUMOR SOBRE CELULAS LINFOIDES
DE RATON ESTIMULADAS CON LOS
MITOGENOS PHA, ConA, PWM Y LPS.

GONZALO RUEDA LOZANO

R.49.784

- 1 -

EFFECTO DIFERENCIAL DE FACTORES PRESENTES
EN SUERO Y FLUIDOS ASCITICOS DE RATONES
PORTADORES DE TUMOR SOBRE CELULAS LINFOIDES
DE RATON ESTIMULADAS CON LOS MITOGENOS
PHA, ConA, PWM y LPS.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
N.º Documento	614940711
N.º Copia	116198177

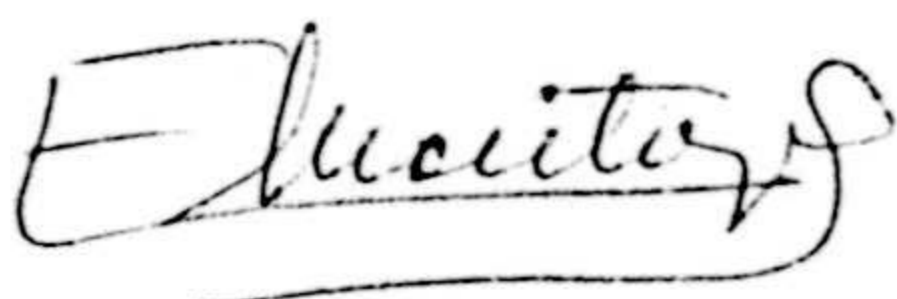
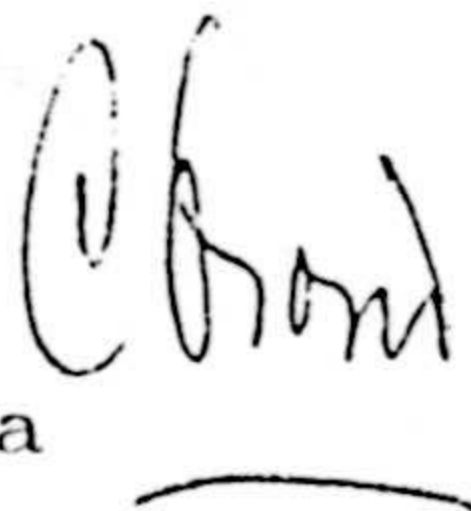


DON CARLOS OSORIO PELAEZ, CATEDRATICO DE FISIOLOGIA GENERAL, QUIMICA BIOLOGICA Y FISIOLOGIA ESPECIAL, Y DON FRANCISCO GUTIERREZ GEA, JEFE DE LA SECCION DE INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA.

CERTIFICAN, que la tesis doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, D. Gonzalo José Rueda Lozano, sobre el Tema "Efecto diferencial de factores presentes en suero y fluidos ascíticos de ratones portadores de tumor sobre células linfoides de ratón estimuladas con los mitógenos PHA, ConA, PWM y LPS", ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los cursos 1977-78, 1978-79 y 1979-80, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas, que le hacen acreedor del título de Doctor siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, 4 de Diciembre de 1980

VºBºPONENTE
D. Enrique Montoya
Gómez.
Catedrático de
Microbiología.



"My father has spanked me, and my mother has spanked me; all my aunts and uncles have spanked me for my insatiable curiosity; and I want to know what the Crocodile has for dinner".

KIPLING. Just So Stories.

A mi esposa e hijo.

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los colaboradores del Departamento de Fisiología, en especial a las Secciones de Inmunología y Estadística, que de una u otra forma, han intervenido en la realización de esta tesis. Doy las gracias especialmente al Prof. Dr. D. Carlos Osorio Pelaez, Director de este Departamento, tanto por su constante ayuda y estimulo como por el hecho de haberme permitido la realización de esta Tesis en su Cátedra; al Dr. D. Francisco Gutierrez Gea por su eficaz dirección en la realización de la misma. Por último mi agradecimiento al Pr.Dr. D. Antonio Martín Andrés por su total y valiosa aportación en el análisis estadístico de esta tesis.

INTRODUCCION

INDICE

	pg.
I.- <u>ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA CELULAR</u>	10
II.- <u>CMAD. DETERMINANTES ANTIGENICOS DE</u> <u>MEMBRANAS CELULARES</u>	23
II.1.- <u>Loci que codifican CMAD de distribu-</u> <u>ción general en los tejidos</u>	24
II.1.1.Loci incluidos en el complejo H-2.....	24
II.1.1.1.Localización y estructura bio- química de los antígenos H-2.....	28
II.1.1.2.Localización cromosómica del complejo H-2.....	32
II.1.1.3.Estructura genética, regiones y loci del complejo H-2.....	32
II.1.2.Loci no incluidos en el complejo H-2..	39
II.2.- <u>Loci que codifican CMAD de distribución</u> <u>tisular restringida</u>	44
II.2.1.Que se expresan en linfocitos y célu- las relacionadas.....	44
II.2.2.Cuya expresión está limitada a la superficie de eritrocitos de ratón....	74
II.2.3.Otros CMAD.....	76
II.3.- <u>CMAD definidos por Xenoantisueros</u>	81
II.4.- <u>Relación entre CMAD y virus de leuce-</u> <u>mias murinas</u>	87

	<u>pg.</u>
II.5.- <u>CMAD en linfocitos humanos</u>	90
II.5.1.CMAD en Linfocitos T.....	90
II.5.2.CMAD en Linfocitos B.....	91
III.- <u>TIPOS CELULARES.</u>	
III.1.- <u>Células T</u>	92
III.1.1.Subpoblaciones de células T en ratón.	93
III.1.2.Subpoblaciones de células T en el hombre.....	117
III.1.3.Ontogenia de las células T.....	118
III.2.- <u>Células B.</u>	133
III.2.1.Ontogenia y diferenciación de las células B.....	133
III.3.- <u>Sistema Mononuclear fagocítico</u>	141
III.4.- <u>Células inflamatorias</u>	146
III.5.- <u>Células Nulas</u>	148
IV.- <u>RECEPTORES.</u>	151
IV.1.- <u>Reconocimiento y comunicación interce- lular</u>	151
IV.2.- <u>Localización y concepto de receptor</u>	156
IV.3.- <u>Especificidad del Discriminador</u>	158

IV.4.- <u>Modelos que explican la estereoespecificidad de la unión Ligando-Discriminador</u>	159
IV.5.- <u>Cambios en la membrana celular tras la interacción Ligando-Discriminador</u>	161
IV.6.- <u>Activación de una función celular, inducida por la Unión Ligando-Discriminador</u>	162
IV.6.1. <u>Respuesta celular rápida a la interacción Ligando-Discriminador</u>	164
IV.6.2. <u>Respuesta celular a largo plazo tras la interacción Ligando-Discriminador</u>	167
V.- <u>TIPOS DE RECEPTORES.</u>	
V.1.- <u>Receptores Fc</u>	168
V.2.- <u>Receptores de Eritrocitos</u>	179
V.3.- <u>Receptores para complemento</u>	181
V.4.- <u>Receptores para antígeno en Linfocitos B.</u>	186
V.5.- <u>Receptores para antígeno en células T.</u>	187
V.6.- <u>Receptores beta-adrenérgicos</u>	188

	Pag.
VI.- <u>TRANSFORMACION DE LINFOCITOS</u>	190
VI.1.- <u>Ciclo celular y transformación de linfocitos</u>	196
VII.- <u>LECTINAS</u>	212
VII.1.-PHA.....	217
VII.2.-ConA.....	221
VII.3.-PWM.....	228
VII.4.-LPS.....	229
VII.5.-Otras Lectinas y mitógenos policlonales	229
VIII.- <u>INMUNIDAD CELULAR</u>	
VIII.1.- <u>Fases en su desarrollo</u>	232
VIII.2.- <u>Factores solubles implicados en la regulación de la actividad inmune de las células T</u>	247

I.- ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA CELULAR.

El modelo universalmente aceptado es el denominado "MOSAICO FLUIDO", propuesto originalmente por SINGER Y NICOLSON (1972). Modelo válido para cualquier tipo de membranas celulares (citoplasmática, mitocondrial membrana del cloroplasto...). Su principal diferencia con los modelos propuestos anteriormente (estructura trilaminar de Davson-Danielli, modelo de la membrana unidad de Robertson, o incluso los denominados modelos micelares, que tuvieron un enorme desarrollo en la década de los sesenta, el primero de los cuales fue propuesto por PARPART y BALLENTINE (1952)), reside en el hecho de que la membrana deja de ser una superficie de separación de medios con una actividad relativamente pasiva.

Se reconoce, desde el nacimiento de este modelo que la membrana es una estructura dinámica y que interviene en procesos de enorme importancia para la actividad normal de la célula..

Según este modelo:

I.1.- La matriz de la membrana está constituida por fosfolípidos (fosfatidil-etanolamina y otros) y colesterol.

Estos componentes anfipáticos, se disponen formando una doble capa (EDIDIN, 1974), con la porción polar dispuesta hacia el medio acuoso (exterior celular o citoplasma), mientras que la porción apolar constituye el medio interno de la membrana. Esta disposición permite la difusión lateral. (Ver figs. I.1 y I.2).

La difusión, depende de la temperatura y del tipo de ácidos grasos presentes en la membrana.

Los Fosfolípidos de las membranas celulares en poiquilotermos presentan una mayor proporción de ácidos grasos insaturados (punto de fusión mas bajo que el ácido graso saturado del mismo número de átomos de carbono). Este hecho, les permite una buena fluidez en su membrana a temperaturas relativamente bajas.

En mamíferos, la proporción de ácidos grasos insaturados es menor. En estos, frente a determinados estímulos, la proporción de ácidos grasos saturados disminuye, aumentando por tanto la fluidez de la membrana para una temperatura determinada.

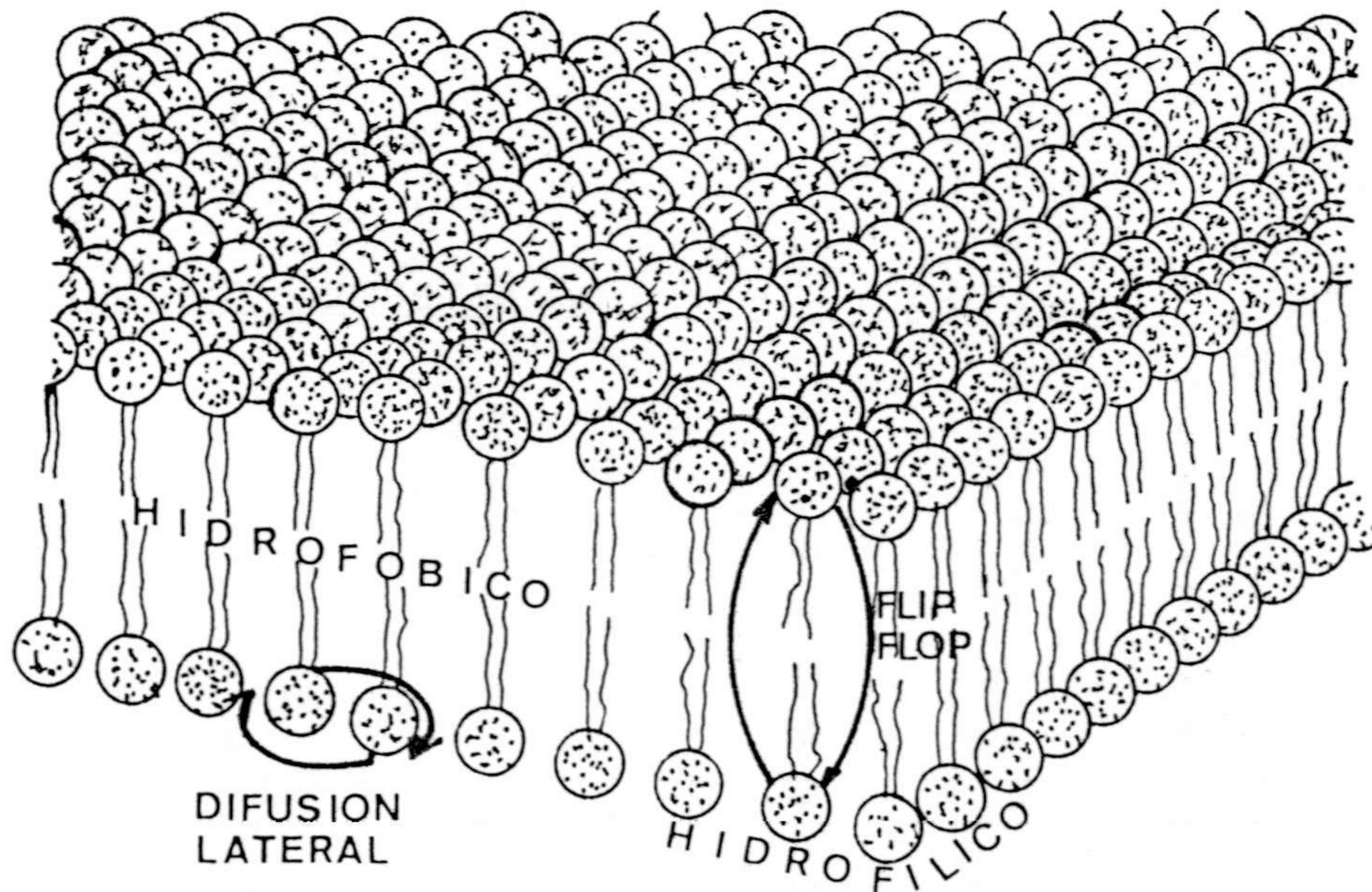


Fig. I.1.- Representa la doble capa de fosfolípidos que constituye la base de la membrana celular. Las porciones esféricas, representan la porción polar del fosfolípido, el resto la parte apolar. En el interior de la membrana celular se localizan las porciones apolares. Se indica en el esquema el grado de libertad de las moléculas. Mientras que la difusión lateral es muy frecuente, la difusión vertical (flip-flop) es muy rara.

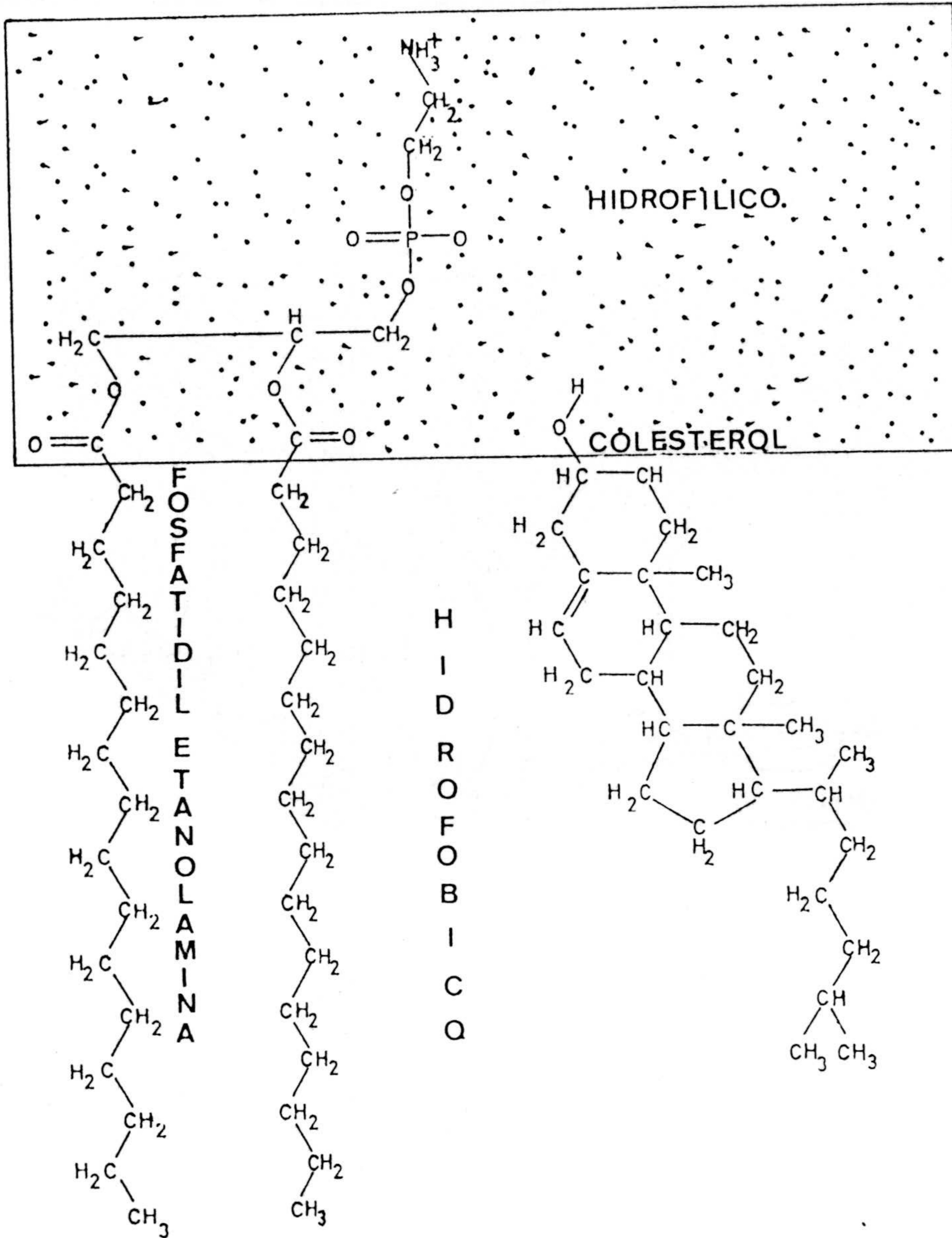


Fig. I.2.- La posición real de una molécula de fosfatidil etanolamina y de otra de colesterol en la membrana celular, es la indicada en la figura. La zona punteada corresponde a la zona polar de la membrana.

I.2.- En la matriz fosfolipídica, se disponen las proteínas (y glicoproteínas) constitutivas, embebidas en ella asimétricamente, ya que poseen orientaciones de mayor probabilidad. Estas, son el reflejo del estado de menor energía libre del sistema.

Las moléculas proteicas, también son anfipáticas, con porciones polares y apolares. En la fig. I.3 se representa una porción de membrana celular

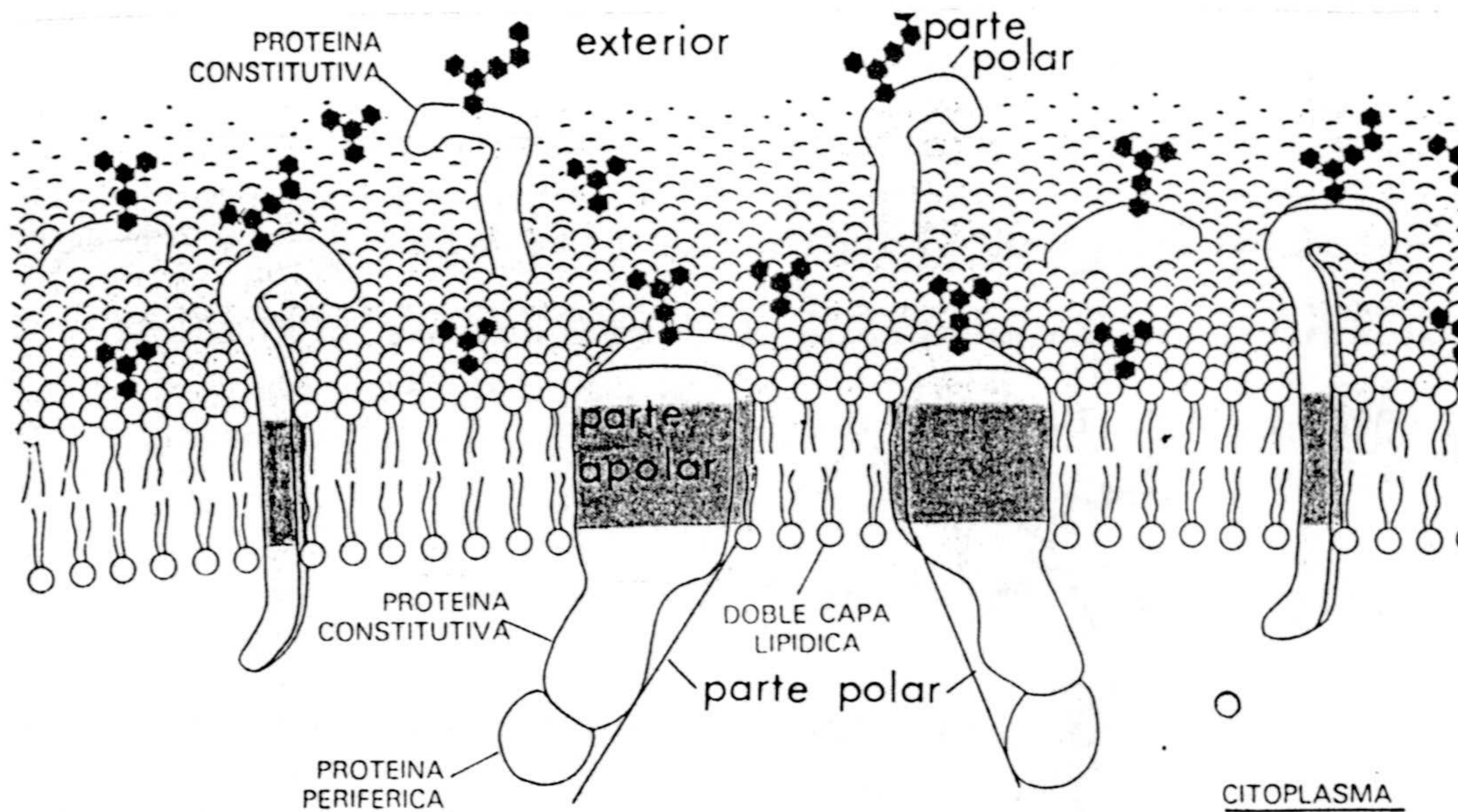


Fig. I.3.- Sección de membrana celular, con los componentes de la misma.

Aunque las proteínas poseen capacidad para desplazarse lateralmente, por su naturaleza anfipática, quedan "ancladas" (mostrando al exterior siempre la misma porción de la molécula) no existiendo "flip-flop" durante sus desplazamientos laterales.

Algunas de estas moléculas proteicas se han localizado por microscopía electrónica como partículas intramembranas de 70-80 $\overset{\circ}{\text{A}}$ de diámetro; el número y la disposición de estas partículas cambia con el ciclo celular. Suelen poseer una disposición en α -hélice con el extremo aminoterminal orientado hacia el medio externo celular. Una proteína de este tipo es la Glicoforina descrita en la membrana de eritrocitos (MARCHESI y col., 1972). Fig. I.4.

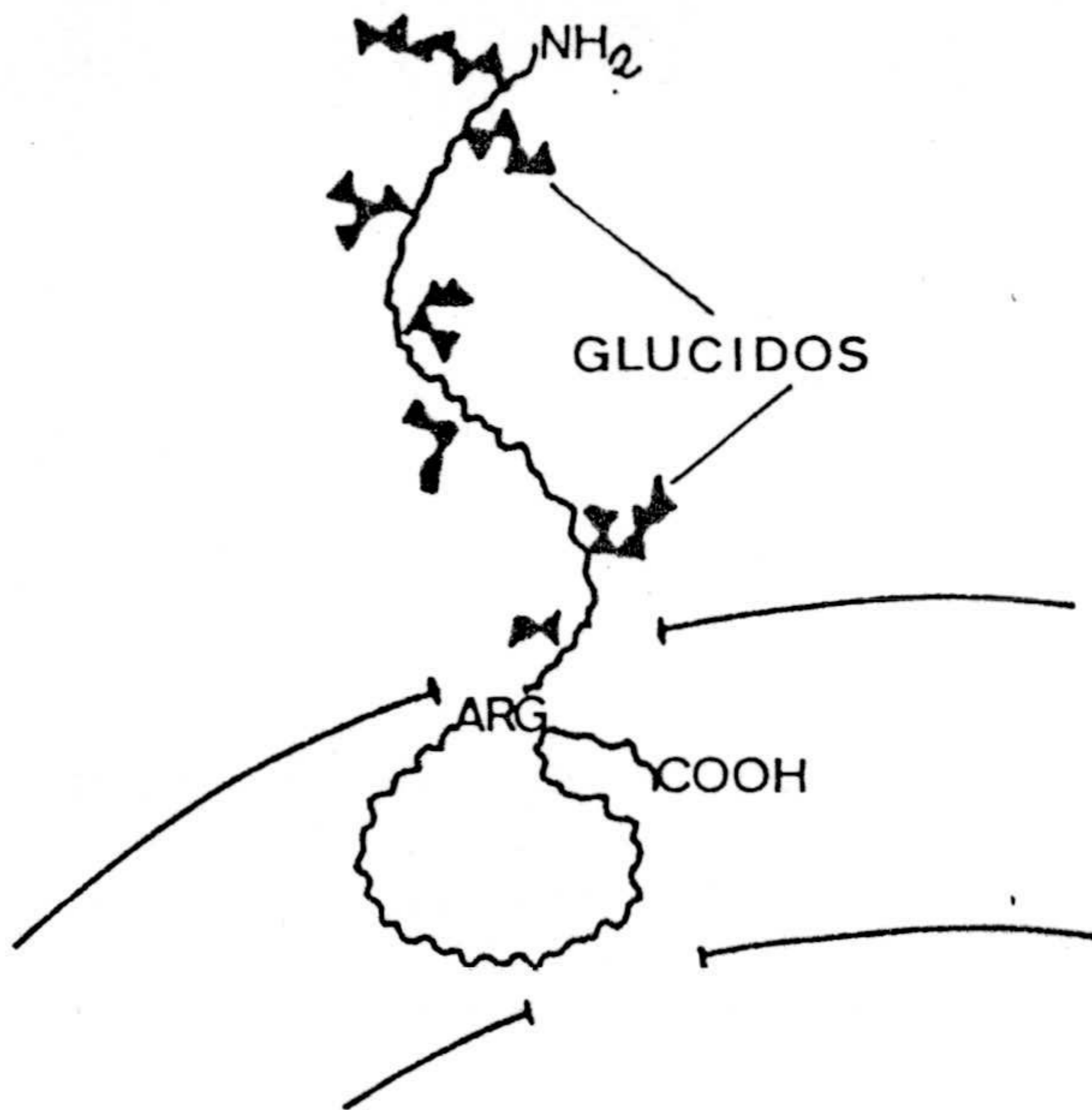


Fig.I.4.- Localización de la Glicoforina en la membrana del eritrocito.

Además de fosfolípidos y proteínas en las membranas, existen moléculas de glúcidos (ver fig.I.3) unidos bien a proteínas (glicoproteínas) bien a lípidos (glicolípidos), pero siempre en la superficie externa de la membrana. Algunos de estos glúcidos, han sido identificados como los sitios de unión de las lectinas y como las moléculas que determinan la especificidad de algunos grupos sanguíneos.

I.3.- La digestión de las membranas con enzimas proteolíticos y la solubilización con detergentes, permite:

a) Definir dos tipos de proteínas presentes en la membrana celular (Fig.I.3).

Proteínas periféricas: Pueden aislarse de la membrana con tratamientos suaves, incluso variando la fuerza iónica del medio. Aunque se han descrito en la superficie externa, generalmente se localizan en la superficie citoplasmática de la membrana. En ambos casos siempre van unidas a proteínas constitutivas.

Proteínas constitutivas: Para su aislamiento es necesario el tratamiento drástico de la membrana con disolventes orgánicos o con detergentes . (Fig.I.5)

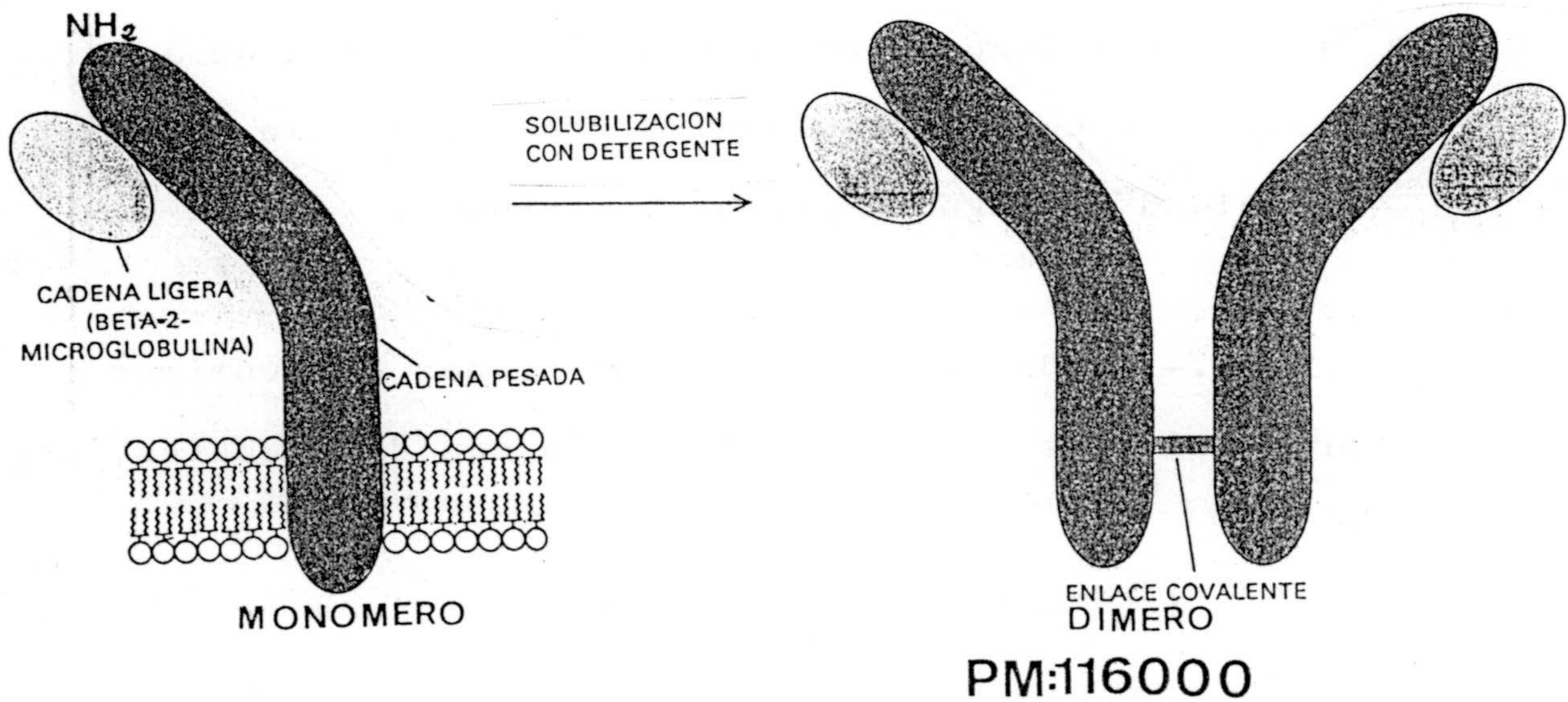


Fig.L.5.- A) Posición de los antígenos H-2 en la membrana de células de ratón. Es un ejemplo de proteína constitutiva.

B) La solubilización con detergente permite separar moléculas H-2 en forma de dím_{er}o.

b) Determinar la naturaleza asimétrica de la membrana. Asimetría que no se mantiene si las membranas se solubilizan con detergente y posteriormente se elimina éste dejando que se autoensamblen. (fig.I.6)

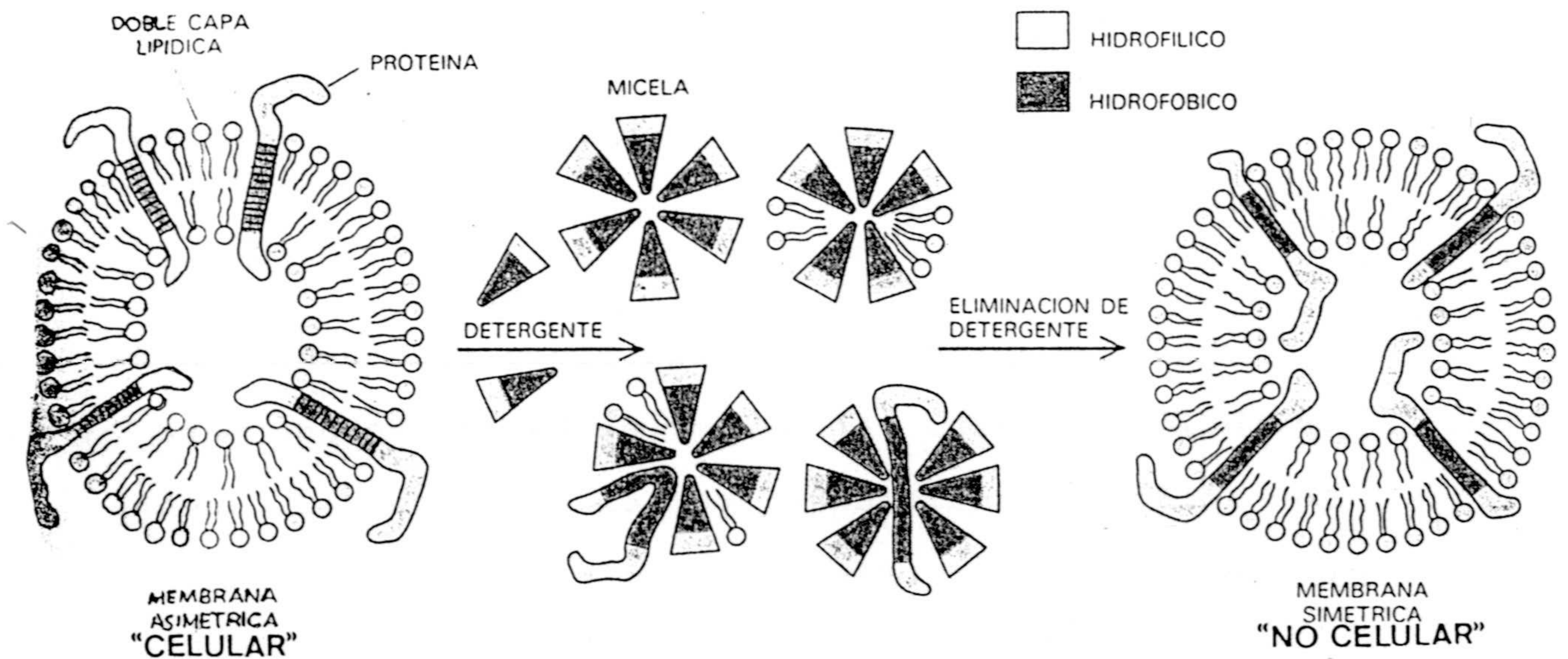


Fig.I.6.- A) Membrana celular esquemática, manifestando su carácter asimétrico.

B) El tratamiento con detergente da lugar a micelas de naturaleza diversa.

C) La eliminación del detergente, permite el autoensamblaje de las micelas, pero se forman membranas simétricas. Pierden por tanto, su característica de membrana celular.

Las moléculas proteicas responsables de la asimetría de las membranas celulares, denominadas proteínas constitutivas, determinan las características an tigénicas de las células (Ver localización de los an tígenos H-2, Fig.I.5), también son responsables de la especificidad de los receptores celulares para li gandos extracelulares; mientras que las proteínas periféricas poseen actividad enzimática sobre sustra tos intracelulares.

I.4.- Los antígenos de superficie presentan una dis tribución al azar. Al menos, se ha comprobado para los antígenos codificados por el complejo H-2, inmu no globulinas de superficie...

La distribución al azar, se ha puesto de ma nifiesto, empleando anticuerpos marcados con Fluoresceína y microscopía electrónica. FRYE y EDIDEN, (1970) demostraron lo mismo, empleando hibridomas; para ello hibridaron células de ratón con células humanas utili zando Virus Sendai (puede también emplearse glutaraldehído para conseguir la hibridación). En el hibrido ma resultante, los marcadores de membrana de la célula de ratón y de la célula humana, se mantenían separados. Sin embargo, aproximadamente a los cuarenta

minutos de realizada la hibridación, los marcadores de ambas células se distribuían por la superficie del hibridoma al azar, por difusión lateral. La difusión era dependiente de la temperatura, pero independiente de la síntesis de proteínas y/o de ATP.

Cuando la membrana se somete a estímulos como la unión de Anticuerpos específicos, la membrana responde redistribuyendo los antígenos y agrupándolos en casquetes "capping". Este proceso, es inhibido por colchicina y citocalasina B (compuestos que desorganizan las estructuras fibrilares de las células). Esto último, sugiere que el "capping" puede estar regulado por estructuras contráctiles citoplasmáticas. El proceso de "capping", sí es dependiente del metabolismo celular.

La distribución en casquetes es característica de la mayor parte de los antígenos de membrana y de las glicoproteínas donde se unen las lectinas.

En ocasiones, para que el capping exista, es necesario el empleo de un segundo ligando, como un anti-anticuerpo que ya estaba unido a la membrana. Esto confirma, que para un "capping" adecuado, las moléculas de membrana tienen que aproximarse. El puente de unión entre esas moléculas, lo establece el anti-

cuerpo o la lectina. Por consiguiente, la lectina o el anticuerpo al menos deben ser divalentes para poder permitir un capping efectivo.

I.5.- De acuerdo con todo lo anterior, la membrana celular viene caracterizada por presentar:

-Difusión lateral. Característica tanto de las moléculas de fosfolípidos como de las proteicas, con unas constantes de difusión muy semejantes para ambos tipos de moléculas (EDIDIN, 1974).

-"Flip-flop", muy poco frecuente para fosfolípidos y prácticamente nulo para proteínas. La tasa de "flip-flop" se mantiene en niveles ínfimos por la naturaleza anfipática de las moléculas constituyentes de la membrana.

-Distribución asimétrica, de fosfolípidos y proteínas, que se disponen para que el sistema posea el estado de menor energía libre.

-Distribución al azar de las moléculas constituyentes.

-Respuestas a estímulos, la membrana tiene la capacidad de responder, en principio, reordenando sus moléculas ante determinados estímulos.

-Las estructuras necesarias para conferirle sus características particulares y permitirle reconocer los cambios producidos en su medio externo.

II.- CMAD. DETERMINANTES ANTIGENICOS DE MEMBRANAS
CELULARES.

El caracter inmunogénico de las células, radica en determinadas agrupaciones moleculares localizadas en la membrana celular, llamadas determinantes antigénicos. Todas las células poseen CMAD

Algunas de estas agrupaciones moleculares poseen una función inmune conocida en la actualidad y solo están presentes en determinadas subpoblaciones celulares. Sin embargo existen otros muchos CMAD con una función no bien conocida.

Tanto en un caso como en otro, su conocimiento representa la fase inicial en el estudio de cualquier proceso inmune mediado por células.

En la actualidad, los CMAD mejor conocidos son los que están presentes en las células de ratón y que a continuación vamos a describir.

II.1.- Loci que codifican CMAD de distribución general en los tejidos.

II.1.1.- Loci de distribución general includos en Complejo principal de histocompatibilidad del ratón (H-2).-

Comienza su investigación GORER (1936) en ratones congénicos C57BL y A. Detectó inicialmente dos antígenos, el Antígeno I, común a las cepas C57BL y A, y el Antígeno II que era exclusivo de la cepa A. Ambas fueron detectados con heteroantisueros obtenidos en conejos.

GORER,(1937) observó que los ratones C57BL rechazaban un tumor originado en la cepa A, mientras que el tumor no era rechazado en otras cepas que presentaban el antígeno II. No obstante, el suero de los ratones que habían rechazado el tumor (ratones C57BL), aglutinaban los hematíes de razas que expresaban antígeno II. Con lo que se detectó el antígeno II empleando aloantisueros. Aceptándose definitivamente su función comoantígeno de histocompatibilidad. Por esto se le denominó H-2 (antígeno 2 de histocompatibilidad) (GORER y col.,1948).

Posteriormente (ALLEN, 1955), realizando trasplantes de tumores entre cepas endogámicas, encontró que el sistema H-2 es un complejo sistema de alelos múltiples; cada uno de los cuales fue representado por distintas letras: H-2^a, H-2^b, H-2^k...

Por inmunización de cepas endogámicas entre sí se obtuvieron aloantisueros, que reconocían, mediante técnicas de absorción, varios antígenos, algunos de los cuales son comunes entre cepas con distinto H-2 (AMOS y col., 1955; HOECKER y col., 1954).

Los distintos antígenos H-2, se designan por números: H-2,35; H-2,19...

Hay antígenos H-2 que aparecen solo en cepas con un determinado haplotipo y se denominan antígenos H-2 privados. Todas las cepas con idéntico haplotipo poseen los mismos antígenos privados (HOECKER y col., 1954).

También hay antígenos H-2 que se encuentran en varias cepas de ratón con distintos haplotipos, se denominaron antígenos H-2 públicos (KLEIN., 1971a). Un mismo antígeno público puede, por tanto, encontrar

se en la membrana de células de ratones de distintos haplotipos. Ver Cuadro II.1.

Los CMAD codificados por el complejo H-2, tanto públicos como privados son expresados generalmente por las células de todos los tejidos (EDIDIN.,1972) desde el séptimo día de gestación.

Como hemos dicho anteriormente los antígenos H-2 fueron identificados mediante dos técnicas diferentes: Transplantes y aloantisueros. Por consiguiente, se planteó el hecho de que pudieran o no definir los mismos antígenos ambas técnicas.

Actualmente se ha comprobado que son los mismos, ya que aparecen anticuerpos en el rechazo de transplantes dirigidos frente a antígenos definidos serológicamente, y esos Anticuerpos pueden ser empleados para facilitar el rechazo de transplantes de piel (SHREFFLER y DAVID., 1975).

CUADRO, II.1.- Región H-2. Especificidades definidas en las distintas cepas.

RAZA	H-2 HAPLOTIPO	H-2K	H-2D	ESPECIFICIDADES			
				Privadas			Públicas
				H-2K	H-2D		
B10 C57BL/6	H-2 ^b	b	b	33	2	5,6,14,27,28,29,35, 36,39,46,53,54,56.	
B10A AJAx	H-2 ^a	k	d	23	4	1,3,5,6,8,10,11,13 14,24,25,27,28,29, 35,36,40,41,42,43, 44,45,47,49,52.	
B10D2 DBA/2 Balb/c	H-2 ^d	d	d	31	4	3,6,8,10,13,14,27, 28,29,34,35,36,40, 41,42,43,44,46,47,49.	
B10HTT	H-2 ^{t3}	s	d	19	4	1,3,5,6,13,27,28, 29,35,36,41,42,43, 44.	
CBA B10BR AKR C3H	H-2 ^k	k	k	23	32	1,3,5,8,11,24,25, 45,47,52.	

II.1.1.1.- Localización y estructura bioquímica de los antígenos H-2.-

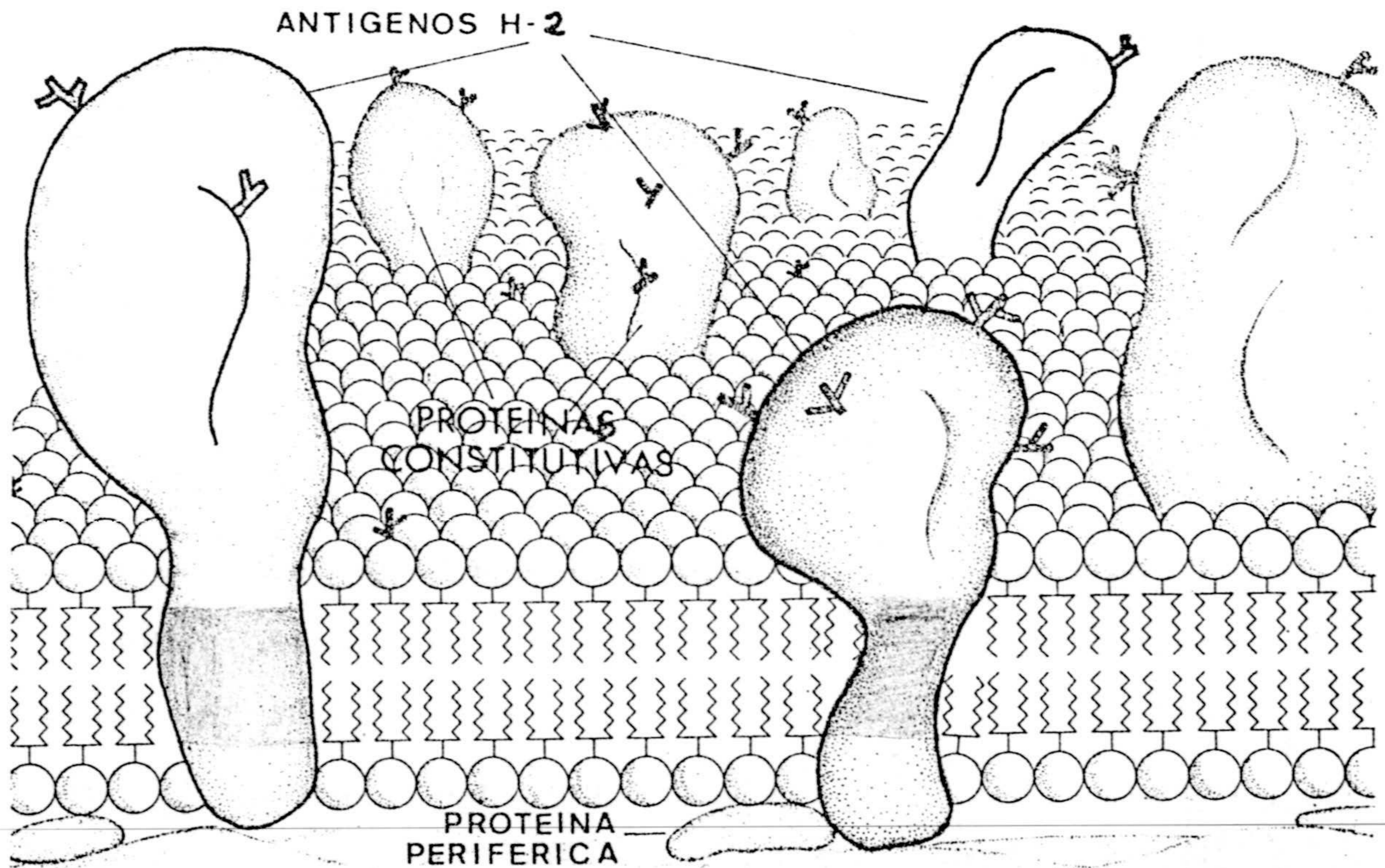


Fig. II.1.- Esquema de la membrana celular, mostrando la localización de los antígenos H-2 en la misma.

Los H-2, se localizan en la membrana celular

embedidos en la misma junto con otras proteínas constitutivas (Fig.II.1). Una parte de la molécula puede alcanzar el interior celular e interaccionar con proteínas periféricas o citoplasmáticas. La otra parte de la molécula está en contacto con el medio externo.

Cuando se separan las moléculas H-2 de la membrana mediante la solubilización con SDS, se comprueba que son dímeros con un Pm de 116000 (fig.I.5 pg.17). Contienen de uno a dos polisacáridos, de los cuales el mas pequeño posee un Pm:3500. Los polisacáridos fundamentalmente contienen Galactosa, Manosa, Glucosamina, Glucosa y ácido siálico. Además de los dímeros descritos, las moléculas H-2 aisladas pueden encontrarse en forma monomérica. Cada uno de los monómeros, está constituido por una cadena pesada (Pm aproximado 46000) y una cadena ligera (Pm aproximado 12000).

La cadena ligera, es una β -2-microglobulina (Pm=11600) con una estructura constante dentro de cada especie. Esta molécula, fue aislada por BERGGARD y BEARN (1968), de pacientes con enfermedad de Wilson. En el hombre es codificada por el cromosoma 15.

En ratón no se tiene certeza de que sea codificada por el cromosoma 17. Posiblemente actúe como una "cadena ligera" a semejanza de las cadenas ligeras de las Inmunoglobulinas. Puede fijar el complemento y es posible un origen común para las β -2-microglobulinas e inmunoglobulinas. Se localizan en membranas asociado tanto a antígenos H-2 (VITETTA y col., 1975a) como con antígenos no H-2 (MICHAELSON y col., 1978). En ratón se ha aislado de membranas de células hepáticas tratadas con tiocianato sódico (APPELLA y col., 1976a). Su coeficiente de sedimentación vale 1.65S, posee 100 aminoácidos y un radio de Stokes de $16 \overset{\circ}{\text{A}}$. Estructuralmente no se dispone en forma de α -hélice (VITETTA y CAPRA., 1978). Su secuencia coincide con la región constante de Inmunoglobulinas, (PETERSON y col., 1972).

La expresión de esta molécula, al menos en las líneas Raji y Molt-4 (DORVAL y col., 1979) disminuye después de la infección con virus del Herpes simple (HSV). Su función parece ser compleja, ya que el empleo de anti β -2-microglobulina de conejo anti-humana, estimula la síntesis de ADN, y la secreción de



Inmunoglobulinas en los Linfocitos B (RUIGDEN y MOLLER., 1975). Aunque se cree que las verdaderas células diana de esta anti- β -2-microglobulina son las células T, que cooperarán con las B en la producción de Anticuerpos (KIN y col., 1979).

La cadena pesada, es la portadora de las especificidades H-2 privadas y públicas. Cada cadena expresa una especificidad privada y varias especificidades públicas. En ratones homocigóticos, hay dos tipos de cadenas pesadas con distinta especificidad privada. En ratones heterocigóticos, pueden existir cuatro tipos de cadenas pesadas diferenciables por las distintas especificidades privadas expresadas (CULLEN y col., 1972).

De acuerdo con EWESTEIN y col., (1976), puede afirmarse que la porción aminoterminal de esta cadena, se localiza en la superficie externa de la membrana (Fig. I.5), mientras que la porción carboxiterminal está situada en el interior de la membrana.

II.1.1.2.- Localización cromosómica del complejo H-2.-

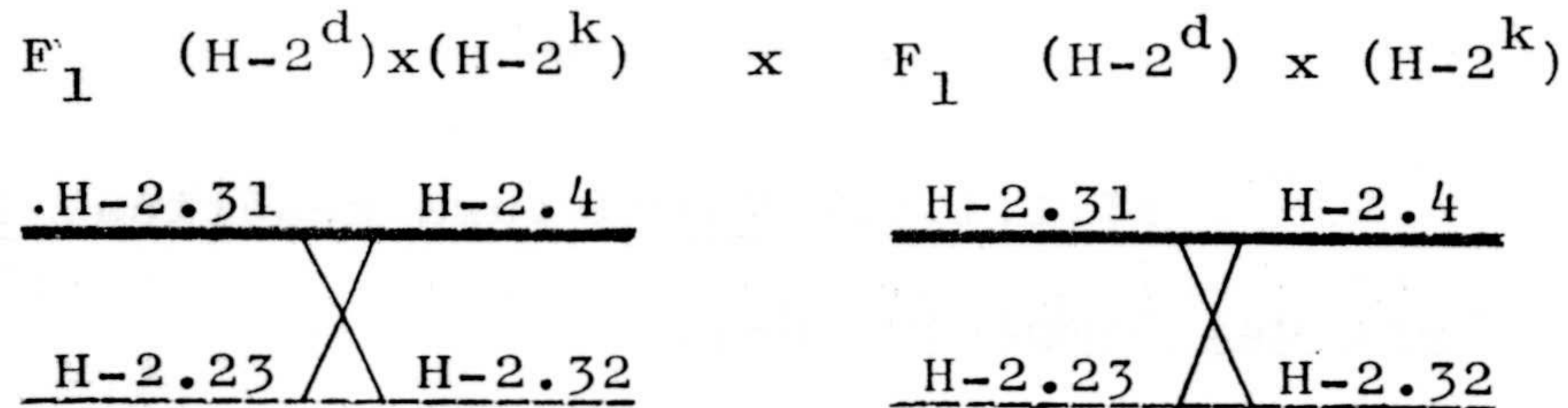
Este complejo sistema de loci, fue incluido por GORER y col, (1948) en el IX grupo de ligamiento del ratón. Actualmente, se conoce que está situado en el cromosoma 17 del ratón, La localización de este complejo en ese cromosoma, fue realizada por KLEIN (1971b).

II.1.1.3.- Estructura genética, Regiones y Loci del Complejo H-2.-

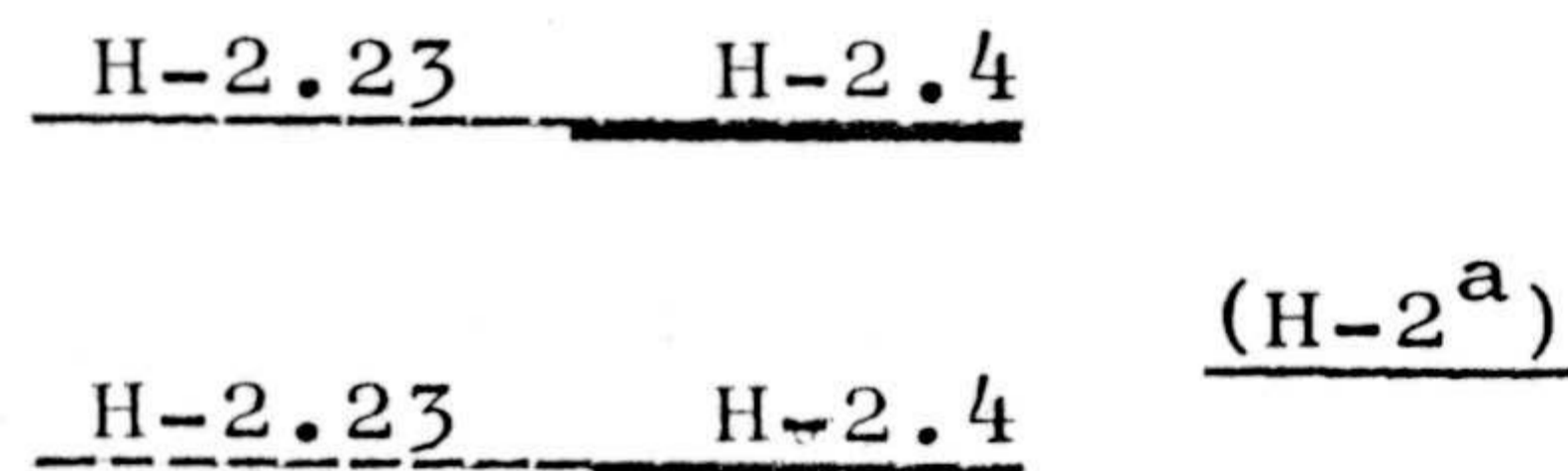
La complejidad de la región cromosómica encargada de la codificación de los antígenos H-2, era manifiesta desde el principio de su estudio. En primer lugar, los antígenos H-2 manifestaban un gran polimorfismo, y en segundo lugar, algunos tumores crecían, inesperadamente, en cepas que no debían hacerlo.

Uno de estos crecimientos inesperados de tumores, fue observado por GORER (1959). Este investigador observó, que tumores H-2^a, crecían, en ocasiones, al inyectarlos en individuos híbridos F1 del cruce H-2^d x H-2^k. Este crecimiento inesperado se explicó suponiendo que la cepa H-2^a con especificidades privadas

H-2.23 y H-2.4, era el resultado de un entrecruzamiento entre H-2^d (especificidades privadas H-2.31 y H-2.4) y H-2^k (especificidades privadas H-2.23 y H-2.32). Al hecho de que el haplotipo H-2^a esté constituido por los H-2^k y H-2^d, se le denominó "Efecto dk". La cepa H-2^a, se produciría en un cruce de este tipo:



La fecundación casual entre gametos portadores de "crossing-over" como están descritos en el esquema, daría lugar a individuos de haplotipo H-2^a:



Se descubrieron por tanto, dos regiones cromosómicas, dentro del complejo H-2, que pueden recombinarse. Estas regiones codifican las especificidades privadas H-2, denominándose respectivamente región

K y región D. Aunque inicialmente se propuso un modo multilocus para explicar el control genético de los antígenos H-2, la explicación de este "efecto dk", el aislamiento de sólo dos polipéptidos en las membranas de células murinas, portadores de las especificidades privadas, y el hecho de que estos polipéptidos dan reacciones cruzadas entre sí, permiten afirmar (SHREFFLER y col., 1971) que los antígenos H-2, son codificados exclusivamente por dos loci, locus H-2K y locus H-2D.

Cada uno de estos loci, codifica uno de los dos tipos de cadenas pesadas presentes en la membrana celular, siendo responsable de una especificidad privada H-2 y de varias especificidades públicas.

Estos dos loci, se encuentran a una distancia de 0.5cM en el cromosoma 17 del ratón. Asimismo, estos loci, codifican los productos responsables del rechazo (KLEIN., 1972).

Sin embargo, dentro del complejo H-2, se han definido otros loci. En su detección se han utilizado básicamente dos tipos de técnicas, experiencias de

recombinación y selección de mutantes.

a) Loci situados en el complejo H-2 y detectados por experiencias de recombinación. Son los ya citados H-2K y H-2D y otros como H-2S, H-2IA, H-2IJ, H-2IB, H-2IC, H-2G.

-Loci H-2K y H-2D, equivalen a los loci HLA-A y HLA-B en hombre. Aunque poseen una distribución tisular general, su expresión cuantitativa varía en los diferentes órganos. En sentido decreciente se expresan en: Bazo, nódulos linfáticos, hígado, timo, adrenes, glándula salivar, eritrocitos, testículos, músculo esquelético, sistema nervioso (KLEIN., 1975).

Estos loci codifican productos que intervienen en la activación de linfocitos en MLR, en la diferenciación de células T "killer", y en el reconocimiento de los propios antígenos modificados (reconociendo células singénicas infestadas por virus o modificadas químicamente (DOHERTY y col., 1976 ; FORMAN., 1975).

Es interesante que los productos codificados por los loci H-2K y H-2D, poseen del 25 al 50% de sus pépti-

dos comunes (NATHENSON y CULLEN.,1974), haciendo suponer un origen común a partir de un gen ancestral para estos dos genes. Ese origen común se amplía actualmente a todos los loci incluidos en el complejo H-2.

-Locus H-2S: (Fig.II.2). Codifica una proteína, SS, identificada como el componente C₄ del complemento. Otros componentes del complemento, C₁, C₂ y C₃, parecen estar relacionados con esta región. Lo que sí es evidente, es la estrecha relación existente entre este locus (aunque posteriores estudios podrían definirlo como una región mas compleja) y los componentes del complemento.

-Locus H-2G: (fig.II.2). Codifica la especificidad H-2.7. Esta especificidad se expresa en hematíes de ratón, podría ser equivalente a los grupos sanguíneos Rodgers o Chido en hombre, (DAVID y col.,1975). Sin embargo, la especificidad H-2.7, también se ha puesto de manifiesto en linfocitos utilizando absorciones (McKENZIE y PORTER., 1979), mostrando una distribución mas general de la esperada en principio.

La función de este locus en histocompatibilidad, aún no está aclarada.

-Loci H-2IA, H-2IB, H-2IJ, H-2IC. (Fig.II.2). Los estudiaremos como Loci que codifican CMAD de distribución tisular restringida.

b) Loci localizados en el complejo H-2 y definidos mediante la selección de mutantes. De ellos, se han asignado a un cromosoma concreto, el locus Z1, definido en mutantes C57BL/6H-2K^b y el locus H-2L; no habiéndose cartografiado aún otros loci definidos por mutaciones como: H-2^{bm}, H-2^{bo}, H-2^{da}, H-2^{dd}.

-Locus H-2L. (Fig.II.2). Codifica las especificidades H-2.64 y H-2.65, ambas públicas, encontradas en linfocitos, no habiéndose eliminado aún la posibilidad de que codifique alguna especificidad privada. Este locus se ha demostrado en mutantes H-2^{db}, (McKENZIE y POTTER., 1979).

Fig.II.2.- Localización del complejo H-2 en el cromosoma 17 del ratón y estructura de este complejo.

REGIONES	K	I				S	G	L	D
SUBREGIONES		I-A	I-B	I-J	I-C				
Antígenos detectados serológicamente	H-2	Ia		Ia	Ia	SS Slp	H-2.7	H-2	H-2
Locus de histocompatibilidad.	H-2K	H-2 I-A			H-2. I-C			H-2. L	H-2 D
Regulación de la Respuesta Inmune	?	Ir			Ir				
Regulación de los niveles séricos de complemento						+			

II.1.2.- Loci de histocompatibilidad de distribución general no incluidos en el MHC(H-2).

El estudio exhaustivo en los últimos cuarenta años del control genético de la histocompatibilidad, además del conocimiento detallado del complejo H-2, ha permitido la descripción e identificación de otros numerosos loci de histocompatibilidad no incluidos en el MHC. Unos se han identificado en razas congénicas, H-1, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12 y H-39; otros por recombinación entre líneas congénicas, H-1, H-2, H-3, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-13, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-32, H-34, H-35, H-36, H-37 y H-38; algunos van ligados al sexo, bien al cromosoma X (H-X) bien al cromosoma Y (H-Y). El resto de estos loci de histocompatibilidad, se han demostrado bien en razas congénicas no histocompatibles (H(T1a), H-31, H-32, H(Ly-1), H(Ly-2-N8), H(Ly-2-N16), H(Ly-2, Ly-3), H(Ea-2) o en mutantes, mediante injertos de piel o por estar asociados a otros marcadores como H(Eh), H(ep), H(go).

El caracter común a todos estos loci es el de poseer la información necesaria para codificar productos responsables de las reacciones de histocompatibilidad, como el rechazo de injertos de piel. Parecen desempeñar una función accesoria, pues el rechazo controlado exclusivamente por estos loci se desarrolla en periodos de tiempo variables, de 15 a 300 días de efectuado el transplante. Pero, si se efectúa un transplante entre cepas que difieran en su dotación H-2, la existencia de diferencias accesorias en los loci que estamos describiendo, condiciona que el rechazo se produzca en un menor periodo de tiempo.

Además de su función accesoria del MHC, los productos codificados por estos loci de histocompatibilidad, son incapaces de inducir la producción de Anticuerpos citotóxicos, tanto en rechazo de injertos como en inmunizaciones múltiples. Esta ausencia de anticuerpos citotóxicos podría estar relacionada con una ausencia similar observada al efectuar inmunizaciones entre razas congénicas que difieren en determinadas especificidades Ly.

Puesto que los loci descritos se han definido en un fondo genético de C57BL/10, la ausencia de producción de Anticuerpos citotóxicos, podría ser debida a la incapacidad de ese fondo genético común para producirlos. Sin embargo, algunos anticuerpos, obtenidos en inmunizaciones entre razas que difieren en loci no H-2, incapacos de ser detectados por técnicas de citotoxicidad o de hemaglutinación, sí poseen capacidad para neutralizar tumores; detectándose su presencia por esta particularidad (WINN y col., 1958).

A semejanza de los loci incluidos en el MHC (H-2), estos loci no H-2, pueden presentar numerosos alelos (para el locus H-3 se han descrito al menos seis alelos) y manifiestan una variación tisular en su expresión cuantitativa (H-17 y H-26, se expresan mas intensamente en piel que en médula ósea, por el contrario, el locus H-12, determina un antígeno mas intensamente expresado en médula ósea que en piel).

La variabilidad de estos loci no H-2, afecta igualmente a su localización cromosómica (Tabla II.2)

<u>LOCUS NO H-2</u>	<u>CROMOSOMA</u>
H-1	7
H-22	7
H-24	7
H-3	2
H-7	9
H-15	4
H-16	4
H-18	4
H-20	4
H-21	4
H-19	8
H-29	8
H-27	5

Tabla. II.2.- Localización cromosómica de varios loci de histocompatibilidad no H-2.

Uno de estos loci, no H-2, aunque estrechamente asociado con el locus H-2D, es el denominado locus Hh-1, se caracteriza por no cumplir las leyes clásicas de transplante, cuando se realizan trasplantes de médula ósea, Fig.II.3. Las células responsables de estos rechazos de injertos de médula ósea inesperados, se caracterizan por ser resistentes a la radiación por lo que podría esperarse que fuesen células NK.

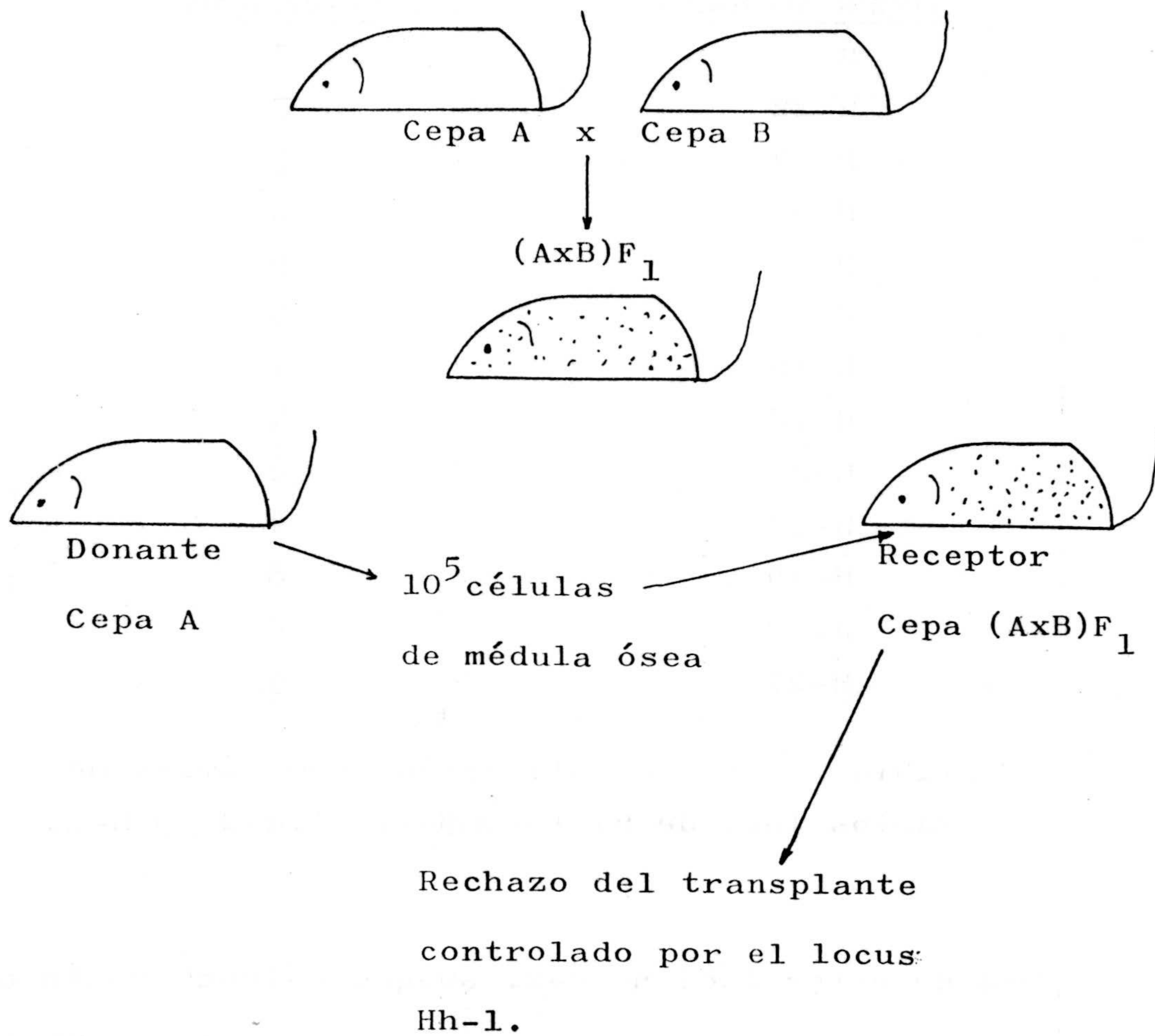


Fig.II.3.-Rechazo de un transplante de médula ósea inesperado y controlado por el locus Hh-1.(SHEARER y col.,1977).Sin embargo, el tratamiento del receptor con suero de C3H anti B10BR (que posee anticuerpos anti Ly-1.2, Ly-2.2 , Ly-4.2 , Ly-6.2 y T1a) inhibe el rechazo (GREGORY y col., 1972).

II.2.- Loci que codifican CMAD de distribución tisular restringida.

Son diversos los criterios que podemos emplear para sistematizar su estudio, pero aquí, los describiremos, agrupándolos de acuerdo con los tipos celulares en los que se expresan. En este apartado veremos aquellos loci que se expresan predominantemente, en unas determinadas líneas celulares o en unos determinados tejidos, independientemente de que estén o no incluidos en el complejo H-2 del ratón.

II.2.1.- Loci que codifican CMAD, que se expresan predominantemente en linfocitos y células relacionadas.

-Locus Thy-1. Este locus está situado en el cromosoma 9 del ratón, próximo al locus Mod 1. Codifica el aloantígeno Thy-1, que fue el primero identificado con una distribución tisular restringida a los timocitos, siendo un marcador exclusivo de las células T. Se emplea, por tanto, en la identificación de estas células T. Es posible, sin embargo, que no todas las células T lo expresen; al menos la subclase Ly $1^+2^+3^+$ parece ser

resistente al tratamiento con anti-Thy-1 y complemento (EARDLEY y col., 1978).

Para este locus, se han descrito dos alelos Thy-1^a y Thy-1^b, los cuales codifican las especificidades Thy-1.1 y Thy-1.2 respectivamente. Especificidades que se han definido de acuerdo con el siguiente protocolo de inmunizaciones:

Especificidad detectada por el suero del receptor.	Loci en que difieren Donante y Receptor		
	Donante	Receptor	
Thy-1.1	AKR	C3H	Ly-1, Ly-3, Ly-6, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-7, ALA-1, LyM-1, Lyb-6.
Thy-1.2	AAL.Thy1 ^a	(B10AxA.AL)F ₁	Ninguno
	A Thy-1 ^a	(C57BL/6xA)F ₁	Ninguno
	C3H	AKR	Ly-1, Ly-3, Ly-6, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-7, ALA-1, LyM-1.

La molécula responsable de estas especificidades, es una glicoproteína de P_m=19000; localizándose dichas especificidades exclusivamente en la fracción proteica.

La función o funciones de este locus, no están muy aclaradas aún. Se sabe que la expresión de Thy-1, está relacionada con el grado de madurez del timocito:

Protimocito	Timocito	Timocito	Célula T
	--> Inmaduro -->	Maduro -->	madura
Thy-1 ⁻	Thy-1 ⁺⁺⁺⁺	Thy-1 ⁺⁺	Thy-1 ⁺⁺

No expresándose en Protimocitos, alcanzando un máximo de expresión en los Timocitos inmaduros, y decreciendo en Timocitos maduros y Células T. A pesar de esto, no hay una relación clara entre expresión de Thy-1, y una determinada función inmune. Es posible que intervenga en las interacciones célula-célula (WILLIAN y col., 1976).

Es probable, incluso, de acuerdo con los resultados obtenidos por JOHN y col., (1972), en injertos de piel de donantes A-Thy-1^a sobre una misma cepa receptora, que exista un locus de histocompatibilidad asociado a Thy-1 o bien que este locus funcione como locus de histocompatibilidad. Ya que estos resultados muestran una clara disociación entre producción de anticuerpos anti-Thy-1 y rechazo de injertos. Concretamente el 73% de los ratones transplantados forman anticuerpos anti-Thy-1, mientras que solo el 10% originaban rechazo del injerto de piel.

Al menos la especificidad Thy-1.1, no parece ser exclusiva del ratón, pues en rata (DOUGLAS.,1972), se ha descrito una especificidad muy similar a esta, pero con una distribución tisular mas general (al menos se expresa en el 40% de las células de médula ósea de rata).

-Locus Tla. Fue descrito en 1963. (OLD y col.,1963). Está situado en el cromosoma 17, a 1.5 cM del locus H-2D. Las especificidades definidas por este locus, se denominan TL, y se manifiestan en linfocitos periféricos fundamentalmente.

Aunque inicialmente descrito como un locus simple, hoy se sabe que es una región o complejo Tla, pues en él, se han identificado los loci: Qa-1, Qa-3, H-31, y H-32 (FLAHERTY y col., 1978) y un gen Ir que controla la respuesta inmune frente a la molécula de ferritina (YOUNG y col., 1976)

Para este locus, se han descrito, cuatro alelos y cinco especificidades:

<u>Cepa murina</u>	<u>Alelo</u>	<u>Especificidad</u>
A	T1a ^a	TL-1,2,3,5
C57BL/6	T1a ^b	TL-0
BALB/c	T1a ^c	TL-2
<u>A.CA</u>	<u>T1a^d</u>	<u>TL-1,2,3</u>

La quinta especificidad, no indicada en la tabla superior, TL-4, solo aparece en células tumorales. Células que por otra parte, tienen la capacidad potencial de expresar todas las demás especificidades TL descritas, aunque no las exprese la cepa original donde se indujo o apareció espontáneamente el tumor. Una desrepresión similar a la descrita para el sistema TL, e inducida por la transformación neoplásica, ha sido descrita también en el sistema H-2.

En la detección de estas especificidades, se emplean sueros obtenidos por inmunizaciones de acuerdo con el siguiente protocolo:

Especificidad Detectada con el Suero del Receptor.	Receptor	Donante	Cepa empleada para la absorción del suero
TL-1,2,3,5 + Qa-1	(A.T1a ^b xC57BL/6) F ₁	ASL1	-----
TL-1,3,5	"	"	Balb/c(TL-2)
TL-5	"	"	A.CA(TL-1,2,3).
TL-3,5	"	"	ERLD(TL-1,2,4).
TL-4	B6.TLa ^a	ERLD	-----
TL-5 y H-2.35	(B10A(2R)xA.CA)F ₁	B10	B6 ó Balb/c

Químicamente, poseen una estructura muy similar a los antígenos H-2. Estos antígenos TL, existen como tetrámeros con un Pm total de 120.000. Esos tetrámeros están constituidos por dos cadenas pesadas unidas entre sí por puentes disulfuro y dos moléculas de β -2-microglogulina (PETERSON y col., 1976). Estas semejanzas, permiten suponer que varios de los productos del cromosoma 17 del ratón: H-2, T1a, Qa, y T/t, se originaron por duplicaciones de un gen ancestral. Explicando esto

el que esos productos posean funciones inmunes muy relacionadas.

La expresión de los antígenos TL en sentido estricto, está limitada a timocitos y algunas células leucémicas, no apareciendo en médula ósea ni en linfocitos periféricos.

La existencia de genes reguladores para los antígenos de superficie que controlan la expresión de genes estructurales, ha sido el mecanismo propuesto para explicar la "modulación antigénica" demostrada para estos antígenos al menos en dos sistemas:

a) En leucemias. Se ha visto que razas TL^{-} , pueden desarrollar leucemias TL^{+} (OLD y col., 1973). Incluso razas TL^{+} con unas determinadas especificidades, pueden desarrollar leucemias con especificidades diferentes.

b) En ratones normales. El tratamiento de cepas TL^{+} con anticuerpos anti-TL, inhibe la expresión de los antígenos TL en esas cepas (BOYSE y col., 1967). Esta modulación antigénica, ocurre tanto "in vivo" como "in vitro".

Como última característica de estos antígenos TL, es su capacidad de formar casquetes tras el tratamiento con Fab de anticuerpos anti-TL (LAMM y col., 1968).

Incluidos en el complejo Tla, se ha descrito la existencia de loci de Histocompatibilidad, pues transplantes de piel entre cepas que solo difieren en la zona Tla, son rechazados, sin que se sinteticen anticuerpos anti-TL (BOYSE y col.,1972). Se conocen dos loci: H-31 y H-32, que están separados del locus Tla, pero formando parte del mismo complejo. Ambos loci, son exclusivamente los responsables del rechazo (FLAHERTY y WACHTEL.,1975) y no el Tla como anteriormente se pensaba.

La identificación de estos loci H-31 y H-32, se ha realizado en ratones donde ha existido "crossing-over" entre H-2D y Tla.

-Locus Qa-1. Descubierta por STANTON y BOYSE (1976).

Está localizado dentro del complejo Tla, muy próximo al locus Tla en el cromosoma 17 del ratón y en la parte derecha de H-2D. (Fig.II.2)

Su distribución tisular es muy interesante, ya que la especificidad Qa-1, se expresa en el 60% de las células Ly^+ de bazo y en una pequeña parte de las células $Ly^+ 1^+ 2^+ 3^+$. Por esta circunstancia, se utiliza

como marcador específico para diferenciar subclases dentro de ambas poblaciones (CANTOR y col., 1978). Una prueba mas de que un suero anti-Qa-1 puede diferenciar subtipos celulares, consiste en el tratamiento de linfocitos estimulados con mitógenos con antisuero anti-Qa-1.

Si los linfocitos tratados con este antisuero son estimulados con PHA, no se produce ninguna transformación de los mismos. Sin embargo un tratamiento similar con antisuero en linfocitos estimulados por ConA, da lugar solo, a la reducción de la transformación blástica en un 40%. Por último, si los linfocitos tratados con anti-Qa-1, son estimulados con LPS, dan una respuesta totalmente normal.

Del empleo de mitógenos descrito anteriormente, se deduce:

a) Las células que expresan Qa-1, fundamentalmente son linfocitos T. Debido a la ausencia de efecto del antisuero, anti-Qa-1, sobre linfocitos estimulados con LPS.

b) Dentro de las células T, el antígeno Qa-1, no se expresa uniformemente, sino de una forma diferencial en determinadas subpoblaciones.

Los antisueros anti-TL, contienen con bastante frecuencia, anticuerpos anti-Qa. Por esta razón, se han empleado esos mismos antisueros anti-TL, para la identificación de las especificidades Qa. Concretamente para el locus Qa-1, solo se ha definido una especificidad.

La función asignada a este antígeno Qa-1, es la de intervenir como diana en CML (KLEIN.,1978).

-Loci Qa-2 y Qa-3.

La especificidad Qa-2, fue descrita inicialmente por FLAHERTY (1976), que también describió por primera vez la especificidad Qa-3 (FLAHERTY y col.,1978). Ambas especificidades se encontraron en un antisuero de B6.K1 anti B6. Cada uno de estos loci, define una sola especificidad, pero presentan una distribución tisular diferente. La especificidad Qa-2, se expresa en células T de Timo, médula ósea, ganglios, bazo, y en un pequeño porcentaje de células con IgM de superficie, por el contrario, la especificidad Qa-3, solo se expresa en una subpoblación de linfocitos T periféricos.

También se diferencian en su localización cro

mosómica, mientras que el locus Qa-2, se incluye dentro del complejo T1a, Qa-3, no se ha localizado próximo a Qa-2.

El estudio bioquímico de estos antígenos, ha mostrado, que al menos el antígeno Qa-2, posee una estructura semejante a la de los antígenos H-2 y TL, estando asociado a moléculas de β -2- microglobulina. Sin embargo, los antígenos Qa-2, forman casquetes independientes de los formados por los antígenos H-2 y los TL. Podemos deducir de esta formación de "cap" independientes que Qa-2, H-2 y TL realmente son moléculas diferentes, aunque con numerosas semejanzas estructurales.

La especificidad Qa-2, funciona como diana en CML (FORMAN y FLAHERTY.,1978). El tratamiento con mitógenos ha sido útil para identificar las poblaciones celulares que expresan Qa-2 y Qa-3, pues el tratamiento con suero anti-Qa-2 y anti-Qa-3, inhibe la respuesta a ConA y PHA, pero no tiene efecto en la respuesta de esos linfocitos tratados al estimularlos con LPS; indicando estos datos que tanto Qa-2 como Qa-3 se expresan fundamentalmente en la superficie de linfocitos T.

El empleo de anticuerpos monoclonales, está permitiendo la descripción de otros loci Qa.

-SISTEMA Ly

Representa un complejo sistema antigénico, presente en la superficie de linfocitos fundamentalmente y que en los tres o cuatro últimos años ha permitido la identificación en ratón de numerosas subpoblaciones celulares.

En este sistema se han definido una serie de loci, describiéndose la localización cromosómica de ellos, marcadores próximos, su expresión en los distintos tejidos, loci de histocompatibilidad asociados, peso molecular de la estructura antigénica...

Este sistema, se ha dividido en dos subsistemas, dependiendo de que estos antígenos se expresen en los linfocitos T (Sistema Lyt) o en los linfocitos B (Sistema Lyb).

Un resumen de todos estos datos, viene descrito en la Tabla II.3

Locus	Especificidad	Cromosoma	Marcadores proximos	IMUNIZACIONES PARA PRODUCCION DE AN ANTISUEROS		OTROS LOCI EN LOS QUE DIFIEREN DONANTE Y RECEPTOR	DISTRIBUCION DEL SISTEMA Lyt y Lyb EN ALGUNOS TEJIDOS.	LOCI DE HISTOCOMPATIBILIDAD ASOCIADOS AL SISTEMA Lyt y Lyb	PESO MOLECULAR DE LA MOLECULA PORTADORA
				CEPA RECEPTORA	CEPA DONANTE				
Ly-1	Ly-1.1	19	Ruby-eye (ru)	C57BL/6	SL2	H-2, Tla, Ly-2, Ly-7, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-7	95%timo;65%ganglios; 40%Bazo;5%medula ósea	Posee un loci asociado próximo pero separado de Ly-1	67.000
	Ly-1.2			(C57BL/10xLP.R111)F1 (C57BL/6 xBALB/c)F1 DBA/2 C3H/An	B6.Ly-1 ^a B6.Lyt-1.1 EL4 CE	Nil Nil H-2, Tla, Ly2, Ly-4, Ly-7, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-7 Lyb-2, Lyb-4			
Ly-2	Ly-2.1	6	Ldr-1, mi, Ly-3	C57BL/6 B10.BR	K36 CE	-H-2, Thy-1, Ly-3, Ly-4, Ly-7 Lyb-2, LyM-1 -Ly-4, Ly-6, Ly-7, Lyb-2, Lyb-5, Lyb-7, LyM-1 -Nil	95%Timo; De 2 a 35% en ganglios; De 2 a 35% en Bazo; 5% en médula ósea.	No están bien identificados los posibles loci.	35.000
	Ly-2.2			(B10.AKMx129)F1 (C3HxI) (C3HxBDP)F1 (C3H/AnxB16.Ly-2.1)F1	B6.PL(75NS) EL4 B10BR C57BL/6	-H-2, Ly-1, Ly-4, Ly-6, Ly-7, Ly-8, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-7, LyM-1, ALA-1 -Ly-4, Ly-8, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-7, LyM-1 -Nil			
Ly-3	Ly-3.1	6	Peptido I _B Ly-2	(CBA x SJL)F1 (C3H xSJL)	C58 C58	-Ly-7 -Ly-7, Lyb-2	95%Timo; 30%Ganglios; 20%Bazo; 5%medula ósea	No están bien identificados los posibles loci.	35.000
	Ly-3.2			C58	CE	-Ly-6, Ly-7, Lyb-2, ALA-1			
Ly-4 (Lyb-1)	Ly-4.1	2	H-3	B10.A	A	-Ly-6, Ly-7, Ly-8, LyM-1, ALA-1 -Ly-7	10%timo; 30%ganglios; 60%bazo; 35%medula ósea.		N.D.
	Ly-4.2			(Balb/c x SWR)F1	B10.D2				
Ly-5 (Ly-4)	Ly-5.1	?	?	SJL	A.SW	-Ly-6, Ly-8, Lyb-2, ALA-1 -Ly-6, Ly-8, Lyb-2, ALA-1	95%timo; 45%ganglios; 30%bazo; 10%medula ósea		130.000
	Ly-5.2			(DA xSJL)F1 (B6.H-2 ^k xA.SW)F1 (SWR x A.SW)F1	A.SW SJL SJL	-Lyb-2 -Lyb-2			

Ly-6	Ly-6.1	?	?	(C3H.B6 x C57BL/6)F ₁	C3H	-Nil	10%Timo;70%ganglios;	
	Ly-6.2			(BALB/c x A)F ₁	CXBD	-Ly-7	25%bazo;15%medula	
				(CXBG x A)F ₁	CXBE	-Nil	osea.	
				(CBA x A.Thy1 ^a)F ₁	AKR	-Ly-3, Ly-8, ALA-1		
Ly-7	Ly-7.2	?	?	(B6.C-H-2 ^d x CXBG)F ₁	CXBK	-Nil	80%ganglios;80%Bazo	
Ly-8	Ly-8.1	?	?	AKR	C3H	-Thy-1, Ly-1, Ly-3, Ly-6, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-7, LyM-1, ALA-1	15%timo;65%ganglios; 45%bazo;	
	Ly-8.2	?	?	C3H	AKR	-Thy-1, Ly-1, Ly-3, Ly-6, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-7, LyM-1 ALA-1		
Ly-2	Lyb-2.1	4	LPS, Lyb-4, Mup Lyb-6	C3H	I.29	-?	5%Timo;35%ganglios 60%Bazo;40%medula osea.	45.000
	Lyb-2.2			(SJM x CE)F ₁	A.SW	-Nil		
	Lyb-2.3			(C3H/AN x BALB/c)F ₁	CE	-Nil		
Ly-3		?	?	(CBA/N Q ^x x BALB/cO)	BALB/c	-Nil		68.000
Ly-4	Lyb-4.1	4	Mls, Dip-1, Lyb-2, Lyb-6, Mup, LPS	C57BL/Ks	L1210	-Ly-1, Ly-2, Ly-4, Ly-7, Lyb-2, Lyb-5, Lyb-7	5%Timo;35%ganglios; 45%bazo;5%medula osea.	44.000
Ly-5	Lyb-5.1	?	?	C57BL/6	DBA/2	-H-2, Tla, Ly-1, Ly-2, Ly-4, Ly-7, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-7.		
	Lyb-5.2	?	?	DBA/2	C57BL/6	-H-2, Tla, Ly-1, Ly-2, Ly-4, Ly-7, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-7		
Ly-6		4	Lyb-2, LPS, Lyb-6 Mup	CBA/N	CBA/J	-Nil		45.000
Ly-7	Lyb-7.1	7	?	C57BL/6	DBA/2	-H-2, Tla, Ly-1, Ly-2, Ly-4, Ly-7, Lyb-2, Lyb-4, Lyb-5,		
Ly-1	LyM-1.2	1	Mls, Dip-1	C ₃ H/HeJ	CBA/J	-Lyb-2, Lyb-5, Lyb-7	30%ganglios, 70%Bazo;75% medula osea.	

-Locus Ly-1 (Lyt-1).

Ha sido el primer sistema antigénico descrito específico de linfocitos (BOYSE y col., 1968). Codifica este locus el antígeno Ly, y se conocen dos alelos del mismo: Ly-1^a y Ly-1^b, que codifican respectivamente las especificidades Ly-1.1 y Ly-1.2. La especificidad mejor caracterizada bioquímicamente es la Ly-1.1, de naturaleza glicoproteica y con un Peso molecular de 67.000 (DURDA y col., 1978). Ambas especificidades son exclusivas de las células T, sin embargo no todas las células T son Ly-1⁺, razón por la cual se emplean como marcador diferencial de las distintas subpoblaciones de células T. No se conoce con certeza su función inmune.

-Loci Ly-2 y Ly-3 (Lyt-2 y Lyt-3)

Su denominación original fue la de loci Ly-B y Ly-C respectivamente (BOYSE y col., 1968; BOYSE y col 1971). Parece ser que estos aloantígenos funcionan como estructuras diana en CML (ROLLINGHOFF y col., 1977). Se emplean en la identificación de una subpoblación de células T Ly1⁻2⁺3⁺, que representan el 5% aproximadamente de las células T periféricas; considerándose como células T supresoras de la síntesis de anticuerpos, una subpoblación de estas células Ly1⁻2⁺3⁺ caracterizadas

por expresar antígenos Ia en su superficie. Por el contrario, otra subpoblación de células $Ly1^{-}2^{+}3^{+}$, Ia^{-} son consideradas como células killer efectoras en CML.

Por último, aunque se supone la existencia de loci de histocompatibilidad asociados a Ly-2 y Ly-3, su localización e identificación, aún no se conoce.

-Locus Ly-4 (Lyb-1)

Su identificación como locus del cromosoma 2 y ligado al locus H-3, fue realizada por SNELL y col.,(1973).

Se trata de una especificidad característica de las células B, pero no exclusiva de ellas, ya que la poseen un pequeño porcentaje de células T. Es característico, el hecho de que aunque las células B normalmente poseen esta especificidad, no suele aparecer en las células formadoras de anticuerpos (McKENZIE y col.,1975).

De nuevo, el empleo de los mitógenos, concretamente PHA, ConA y LPS, ha servido para identificar como células $Ly-4^{-}$, aquellas que responden a PHA y ConA, mientras que son $Ly-4^{+}$, las que responden a LPS y PWM (McKENZIE y PLATE., 1974), confirmando que este CMAD es prácticamente exclusivo de las células B.

-Locus Ly-5 (Lyt-4)

A pesar de que este locus lleva descrito unos cinco años (KOMURO y col., 1975), aún no se conoce su localización cromosómica. Sí se sabe, que se manifiesta en células T colaboradoras, en las células T-Killer y en células que responden a mitógenos (WOODY y col., 1977). Poseyendo una expresión mas temprana que Ly-1, Ly-2 ó Ly-3, ya que se expresa en protimocitos que aún no manifiestan esos marcadores citados.

-Locus Ly-6 (Lyt-5)

La especificidad inicialmente definida para este locus fue Ly-6.2. Aunque no se conoce su localización cromosómica, sí se sabe que no está ligado a los loci: H-2, Ly-1, Ly-2, Ly-3, Ly-4, Ly-5 ó Ly-7. Se ha relacionado esta especificidad con algún componente de virus MuLV, aunque el antisuero anti Ly-6, se absorbe con la misma efectividad por tejidos infectados por virus que por tejidos sin infectar.

La investigación de su distribución tisular, ha permitido conocer que aparece solo en el 50%-60% de las células T (WOODY y col., 1977) y en las células

"killer" activadas, no en sus células precursoras. También se ha encontrado, que la especificidad Ly-6, se expresa en otros tipos celulares como: células T colaboradoras, células T supresoras de la síntesis de Anticuerpos, células supresoras de la hipersensibilidad de tipo retardado, células formadoras de placas IgM, células que se estimulan con PHA, ConA, PWM, ó LPS, y blastos producidos por PHA, ConA y LPS.

-Locus Ly-7.

Parece corresponder a una especificidad expresada tanto en células T como en células B (Tabla II.3).

-Locus Ly-8.

La especificidad Ly.8.2, se definió por un Anticuerpo presente en un suero empleado para definir otra especificidad Thy-1.1. Parece ser que Ly-8 está presente en una fracción de células T y B. (Tabla II.3).

-Locus ALA-1.

Este locus codifica el denominado antígeno 1

de linfocitos activados, pero no es general de linfocitos activados; solo aparece en linfocitos T ó B periféricos activados, no en blastos derivados de timocitos (FREENEY y HAMMERLING.,1976). Se han definido dos especificidades codificadas por este locus:

ALA-1.1: definida por un antisuero obtenido por inmunización de C58(ALA-2) con C3H(ALA-1). En el suero de C58, está presente un anticuerpo que reconoce la especificidad ALA-1.1.

ALA-1.2: definida por la inmunización inversa a la descrita para la obtención de anticuerpos anti-ALA-1.1, es decir inmunizando C3H con C58.

Para la obtención de ambos antisueros, la inmunización hay que efectuarla con blastos cultivados con PHA durante 24 horas.

Actualmente se piensa que el antígeno ALA-1 y Ly-6, presentan enormes semejanzas y podrían ser incluso el mismo antígeno.

-Locus LyM-1 (Relación con locus Mls)

La especificidad LyM-1, se definió por inmuni

zación de C3H/HeJ con CBA/J. Además estas cepas poseen un común haplotipo H-2 (H-2^k) y un origen común, pero al enfrentarlas en MLR, dan una buena respuesta. Parce ser que se está detectando el mismo locus, aunque inicialmente se pensó que el MLR, se debe a productos del locus Mls (locus menor para la estimulación de los linfocitos) y que la producción de anticuerpos citotóxicos es debida a productos de otro locus LyM-1. Ambos supuestos locus, segregan siempre juntos no habiéndose encontrado recombinantes entre ellos. Hoy se piensa, que las relaciones entre Mls y LyM-1 son parecidas a las existentes dentro del complejo H-2, ya que:

-Existe una estrecha relación entre los determinantes responsables de MLR (Locus Mls) y los antígenos polimórficos detectados en las células B por serología (Locus LyM).

-Los antisueros dirigidos contra los productos de esta región son capaces de bloquear los receptores Fc de las células B.

-Es posible la existencia de loci de histocompatibilidad asociados a esta región.

-Locus Lyb-3. (Tabla II.3)

El anticuerpo obtenido frente a este antígeno, ha resultado no ser citotóxico para células normales de Bazo (HUBER y col., 1977). Se piensa actualmente que la expresión de Lyb-3 está limitada a linfocitos B pequeños.

-Locus Lyb-4. (Tabla II.3).

Su descubrimiento fue en parte fortuito, pues al inmunizar ratones C57BL/Ks con L1210, se obtuvo un suero (FREUND y col., 1976) citotóxico exclusivamente para células B. El resultado era inesperado, pues en esas fechas se pensaba que L1210 era un tumor derivado de células T. De este locus se conoce una única especificidad Lyb-4.1, especificidad que no se manifiesta en ratones de 4 días, alcanzando el máximo valor a las seis semanas (AHMED y col., 1978).

Dado que el suero anti-Lyb-4, bloquea el MLR, y que las células estimuladoras en MLC son Lyb-4.1⁺, se ha propuesto para este determinante la función de actuar como una segunda señal en MLR, aumentando la respuesta proliferativa (FREUND y col., 1977)

-Locus Lyb-5.(Tabla II.3)

Descrito por AHMED y col.,(1977). En su identificación se emplearon (al igual que para Lyb-3, Lyb-6 Lyb-7) ratones que carecen de una subpoblación de células B: CBA/N-xid.

Esta especificidad se expresa en linfocitos B portadores de receptores para el complemento, careciendo de citotoxicidad el anticuerpo empleado en su detección. De las células Ig^- , solo el 5% son $Lyb-5^+$.

Los ratones CBA/N-xid, carecen de esa población de células $Lyb-5^+$, lo que permitió la identificación de este CMAD (AHMED y col., 1978).

-Locus Lyb-6 (Tabla II.3)

El CMAD codificado por este locus, fue definido por análisis químico (KESSLER y col.,1979) antes que por técnicas de citotoxicidad.

Solo se expresa la especificidad Lyb-6 en células Ig^+ , no apareciendo por tanto en timocitos ni en médula ósea. Todas las células $Lyb-6^+$ expresan también Lyb-4, pero solo el 50% de ellas expresan Lyb-5. Este locus está en estudio en la actualidad.

-Locus Lyb-7 (Tabla II.3)

La inhibición de la producción de anticuerpos "in vitro" por un anticuerpo que contaminaba un antisuero anti-Lyb-5, sirvió para la identificación de la especificidad Lyb-7.1 (SUBBARAO y col., 1979).

Se piensa que Lyb-5, Lyb-7 y Lyb-3 se expresan en la misma molécula (SUBBARAO y col., 1979).

-Loci Qa-4 y Qa-5

Codifican especificidades distintas de IJ. Encontrándose restringida su expresión a las células T.

-LOCI ASOCIADOS A LA REGION I (Ia)

Comprende una serie de loci, localizados en la misma zona que los genes de la respuesta inmune (genes Ir). De estos, se conocen cuatro loci: Ia-1, Ia-3, Ia-4, Ia-5, que codifican especificidades detectadas serológicamente y otros que se han definido por estudios funcionales y por otros medios (MURPHY., 1978).

La región I donde se localizan los loci Ia, está situada en el cromosoma 17 del ratón (Fig.II.2). Estos loci Ia codifican especificidades con gran polimorfismo, a diferencia de los loci Ly y a semejanza de los loci H-2K y H-2D, Todas las especificidades Ia son altamente inmunogénicas, y los loci que las codifican se agrupan en cuatro subregiones: I-A, I-B, I-J, e I-C.

-Subregión I-A.

En esta subregión, contigua a H-2K (Fig.II.2), se han diferenciado al menos cuatro loci:

Locus	Codificador	Locus	Locus
Ia-1	Lad	Ia-6	H-2Ia

El locus Ia-1, codifica especificidades presentes en células B, macrófagos y células epidérmicas (COWING y col.,1978). Especificidades, que a semejanza de las especificidades H-2, se clasifican también en públicas y privadas (SHREFFLER y DAVID., 1975). Conociéndose que esas moléculas portadoras de las especificidades Ia, están constituidas por dos cadenas, una de peso molecular 33.000 (denominada cadena α) y otra con un Pe

so molecular de 27000 (denominada cadena β), (DAVID., 1976). Aunque se conoce la naturaleza dímica de las moléculas Ia, aún no se sabe si las especificidades alotípicas Ia, se localizan en ambas cadenas o solamente en una de ellas.

Algunos sueros anti-Ia, han mostrado capacidad para bloquear determinadas respuestas celulares, como el MLR de las células B. Es posible por tanto que los Lad y los Ia sean la misma molécula, ya que como es conocido, los Lad son los determinantes que inducen dichos MLR.

Los sueros anti-Ia bloquean también, la proliferación de células T inducida por antígenos, la respuesta a LPS "in vitro", la resupuesta de células T a tumores singénicos, la respuesta proliferativa a PHA, y la colaboración entre células B y células T.

El locus Ia-6, aún , no identificado totalmente, se ha supuesto su existencia para explicar algunos hallazgos en la expresión de las especificidades Ia. El mas interesante es que la especificidad Ia preu

sente en las células T, es distinta de la expresada en las células B de un mismo individuo (MURPHY.,1978) y las especificidades Ia encontradas en factores colaboradores y amplificadores producidos por las células T, son distintas de las expresadas por las células B, pero semejantes a las expresadas por las células T.

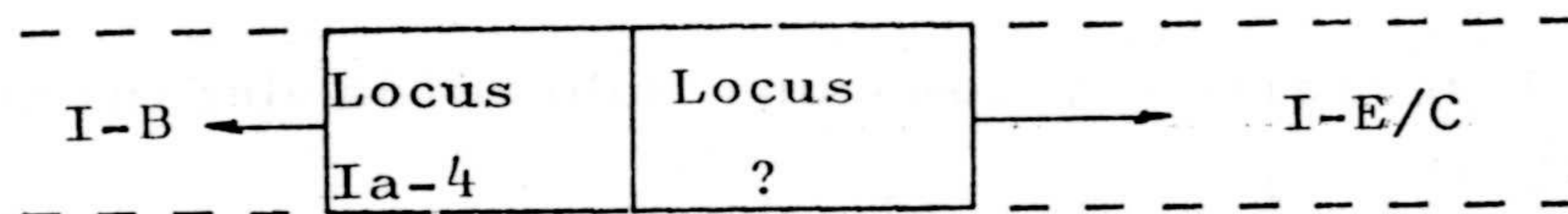
El último locus, H-2IA, es el locus de histocompatibilidad asociada a la subregión I-A (KLEIN y col 1976).

-Subregión I-B

En ella no se ha localizado ningún locus codificador de CMAD.

-Subregión I-J

Aparentemente es una subregión de menor complejidad, ya que hasta la fecha, se han descrito solo dos loci dentro de ella, uno de ellos no confirmado todavía.



El locus Ia-4, codifica especificidades presentes en células T_s (supresoras) (MURPHY.,1978), en células con receptores para factores supresores de las células T y en células iniciadoras de la respuesta en presencia de Con A (FRELINGER y col., 1976). Sin embargo la presencia de especificidades Ia en las células iniciadoras de la respuesta a ConA, no es seguro, pues se han descrito como células Ia^- por HABU y col.,(1979).

Otras especificidades codificadas por el mismo locus, se han descrito en Macrófagos (NIEDERHUBER.,1978; HABU y col.,1979) y en las células supresoras de la respuesta a LPS, inducidas por ConA (PRIMI y col.,1979). Estas células supresoras se caracterizan por ser resistentes al tratamiento con cortisona y por suprimir también las respuestas a antígenos timoindpendientes.

-Subregión I-E

Considerada por algunos investigadores como una parte de una subregión mas amplia (Subregión E/C), la describiremos como una subregión definida por dos loci (Ia-5 y otro sin denominación concreta).

	Locus	Locus	Locus	
I-J	Ia-5	Lad'	?	I-C

Las especificidades codificadas por el locus Ia-5, poseen una distribución y funciones similares a las especificidades Ia codificadas por el locus Ia-1. Describiéndose en primer lugar la especificidad Ia-22 (SHREFFLER y col., 1976) que está presente en las cepas H-2^k pero no en las H-2^d. Ia-22, se ha descrito, junto con Ia-23, representan las especificidades privadas codificadas por el locus Ia-5. Este locus además codifica la especificidad pública Ia-7.

Además del locus que codifica Lad, se ha supuesto (HAYES y BACH., 1978) la existencia de un nuevo locus (?) que codificaría especificidades, presentes en células T y en blastos inducidos por Con A, distintas de las expresadas en las células B.

-Subregión I-C

Representa la porción derecha de la región I y en ella se localizan dos loci, Ia-3 y H-2IC.

I-E	Locus	Locus	S
	Ia-3	H-2IC	

Solo se ha identificado una especificidad codificada por este locus y expresada principalmente en células T, especificidad Ia-6 (SHREFFLER y DAVID.,1975; DAVID.,1976).

Los loci Ia-3 y H-2IC, fueron descritos respectivamente por RICH y RICH,(1976) y por McKENZIE y HENNING (1976).

TABLA II.4. Funciones y especificidades codificadas por las subregiones I-A, I-B, I-J, e I-C/E

Funciones:	I-A	I-B	I-J	I-C
Respuesta Inmune	+	+	-	+
MLR	+		+	+
Rechazo injertos	+		-	+
Interacción Macrófago-LT	+	-	-	+
Interacción LT-LB	+	-	-	+
Interacción entre células supresoras		-	+	-
Transferencia de DH	+	-	-	-
Especificidades:				
En células B	+	-	-	+
Macrófagos	+	-	-	+
C. T-supresoras	-	-	+	-
C. B-colaboradora	+	-	-	-

Aunque el objeto principal de este estudio, son los CMAD de células linfoides o relacionadas con ellas, en los apartados siguientes (II.2.2 y II.2.3) describiremos otros loci, como los que codifican los aloantígenos eritrocitarios y algunos otros de posible interés para este trabajo.

II.2.2.- Loci que codifican CMAD, limitados a la superficie de los eritrocitos de ratón.

Sin embargo, estos antígenos, podrían expresarse en otros tejidos o en linfocitos, ya que sueros anti eritrocitos de ratón reaccionan con ellos. Además, anticuerpos anti-eritrocitos, suelen contaminar numerosos sueros anti-Ly.

Se han descrito siete sistemas antigénicos Ea y un locus que controla la movilidad electroforética y la capacidad de aglutinación de los eritrocitos (Locus Eam). Los distintos loci y algunas características de ellos en Tabla II.5.

TABLA II.5.- Loci Ea y especificidades codificadas por ellos.

LOCUS	ALELOS	ESPECIFICIDADES	DISTRIBUCION	CROMOSOMA
Ea-1	Ea-1 ^a	Ea-1.1(A)	-	8
	Ea-1 ^b	Ea-1.2(B)	-	8
	Ea-1 ^o	?	-	8
Ea-2 (R,Z,rho, H-14).	Ea-2 ^a	Ea-2.1(R)	Hígado, bazo, timo, pulmón, testículos	
	Ea-2 ^b	Ea-2.2(Z)	-	
Ea-3()	Ea-3 ^a	Ea-3.1	-	
	Ea-3 ^b	N.C.		
Ea-4(BL, D).	Ea-4 ^a	N.C.		
	Ea-4 ^b	Ea-4.2	Riñón, pulmón.	
Ea-5()	Ea-5 ^a	Ea-5.1	Riñón y pulmón. Algo en bazo y cerebro.	
	Ea-5 ^b	N.C.	-	
Ea-6()	Ea-6 ^a	Ea-6.1	Testículo, cerebro, y-2- algo en hígado y pulmón	
	Ea-6 ^b	Ea-6.2		
Ea-7(T)	Ea-7 ^a	Ea-7.1		
	Ea-7 ^b	Ea-7.2		
Eam	Eam ^h Eam ^l			

II.2.3.- Otros Loci y Antígenos de interés.

A modo de cajón de sastre, en este apartado, describiremos una serie de loci y de antígenos, que aún no estando relacionados, poseen algunas características en su distribución, localización etc. que los hacen interesantes.

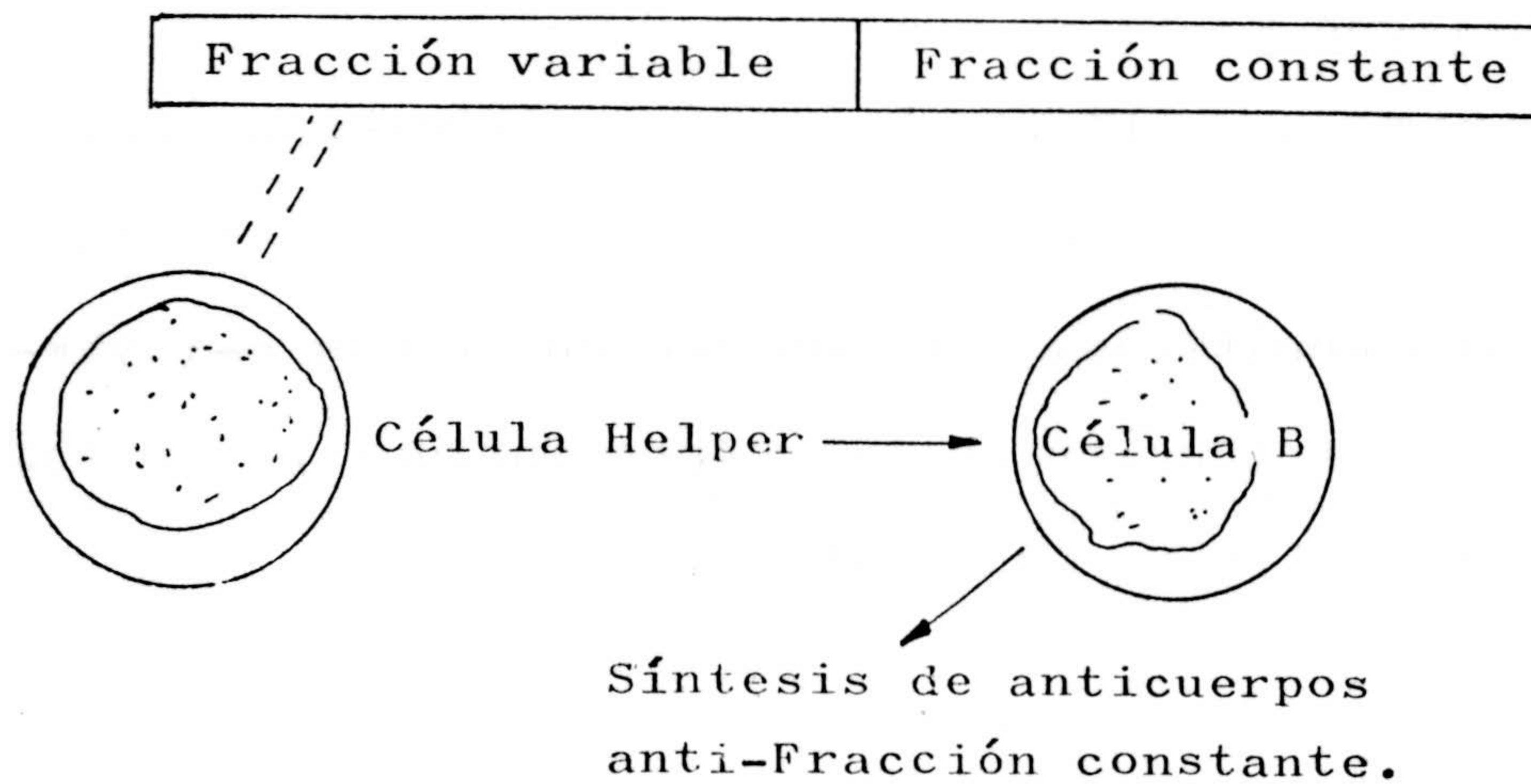
-Locus Mph-1

Está localizado en el cromosoma 7 (ARCHER.,1975) conociéndose dos especificidades codificadas por este locus: Mph-1.1 y Mph-1.2. Parece que se expresa solo en macrófagos, ya que el antisuero anti-Mph-1 conocido lisa el 60% de las células de exudado peritoneal mientras que prácticamente no tiene efecto sobre células de ganglios linfáticos.

-Antígeno F

Es un antígeno que aparentemente no forma parte de la membrana celular, ya que solo se detecta en extractos hepáticos. Se conocen dos tipos F-1 y F-2, con una distribución en las cepas murinas perfectamente conocida (SILVER y LANE.,1975).

Las inmunizaciones entre cepas que difieren en su antígeno F, da lugar a la producción de anticuerpos que no solo reaccionan con las células de la cepa donante sino que también lo hacen con las del receptor (autoanticuerpos). Este resultado no esperado, se supone debido a que el antígeno F, posee dos lugares reactivos en la misma molécula, una constante común a todas las cepas murinas y una variable con dos formas alélicas como mínimo. Debido a la existencia de estas dos zonas reactivas, al inmunizar una cepa con antígeno F de otra, con diferente especificidad, la fracción variable (que actúa como molécula portadora) es reconocida por las células Helper. La estimulación de este tipo celular, desencadena la producción de anticuerpos (por las células B) específicos para la porción constante.



Se piensa, por tanto, que la producción de esos autoantiu cuerpos anti antígeno F, está controlada al menos por dos genes, uno localizado en la subregión I-A y otro, no localizado aún, pero no ligado a genes Ir. El Pseo molecular de este antígeno no está perfectamente determinado habiéndosele asignado valores desde 40.000 (LANE y SILVER 1976) a 72.000-93.000(MIHAS y col., 1976).

-Loci Sk-1 y Sk-2

Ambos loci codifican fundamentalmente especificidades no encontradas en linfocitos pero sí en células epidérmicas, que suelen poseer de fenotipo: H-2⁺, Thy-1⁺, Sk⁺, H-Y⁺, TL⁻, Ly-1⁻, Ly-2⁻, Ly-3⁻, Pca⁻; debido a ello, se piensa que los antígenos Sk, Thy-1 y H-Y, son los que inducen la respuesta inmune que desencadena los rechazos de piel. El estudio de estos antígenos fue de gran interés, ya que permitió demostrar la presenucia de antígenos,específicos de tejidos y no presentes en linfocitos, que eran responsables de algunas reacciounes de rechazo de transplantes.

-Complejo T

Este complejo genético, localizado en el cromosoma 17 de ratón ligado al complejo H-2, parece estar constituido por dos loci, que codifican hasta unas seis especificidades (ARTZT y BENNETT.,1977) definidas serológicamente (SNELL., 1979), Especificidades que en el desarrollo embriológico aparecen antes que las especificidades H-2; habiéndosele asignado a este complejo T, una importante función en la diferenciación embriológica, en la diferenciación de espermatozoides, en la supresión de la recombinación dentro de la región H-2 y parece ser el responsable de algunos defectos de tamaño encontrados en ratones. (BENNETT.,1975 ; KLEIN y HAMMERBERG., 1977).

Una de las especificidades, controladas por este complejo:F9, analizada bioquímicamente, ha resultado estar constituida por dos moléculas, una con un peso molecular de 40.000 y otra de 12.000 (posiblemente se trate de una β -2-microglobulina). Debido a esto y a que aparecen embriológicamente antes que los H-2,

se piensa que los genes del complejo T, fueron los precursores evolutivos de las moléculas H-2D y H-2K. También incluido en este complejo o muy próximo a él, se ha localizado un antígeno de histocompatibilidad, el denominado H-39 (ARTZT y col., 1977).

Posiblemente, en el hombre, exista una estructura similar a este complejo T del ratón, ya que al menos la incidencia de espina bífida, está asociada a genes ligados al complejo HLA (FELLOCES y col., 1977).

-Loci H-Y

Aunque inicialmente se pensó que era un único locus localizado en el cromosoma Y, y que codificaba antígenos de transplante (EICHWALD y SILMSER., 1955). Se piensa actualmente que en realidad, existen dos loci H-Y, denominados H-Y-1 (que codifica el antígeno H-Y detectado por injerto) y H-Y-2 (que codifica el antígeno H-Y detectado por serología); y aunque el antígeno H-Y es un antígeno de transplante, en la producción de células citotóxicas frente a él, interviene la información contenida en el complejo H-2 (HURME y col., 1978b).



El hecho de que en hembras de aves se haya descrito un antígeno similar al H-Y del ratón (WACHTEL y col 1975) hace suponer que este antígeno posea una distribución mas general.

-Loci H-X

Codifican antígenos con una función similar a las descritas para los antígenos H-Y. Pero se localizan en los cromosomas X.

II.3.- CMAD detectados con Xenoantisueros.

Mientras que la mayor parte de los antígenos descritos han sido detectados empleando aloantisueros producidos por inmunizaciones entre cepas distintas de ratón y posterior absorción de los sueros obtenidos; algunos antisueros obtenidos en conejo (Xenoantisueros) han sido utilizados en la detección de antígenos de ratón o humanos, siendo de gran utilidad. Aunque la mayor dificultad de todos los xenoantisueros es su inespecifici-

cidad, dificultad que puede eliminarse en parte, realizando numerosas absorciones de esos xenoantisueros con distintos tipos celulares. Algunos de estos xenoantisueros absorbidos, han mostrado una gran utilidad práctica al poder utilizarlos "in vivo" para inhibir reacciones específicas.

-ALS. Suero antilinfocítico.

Se ha utilizado para prolongar la supervivencia de injertos de piel en ratón y en la inmunosupresión del rechazo renal en hombre. Parece que este xenoantisuero reconoce el antígeno Thy-1 en ratón (WILLIAMS y col., 1976).

Otros xenoantisueros específicos para otras poblaciones de la serie linfoide (suero anti-células tímicas-ATS-, Suero anti células B y suero anticélulas plasmáticas) están siendo de gran utilidad.

-MSLA. Suero anti-antígeno linfocitario específico de ratón.

Este suero, reconoce específicamente un antígeno presente en linfocitos, timocitos y leucemias T, no apareciendo nunca en sarcomas (SHIGENO y col., 1968)

- SMTLA. Suero anti antígeno de superficie específico de linfocitos derivados del timo.

Es muy posible que este suero y el antiMSLA, reconozcan una misma especificidad. Manifiesta similitudes con el suero anti-Thy-1.2 , ya que éste y el suero anti-MTLA reconocen especificidades presentes en la misma molécula (SAUSER y col.,1974)

-Suero antiantígeno theta -BA0.

Desde su descubrimiento, (SAUSER y col.,1974) se ha utilizado para eliminar poblaciones de células T, mediante técnicas de citotoxicidad.

A pesar de todo, es probable que con los cuatro antisueros descritos: BA0, MSLA, Thy-1 y MTLA, estemos detectando la misma especificidad o especificidades localizadas en la misma molécula.

-Suero anti Antígeno específico de linfocitos periféricos de ratón. MPLA.

Aunque se ha descrito (RAFF y CANTOR.,1971),

como un suero de ratón inmunizado con células de ganglios linfáticos de ratones irradiados y hepatoreconstituidos, no se conocen datos desde su obtención.

-Xenoantisuero que detecta determinantes presentes en las células T "killer". K_a .

Detecta un antígeno, K_a , presente en células citotóxicas para tumores (SULLIVAN y col., 1973), no apareciendo en células tímicas o de médula ósea. El antígeno, es exclusivo de las células T maduras, que además posean el fenotipo $Thy-1^+$, $Ly-1^-,2^+$ (SULLIVAN y col., 1973).

-Xenoantisueros anti diversas poblaciones linfoides purificadas.

Se han obtenido una serie de ellos, que reconocen, determinantes presentes en: células B, células T periféricas, células T funcionales (ZEILLER y PASCHER., 1973) y timocitos resistentes a cortisona (PAPIERNIK y BACH., 1977).

-Suero antiantígeno de células plasmáticas de ratón MSPCA.

Se ha obtenido por inmunización de conejos con células plasmáticas tumorales murinas (HARRIS y col., 1972).

-Suero anti timocito-linfocito B (Th-B).

Este suero, obtenido por inmunización de conejos con el mieloma MOPC-10⁴E (de origen Balb/c), reconoce un antígeno común a, linfocitos B y a timocitos (YUTOKU y col., 1976).

-Suero anti Receptor de LPS en las células B

La existencia de ratones que dan altas respuestas al tratamiento con LPS (C3H/Tif) y de otros que responden muy mal (C3H/HeJ), ha permitido su obtención.

Para la obtención de este suero, se inmunizan conejos con C3H/Tif y se absorbe el suero obtenido con células de C3H/HeJ (FORNI y COUTINHO., 1978). El mitógeno LPS y el suero descrito, compiten por la misma estructura de la membrana de células B. Podrá permitir el aislamiento de la molécula receptora del mitógeno.

-Sueros anti-Ia

Se conocen varios xenoantisueros, desde que se describió un antisuero de rata anti ratón que poseía esta capacidad (SACHS y CONE.,1973). Todos ellos tienen en común el reconocer los Ia presentes en la superficie de las células B.

Se piensa que estos xenoantisueros, anti Ia, reconocen los mismos Ia que los aloantisueros conocidos pero son específicos de una cadena diferente. Un mecanismo similar al descrito para los DRW en el hombre (SNARY y col.,1976).

II.4.- RELACION ENTRE CMAD Y VIRUS DE LEUCEMIAS MURINAS
(Mu1V).

Aunque normalmente los CMAD de una célula, no guardan relación con antígenos virásicos. Incluimos este apartado dentro del estudio general de los CMAD, porque las interacciones virus-célula hospedadora pueden modificar los CMAD típicos de la célula, otras veces dan lugar a la expresión de numerosos determinantes nuevos e incluso esas interacciones dan lugar a la expresión, en ocasiones, de determinantes virásicos sin que exista producción de nuevos viriones.

Otros CMAD, tienen claramente un origen virásico o al menos están asociados a antígenos virásicos (GROSS.,1970), pudiendo expresarse tanto en células normales como en células leucémicas. En estos casos, sin embargo, la expresión de los antígenos virásicos está limitada a algunas cepas,(Tabla II.6). Algunos de estos CMAD de origen virásico o relacionados con ellos son:

-G CSA (antígeno Gross de la superficie celular) es característico de todas las leucemias inducidas por virus Gross.

-GSA (antígeno de Gross soluble) Descrito por AOKI y col.(1968), detectándose en el suero de ratones NZB infectados o no con virus.

Raza	GCSA	G _{IX}	G _(RADAL)	G _(ERLD)	X-1	Pca-1
C57BL/6	-	-	-	↓	-	-
C58	↓	↓	↓	↓	↓	-
A	-	↓	-	↓	-	↓
BALB/C	-	-	-	-	-	↓
C3H/Figge	↓	↓	↓	↓	↓	↓
AKR	↓	↓	↓	↓	↓	↓
NZB	↓	↓	-		↓	↓
129	-	↓	-	↓	↓	-

TABLA II.6.- Distribución de los CMAD, relacionados con MuLV, en distintas cepas de ratón.

-G_{IX}

También es un determinante asociado al MuLV-Gross.

-G_{RADAL} y G_{ERLD}

Su nombre alude a que son determinante relacionados con el MuLV-Gross encontrados en las leucemias.

RADA 1 y ERLD.

Otros antígenos relacionados con virus sin que formen parte de la cápsida de los mismos, pero asociados con transformaciones inducidas por virus, son: X-1, Pca-1 y el denominado Antígeno de Abelson.

Muy interesante, como prueba de que en ocasiones el virus puede permanecer en la célula sin manifestarse, posiblemente porque su genoma esté integrado en el genoma celular y reprimido, es el hallazgo de que en determinadas ocasiones puedan manifestarse en células estimuladas, no haciéndolo antes de la estimulación.

Como ejemplo, aparecen antígenos virásicos en células transformadas con LPS, lípido A y PPD (PHILLIPS y col., 1976) y en células alogénicas durante el desarrollo de una reacción injerto contra huesped (DATTA y SCHWARTZ., 1976).

II.5.- CMAD en linfocitos humanos.

II.5.1. CMAD en linfocitos T humanos.

A pesar de los esfuerzos realizados, en la especie humana, no se han encontrado CMAD específicos que permitan identificar las distintas subpoblaciones . Esto, ha impedido un estudio detallado de los linfocitos T humanos. A causa de no poseer sueros específicos, normalmente se utiliza la capacidad de los linfocitos T para formar rosetas con los eritrocitos de carnero como el mejor método de purificación de los mismos.

Se conocen sin embargo dos antígenos exclusivos de células T:

-HTL

S e detecta con un suero de conejo inmunizado con células que forman rosetas E. Este suero es específico de timocitos y de células leucémicas de enfermos de leucemia linfoblástica aguda (ALL), aunque no totalmente ya que reconoce una subpoblación de células T, en la que se supone la existencia de un nuevo antígeno denominado TH1.

-p 23,30

Solo se detecta este antígeno en las células T activadas con aloantígenos. No se tiene seguridad de que sea un antígeno expresado por la célula a consecuencia de su activación ya que podría ser un antígeno presente en el medio e incorporado a la superficie de las células tras su activación por el aloantígeno.

II.5.2.CMAD en linfocitos B humanos

Clásicamente son, Inmunoglobulinas de superficie, receptores de Complemento, receptores Fc y antígenos de linfocitos B reconocidos por heteroantisueros. Hace unos cinco años, (MAMN y col.,1975), se han descrito una serie de antígenos polimórficos relacionados con el MHC y codificados por la región HLA-D (región que controla el MLR). Estos antígenos denominados p23,30 por poseer pesos moleculares de 23000 y 30000, son similares a los Ia descritos en el ratón, Siendo distintos por otra parte a los antígenos HLA-A, HLA-B, HLA-C, Inmunoglobulinas y β -2-microglobulina.

III. TIPOS CELULARES

El estudio de los distintos tipos celulares, linfocitos T y B, células Nulas, Macrófagos, "Natural killer" y células "killer" y de sus subpoblaciones, purificadas utilizando sus CMAD característicos, está permitiendo el conocimiento de los mecanismos responsables de la iniciación, mantenimiento y finalización (conservando la memoria) de las reacciones inmunes. Del mismo modo ha permitido la asignación a algunas de estas subpoblaciones una función concreta dentro del sistema inmune de un organismo.

III.1.- Celulas T

Representan, dentro de la serie linfocítica, la diferenciación de una población celular necesariamente realizada bajo influencia del Timo.

Considerada en principio como una única estirpe celular, el estudio sistemático de las células T, ha puesto de manifiesto su enorme diversidad, diversidad tanto en número de subpoblaciones conocidas, como en el

papel desempeñado por cada una de ellas.

III.1.1. Subpoblaciones de células T en ratón

III.1.1.1. Células T supresoras (T_S).

Se definen como aquella subpoblación de células T que pueden suprimir la producción de anticuerpos o las respuestas mediadas por células. Dichas células T_S , se han descrito en numerosos sistemas, utilizando como criterio el tipo de diana de la célula T_S para su identificación inicial. De acuerdo, por tanto, con el tipo de diana, se han descrito células T_S de la síntesis de anticuerpos, células T_S de las respuestas mediadas por células, células T_S "feed-back", y células T_S con memoria.

a) Células T_S de la producción de anticuerpos

Estas células se inducen o pueden inducirse empleando antígenos de muy diverso tipo, lo que ha permitido la identificación de tres tipos de células T_S :

-Células T_S inducidas por antígenos celulares, como altas dosis de eritrocitos de carnero, Estas cél

las suprimen la respuesta de anticuerpos frente al mismo antígeno empleado en su inducción. Lo que confirma la especificidad de las células T_S inducidas.

Aunque las principales células efectoras de esta su presión, parecen poseer el fenotipo: Ia^+ (especificidad codificada por el locus Ia^{-4} de la subregión I-J), (MURPHY., 1978; TADA y col., 1978a) $Ly-1^+2^+3^+$ (CANTOR y BOYSE 1976); no se descarta la posibilidad de que estas células T_S pertenezcan a varias subclases (WEITZMANN y col., 1976; RAMSHAW y col., 1977).

-Células T_S inducidas por antígenos proteicos solubles y haptenos.

Parecen poseer especificidad para suprimir la respuesta de anticuerpos frente al antígeno empleado en la inducción. Su fenotipo es: Ia^+ , $Ly-1^-2^+3^+$ (MURPHY., 1978; BEVERLEY y col., 1976).

-Células T_S inducidas por alotipos específicos, inoculados antes del nacimiento en ratones. Las dianas de estas células son células colaboradoras T_H . Poseen de fenotipo: Ia^+ (IJ), $Ly 1^-2^+3^+$ (HERZENBERG y col., 1976; MURPHY y col., 1976a).

De nuevo, el empleo de mitógenos, concretamente Concanavalina A - a dosis de $10 \mu\text{g/ml}$ durante 48 horas (PRIMI y col., 1979)- ha permitido la generación de células T_S de la respuesta de anticuerpos, frente a cualquier antígeno timoindependiente (JADINSKI y col., 1976). Y si el antígeno timoindependiente es LPS, las células T_S de la respuesta a este antígeno, son fenotípicamente: Ia^+ (I-J), $Ly-1^-2^+3^+$ y resistentes a la cortisona (JADINSKI y col., 1976). Las dosis utilizadas de LPS fueron de $50 \mu\text{g/ml}$ durante 72 horas (PRIMI y col., 1979).

Tendríamos que añadir a esos subtipos de células T_S bien definidos, otros que aún están en estudio:

-Células T_S de las respuestas de Ig-E en receptores irradiados (WATANABE y col., 1977). Se diferencian de los subtipos estudiados, en su fenotipo, ya que son células $Ly-1^+2^-3^-$ y no se han detectado aún la presencia de antígenos Ia.

-Células T_S procedentes de ratones infectados con virus antes del nacimiento. Tienen capacidad para inhibir la síntesis de anticuerpos por células B de ra-

tones adultos. La naturaleza primitiva de estas células se manifiesta al ser células TL^+ , poseyendo además los CMAD $Ly-1^+2^+3^+$ (MOSSIER y col., 1975). Pero no se sabe la relación entre estas células T_S y las T_S presentes en los ratones adultos.

-Células T_S generadas en reacciones injerto contra huesped. Son células que además poseen capacidad de inhibir "in vitro" las respuestas de anticuerpos frente a eritrocitos de carnero. Poseen un fenotipo $Ly-1^+2^+3^+Ia^+$ (SHAND., 1977).

Logicamente, la diversidad de células T_S , detectadas en sistemas distintos, puede reflejar que efectivamente correspondan a subpoblaciones de células T_S distintas, o que correspondan a formas diferenciadas (de acuerdo con el sistema empleado) de un mismo tipo celular supresor. Se acepta como fenotipo típico de las células T_S , el más frecuente de los encontrados: Ia^+ , $Ly-1^-2^+3^+$. Sin olvidar otros fenotipos presentes en células T_S y citados previamente.

b) Células T_S de las respuestas mediadas por células.

La efectividad de estas células se ha estudiado en la supresión de la hipersensibilidad de tipo retardado, en su efecto sobre la producción de células T citotóxicas y por su capacidad para suprimir el rechazo de tumores singénicos.

-Células T_S de la hipersensibilidad de tipo retardado. Estas células se han descrito en dos sistemas. En el sistema de RAMSHAW y col.(1977), las células T_S se inducían por inoculación de altas dosis de eritrocitos de carnero en ratones CBA(Ly-1.1, Ly-2.1 y Ly-3.2). Esas células T_S se transfieren junto con el antígeno a receptores tratados con ciclofosfamida. Poseyendo el fenotipo Ly-1⁺, 2⁻, 3⁻, 4⁻, 5⁺, 6⁺, 7⁻, Ia⁻ (IJ⁻) (McKENZIE y POTTER., 1979).

En otro sistema, en el que se emplean ratones C57BL/6 (Ly-1.2, Ly-2.2, Ly-3.2), (HUBER y col., 1976b), la hipersensibilidad de tipo retardado, se suprime inoculando células de bazo de ratones no inmunes junto con el antígeno en ratones irradiados. Las células T_S presentes en el bazo de animales no inmunes, manifiestan un fenotipo

Ly-2⁺, 3⁺.

-Células T_S de la producción de células T citotóxicas frente a dianas H-2 (estudios realizados "in vitro").

Fenotípicamente son células Ly-2⁺3⁺ (JANDINSKI y col 1976) que se originan en cultivos inducidos por ConA. Es muy probable que se esté detectando la misma población celular inducida por ConA y que suprime las respuestas de anticuerpos frente a antígenos timo independientes.

-Células T_S del rechazo de tumores singénicos.

Los estudios realizados "in vivo" que dieron como resultado la detección de este tipo de células T_S, simultáneamente, han sido uno de los pocos con éxito, al conseguir el rechazo de un tumor singénico en crecimiento, al administrar al portador sueros anti IJ.

La técnica utilizada fue la inoculación de tumores SaI y SI5091a en ratones A/J^X y la administración diaria a esos ratones portadores de tumor de suero anti-I-J^k (GREENE y col., 1977).

Suero anti $I-J^k$, que específicamente, inhibe las células T_S ($I-J^k \downarrow$) cuya misión era la de bloquear la formación de células T_K para el tumor. La inactivación de las células T_S realizada por el suero, elimina la barrera inmune existente en el animal, para el desarrollo de las células T_K y consecuentemente, el tumor es rechazado.

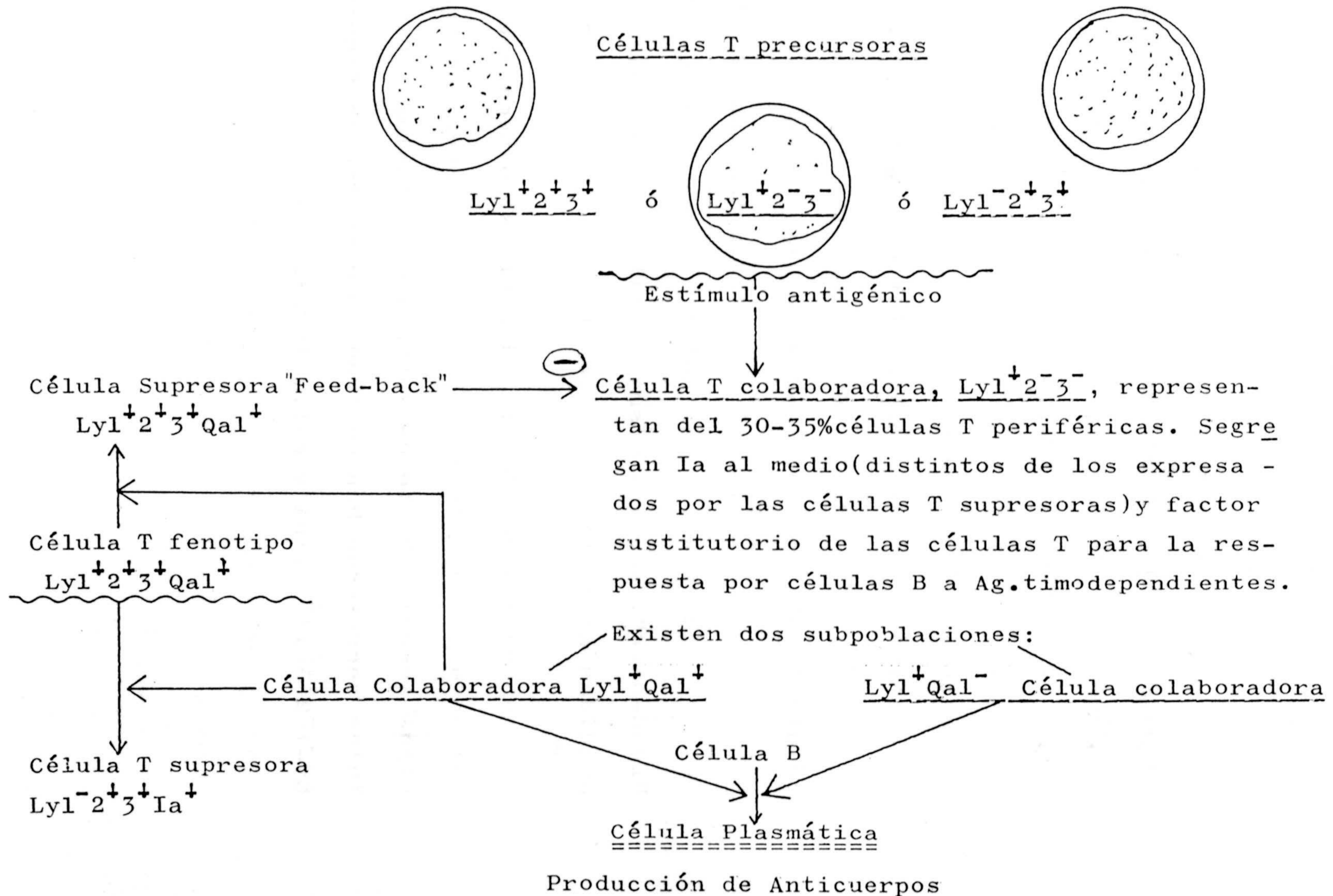
c) Células T_S "feedback".

Esta población, cuya existencia era solo sospechada, anteriormente, hoy se acepta sin ningún género de duda como un subtipo dentro de las células T_S . Son células de fenotipo $Ly-1^+ 2^+ 3^+$, $Qa-1^+$ que poseen una intensa acción supresora sobre células T_H (ayudantes o colaboradoras) $Ly-1^+$. La certeza sobre su existencia está confirmada, entre otros, por los siguientes hechos:

-Se conoce una raza de ratones NZB que desarrolla espontáneamente enfermedades autoinmunes. El análisis de sus poblaciones celulares, ha puesto de manifiesto una escasa representación de las células feed-back.

d) Células T_S con memoria. Se describieron como células $Ly-1^- 2^+ 3^+$, Ia^+ (LABLAY y col., 1978).

Fig. III.1.- Interrelaciones entre células T y células B.



-Si a un cultivo de células T, eritrocitos de carnero y células Ly-1⁺ no sensibilizadas, le añadimos células Ly-1⁺ sensibilizadas frente a eritrocitos de carnero, se suprime la respuesta de las células no sensibilizadas. Este potente efecto supresor aumenta proporcionalmente al número de células Ly-1⁺ inmunes, adicionadas al cultivo. En este mismo sistema, se ha demostrado (EARDLEY y col., 1978), que las células diana para las células Ly-1⁺ sensibilizadas añadidas, son células de fenotipo Ly-1⁺2⁺3⁺, Qa-1⁺, es decir las denominadas células "feed-back". Las células diana de estas células "feed-back", son las mismas células T_H sensibilizadas añadidas al cultivo y de fenotipo Ly-1⁺2⁻3⁻. (Fig.III.1).

Aunque las células T_S, descritas, parece que interactúan directamente sobre dianas celulares, algunas de ellas segregan factores supresores solubles. Estas células secretoras han mostrado manifestar un fenotipo Ly-1⁻2⁺3⁺IJ⁺ (TADA y col., 1977).

III.1.1.2. Células T ayudantes (T_H).

Sus funciones son colaborar con las células B para la producción óptima de anticuerpos y con las células T_S "feed-back" para una respuesta inmune justa.

Como células T_H , se han descrito dos subpoblaciones de acuerdo con su adherencia a la lana de vidrio (TADA y col., 1978b):

-Células T_{H2} : se adhieren a la lana de vidrio, expresan Ia, codificados por la subregión I-J. Sin embargo esos Ia, son distintos de los expresados por las células T_S (MURPHY., 1978).

-Células T_{H1} : no se adhieren a la lana de vidrio. No expresando tampoco especificidades Ia.

Sin embargo la expresión o no de antígenos Ia, aún no se ha asociado a funciones diferentes de estos subtipos T_{H1} y T_{H2} .

Ambas poblaciones tienen el fenotipo $Ly-1^+ 2^- 3^-$, fenotipo que es exclusivo de todas las células T_H (EARDLEY y col., 1978)

El criterio mas efectivo para identificar subpoblaciones de células T_H con funciones distintas, ha

sido el estudio de la distribución de los antígenos Qa-1 en esta población celular. De acuerdo con esto se ha conseguido diferenciar dos subpoblaciones de células T_H :

-Células T_H de fenotipo, $Ly-1^+2^-3^-$, $Qa-1^+$. Se caracterizan por su capacidad de actuar sobre dos tipos de dianas celulares, bien células B (colaborando con ellas en la producción de anticuerpos), bien células T de fenotipo $Ly-1^+2^+3^+Qa-1^+$ (colaborando con ellas en su diferenciación, bien en células T_S "feed-back", bien en células T_S de otro tipo) (Fig.III.1.) (CANTOR y col., 1978b).

-Células T_H de fenotipo, $Ly-1^+2^-3^-$, $Qa-1^-$.

Que poseen como dianas exclusivamente células B. Parece, sin embargo, que para una óptima producción de anticuerpos, se necesita la presencia de ambos tipos de células T_H , $T_H^{Qa-1^+}$ y $T_H^{Qa-1^-}$.

Por último, las células T_H (no se sabe si ambas subpoblaciones o sólo una de ellas), secretan factores solubles colaboradores y portadores de especificidades Ia (McKENZIE y PARISH., 1976). Incluso, el denominado

"Factor sustitutivo de las células T", que en ausencia de células T, permite una respuesta de anticuerpos normal frente a eritrocitos de carnero, es liberado por estas mismas células colaboradoras T_H (PICKEL y col., 1976).

III.1.1.3. Células T citotóxicas (T_K)

El comportamiento y las características de estas células T_K , se ha estudiado tanto frente a dianas alogénicas como frente a dianas singénicas. En el último de los sistemas, empleando dianas singénicas con la célula T_K , las estructuras de membrana, diana de las células T_K son los mismos antígenos de ella, pero modificados (por métodos químicos, por la existencia de antígenos asociados a virus o de antígenos asociados a tumores).

En este sistema singénico, se han detectado dos subpoblaciones de células citotóxicas:

-Células T_K : $Ly-1^+ 2^+ 3^+$

-Células T_K : $Ly-1^- 2^+ 3^+$

Subpoblaciones a las que se les han asignado funciones ligeramente diferentes. Para CANTOR y BOYSE., (1976), la subpoblación de fenotipo $Ly-1^{+}2^{+}3^{+}$ son las células amplificadoras o precursoras mientras que las de fenotipo $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$ son las células efectoras T_K , en un sistema en el que se emplearon los mismos antígenos modificados químicamente. Pero STUTMAN y SHEN., (1978) afirman la capacidad citotóxica directa de ambas subpoblaciones y la necesidad de la presencia de ambas para una respuesta citotóxica.

Empleando sistemas citotóxicos, en los que las células efectoras y las dianas fuesen entre sí alogénicas. Para distintos tipos de células dianas, las células T_K encontradas, no siempre correspondían a un mismo tipo de células. Concretamente, se han estudiado el tipo de células T_K generadas para dianas que difieren de ellas, bien en los productos H-2K ó H-2D solo, bien en la región I, o en toda la región H-2.

-Células T_K específicas para productos H-2D ó H-2K, solamente. Se han descrito dos tipos, dependiendo de la especificidad Ly-1 que posea la cepa utilizada co

mo origen para la producción de células citotóxicas.

-Células T_K $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$. Cuando la raza original po see la especificidad $Ly-1.2$.

-Células T_K $Ly-1^{+}2^{+}3^{+}$. Cuando la raza original po see la especificidad $Ly-1.1$. (SHIKU y col.,1975).

-Células T_K específicas para determinantes de la región I. Todas ellas poseen de fenotipo $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$ (al menos en las razas estudiadas de fenotipo $Ly-1.2$) (SIMPSON y BEVERLEY.,1977).

-Células T_K generadas frente a dianas que difieren en el H-2 completo. Su fenotipo Ly es, $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$, siendo ayudadas por células colaboradoras $T_H(Ly-1^{+}2^{-}3^{-})$ para la consecución de una respuesta citotóxica óptima (BACH y ALTER.,1978).

Aunque en un sistema singénico, también se han gene rado células citotóxicas de hembras frente a machos. En este caso, la estructura diana reconocida por las cé lulas efectoras, son los antígenos H-Y asociados a los productos de las subregiones H-2D ó H-2K. Estas células T_K , expresan el fenotipo $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$ (aunque sus células precursoras son $Ly-1^{+}2^{+}3^{+}$).

Observando los resultados indicados anteriormente, el sistema Ly, no ha permitido una diferenciación total en tre las distintas subpoblaciones de células T_K . Esta dificultad, se está intentando solventar, mediante el empleo de nuevos marcadores como:

Ly-6: especificidad presente solo en las células T_K efectoras , mientras que está ausente en las células precursoras de estas (WOODY.,1977).

ALA-1: igualmente expresado solo en las células T_K efectoras (FEENEY, y HAMERLING.,1977).

Receptor Fc: solo expresado en células T_K efectoras (STOUT y col.,1976).

Podemos concluir, afirmando la existencia de dos subpoblaciones de células T_K de acuerdo únicamente con el sistema Ly. Células T_K efectoras (Fenotipo:Ly-1⁻2⁺3⁺) y células T_K precursoras (Fenotipo:Ly-1⁺2⁺3⁺).

No quedaría completo este estudio sobre las distintas subpoblaciones de células T en ratón, si no indicásemos cual de todos estos tipos interviene en procesos inmunes concretos. Generalmente no será un solo

tipo celular el responsable. Entre los numerosos sistemas posibles, describiremos las células que intervienen en: la transformación blástica frente a tumores singénicos, antígenos o mitógenos; el cultivo mixto de linfocitos, en el rechazo de injerto contra huésped, en las reacciones de hipersensibilidad retardada, la producción del factor inhibidor de la migración de los macrófagos, y en la generación de eosinofilia.

III.1.1.4. Células que intervienen en la transformación blástica.

a) Frente a un estímulo tumoral singénico.

Al menos "in vitro", las células que se transforman, son células T Ly-1⁺2⁻3⁻ (LERMAN y col., 1979) e Ia⁻ (PONZIO y col., 1977). La ausencia de especificidades Ia en las células que se transforman, se ha detectado cuando el tumor utilizado como estímulo es un tumor Ia⁺ y en este caso el antígeno Ia presente en él, es el estímulo antigénico desencadenante de la transformación (bien por sí solo, bien formando un complejo con otro antígeno de la superficie de la célula tumoral).

b) Células que se transforman en presencia de mitógenos policlonales.

Son distintas de acuerdo con el mitógeno empleado.

<u>Mitógeno</u>	<u>Células que responden.</u>	<u>Fenotipo.</u>
PHA	Células T (HIRST y col., 1975)	Ly-1 ⁺ 2 ⁺ 3 ⁺ 5 ⁺ 6 ⁺
Con A	Células T (HIRST y col., 1975; NIEDERHUBER y col., 1976).	Ly-1 ⁺ 2 ⁻ 3 ⁻ 5 ⁺ 6 ⁺ Ia ⁺
PWM	Células T (también res <u>ponden</u> células B). (NIEDERHUBER y col., 1976)	Ly-5 ⁺ 6 ⁺ Ia ⁺
LPS	Células B (NIEDERHUBER y col., 1976)	Ly-5 ⁺ 6 ⁺ 7 ⁺ Ia ⁺

El mayor inconveniente que se ha formulado a estos resultados tan claros, es que la sensibilidad al antisuero, depende en gran parte de la concentración de mitógeno utilizada para la transformación (RABINOWITZ y col., 1978). Pues el tipaje, para la asignación de un fenotipo, se realiza añadiendo los correspondientes antisueros

al sistema células + mitógeno. Observando si existe o no transformación celular.

c) Células que se transforman en blastos en respuesta a determinados antígenos.

Aunque aún no se conocen datos concretos, en los estudios que se están realizando en blastos inducidos por DNBSO₃, se están determinando sus tipajes.

III.1.1.5. Células que responden en un MLR.

La respuesta proliferativa, al cultivar células estimuladoras en presencia de células efectoras que difieren en los antígenos H-2D ó H-2K y en la región I, es realizada por células Ly-1⁺ (Fig.III.2).

Sin embargo no son las únicas células que proliferan durante un cultivo mixto de linfocitos de ratón. Se han detectado células Ly-1⁺ y células Ly-1⁺2⁺3⁺ como las células proliferativas en otros sistemas (WETTSTEIN y col.,1978). Y si las diferencias entre células diana y efectoras, están limitadas a diferencias en la región H-2K ó H-2D, las células proliferativas son Ly-1⁺2⁺.

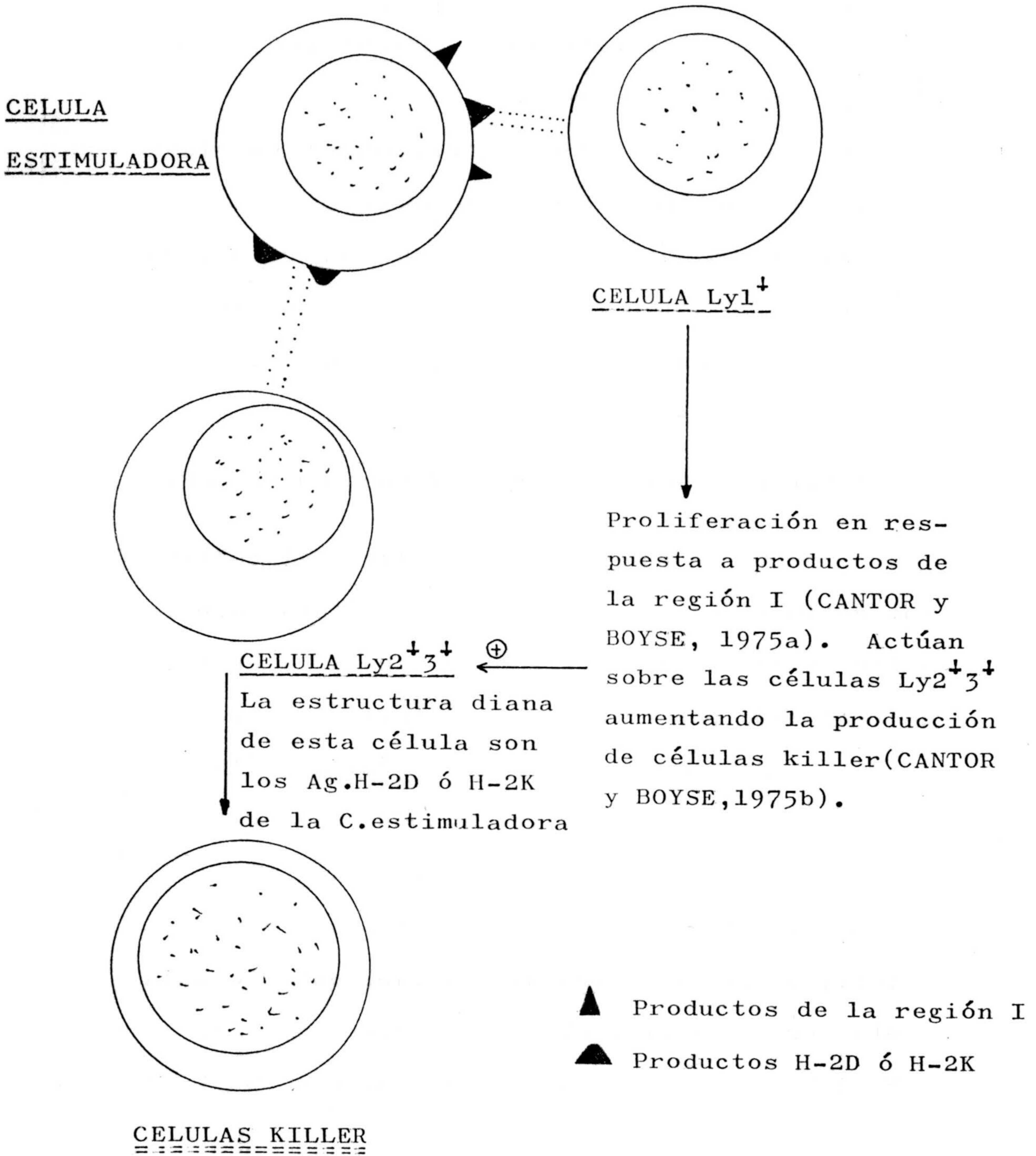


Fig.III.2.- Interacciones entre células T con las dianas y entre sí en un MLR.

En general, las células que dan respuestas proliferativas en el cultivo mixto de linfocitos, corresponden a células T_H , que colaborarán bien con células precursoras de células T_K , bien con células B para una síntesis óptima de anticuerpos. Concretamente, las células generadas en un MLR y que añadidas a células B enfrentadas a eritrocitos de carnero, manifiestan actividad amplificadora de la respuesta de anticuerpos, poseen de fenotipo $Ly-1^+$ cuando las células efectoras y dianas del MLR, difieren en el haplotipo H-2, en la región I o en el locus Mls (estimulador menor de los linfocitos). Sin embargo cuando las diferencias entre las células efectoras y dianas del MLR, están limitadas a la región H-2D ó H-2K, las células T_H detectadas en el sistema anterior, poseen de fenotipo: $Ly-1^+2^+$. (Fig.III.3).

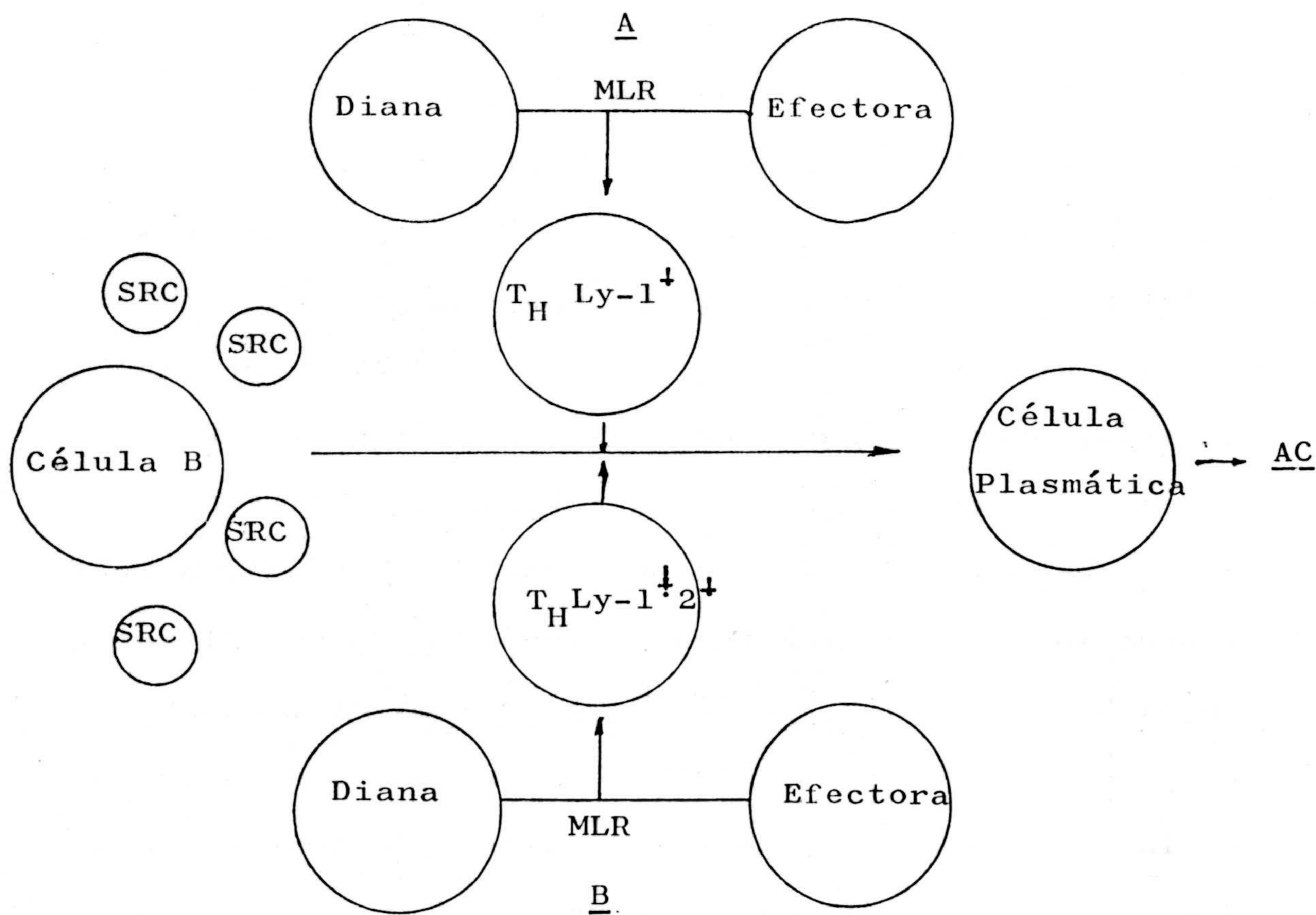
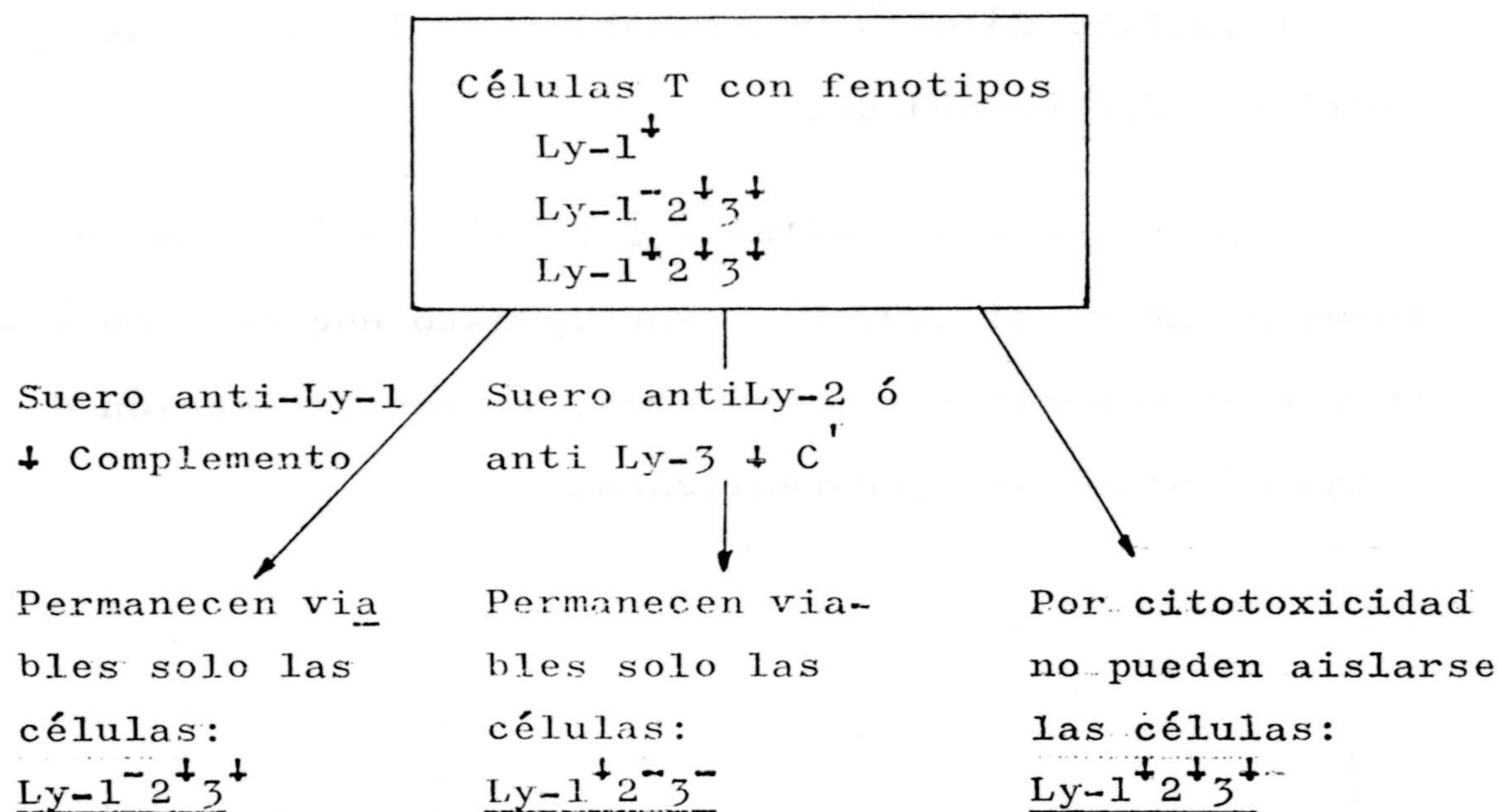


Fig.III.3. Células colaboradoras T_H de la síntesis de anticuerpos (AC), generadas en un MLR, para diferencias en el haplotipo H-2, en la región I o en el locus Mls (A); o bien para diferencias limitadas a la región H-2D ó H-2K (B). (SWAIN y PANFILLI.,1979).

III.1.1.6. Células que intervienen en la reacción injerto contra huésped o huesped contra injerto.

En general para todos los estudios de identificación de estos tipos celulares, se utilizan ratones B (ratones timectomizados que carecen por tanto de cualquier población de células T) a los que se le introducen células T de las distintas subpoblaciones purificadas y no sensibilizadas.

La purificación de las células T empleadas en la reconstitución de los ratones B, se realiza empleando distintos antisueros y complemento:



Con estas poblaciones celulares purificadas de acuerdo con su fenotipo Ly se ha observado:

-La reconstitución de ratones B, con células T $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$, no les capacita para rechazar un aloinjerto.

-Pero, si la reconstitución se efectúa con células $Ly-1^{+}$ junto con células $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$, el rechazo se realiza rápidamente.

Estos resultados coinciden totalmente con los obtenidos "in vitro" y esquematizados en la fig.III.2.

III.1.1.7. Células responsables de la hipersensibilidad de tipo retardado.

Se piensa que son células T $Ly-1^{+}2^{-}Ia^{-}$ (VADAS y col 1976; HUBER y col.,1976b). Pero, puesto que también intervienen monocitos y macrófagos, la identificación de estas células está por realizarse.

III.1.1.8. Células productoras de MIF.

Al parecer, su producción es debida tanto a células Ly-1⁺, como a células Ly-1⁻2⁺3⁺ (NEWMAN y col., 1978).

III.1.1.9. Células responsables de la eosinofilia.

El aumento de eosinófilos, observado en algunas infecciones parasitarias, ha mostrado ser inducido por una subpoblación de células T con fenotipo Ly-1⁺, (JOHNSON y col., 1979).

III.1.2. Subpoblaciones de células T en humanos.

Aunque dadas las numerosas subpoblaciones identificadas en la especie murina, podríamos conjeturar que en la especie humana existirían subpoblaciones celulares equivalentes. Lo cierto es que actualmente solo se identifican dos subpoblaciones de células T, empleando como criterio para ello, la expresión o no del antígeno T_{H1} .

Subpoblaciones células T		Funciones
T_{H1}^+	T_{H1}^-	
-	+	Proliferación frente a antígenos solubles.
+	-	Proliferación en respuesta a alo-antígenos.
+	-	Producción de MIF y LMF (factor mitogénico para linfocitos.)
+	-	Citotoxicidad mediada por células frente a dianas alogénicas. Y posiblemente frente a tumores <u>sin</u> génicos.
+	-	Supresoras de la diferenciación de las células B en la producción de anticuerpos.

III.1.3. Ontogenia de las células T.

III.1.3.1. Ontogenia de las células T en ratón.

El esquema general del desarrollo ontogénico aceptado, y construido de acuerdo con la expresión de los marcadores Thy-1 y Ly, viene indicado en la figura III.4.

Aunque las células hematopoyéticas presentes en la médula ósea carecen de los marcadores específicos de las células T (son células Ly-1⁻, TL⁻, Thy-1⁻); se las acepta como las células precursoras de toda la serie T, entre otros datos, porque la inducción "in vitro" de estas células, con agentes químicos o con timopoyetina, origina la expresión de los antígenos TL, Ly, y Thy-1 (KOMURO y col., 1975a). Proceso de diferenciación que ha podido efectuarse empleando agentes que aumenten los niveles intracelulares de AMP cíclico.

Es evidente, de acuerdo con esto, que las células T maduras localizadas en la periferia, son el resultado de un proceso de maduración. Proceso que se de

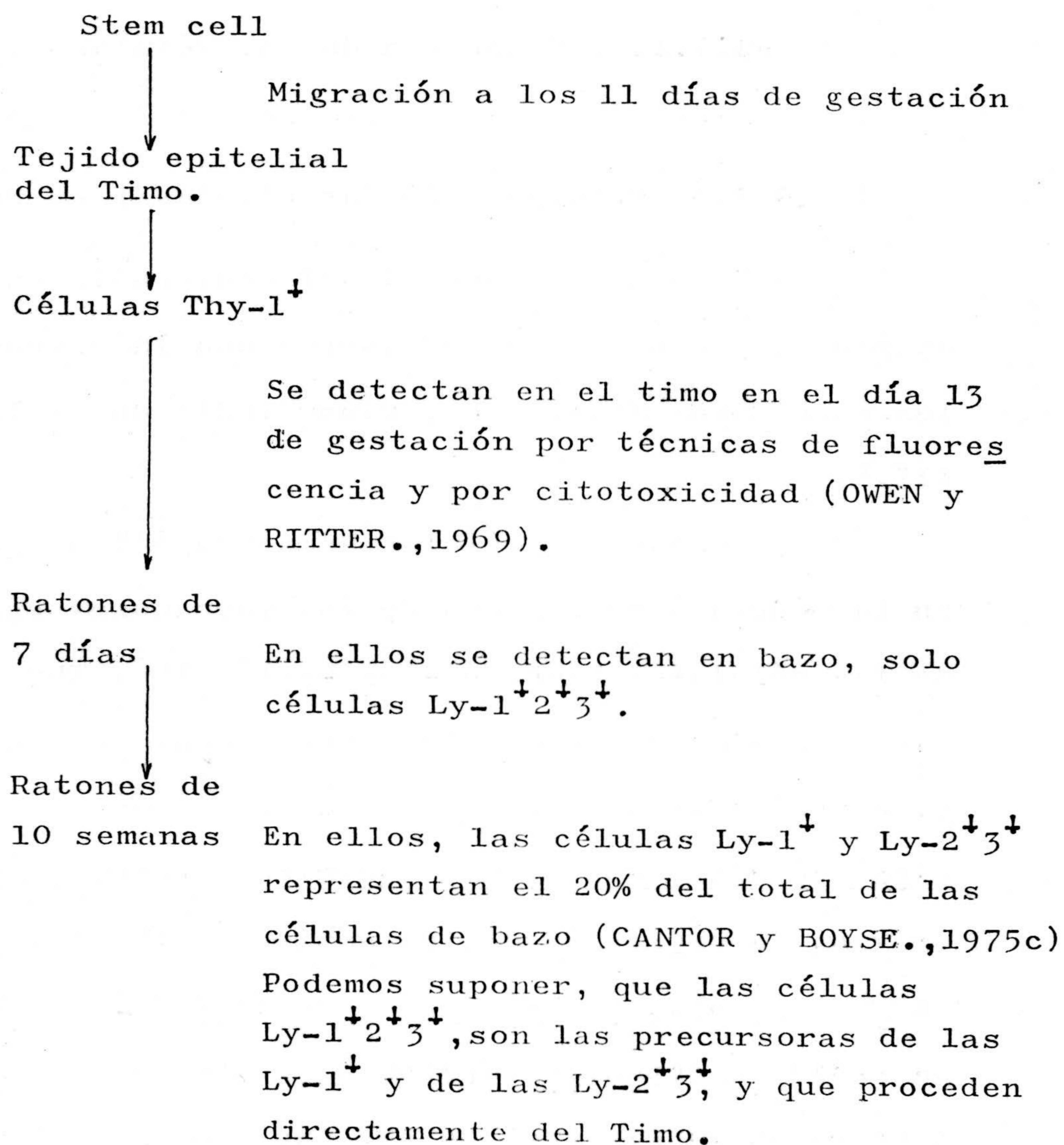


Fig. III.4. Esquema general de la diferenciación de las células T en ratón.

sarrolla en tres fases::

- a) Migración de las células hematopoyéticas de la médula ósea al Timo.
- b) Maduración en el interior del Timo.
- c) Distribución de las células desde el Timo al resto del organismo y diferenciación en la periferia.

a) Migración de las células hematopoyéticas de la médula ósea al Timo.

Las células que penetran en el Timo, son células de fenotipo Thy-1⁻, Ly-1⁻2⁻3⁻, TL⁻ (logicamente el estudio se realiza con cepas de ratones que genotípicamente son TL⁺), aunque sí expresan antígenos H-2 (BENACERRAF y UNANUE., 1979). Estas células que penetran (Protimocitos) con relativa rapidez se diferencian en Timocitos inmaduros. Que son ya células que expresan Thy-1, TL, Ly, H-2 y G_{IX}. (Fig.III.5)

b) Maduración de los timocitos inmaduros en el interior del Timo.

Inicialmente se diferencian en dos estirpes celular-

Timocito Inmaduro

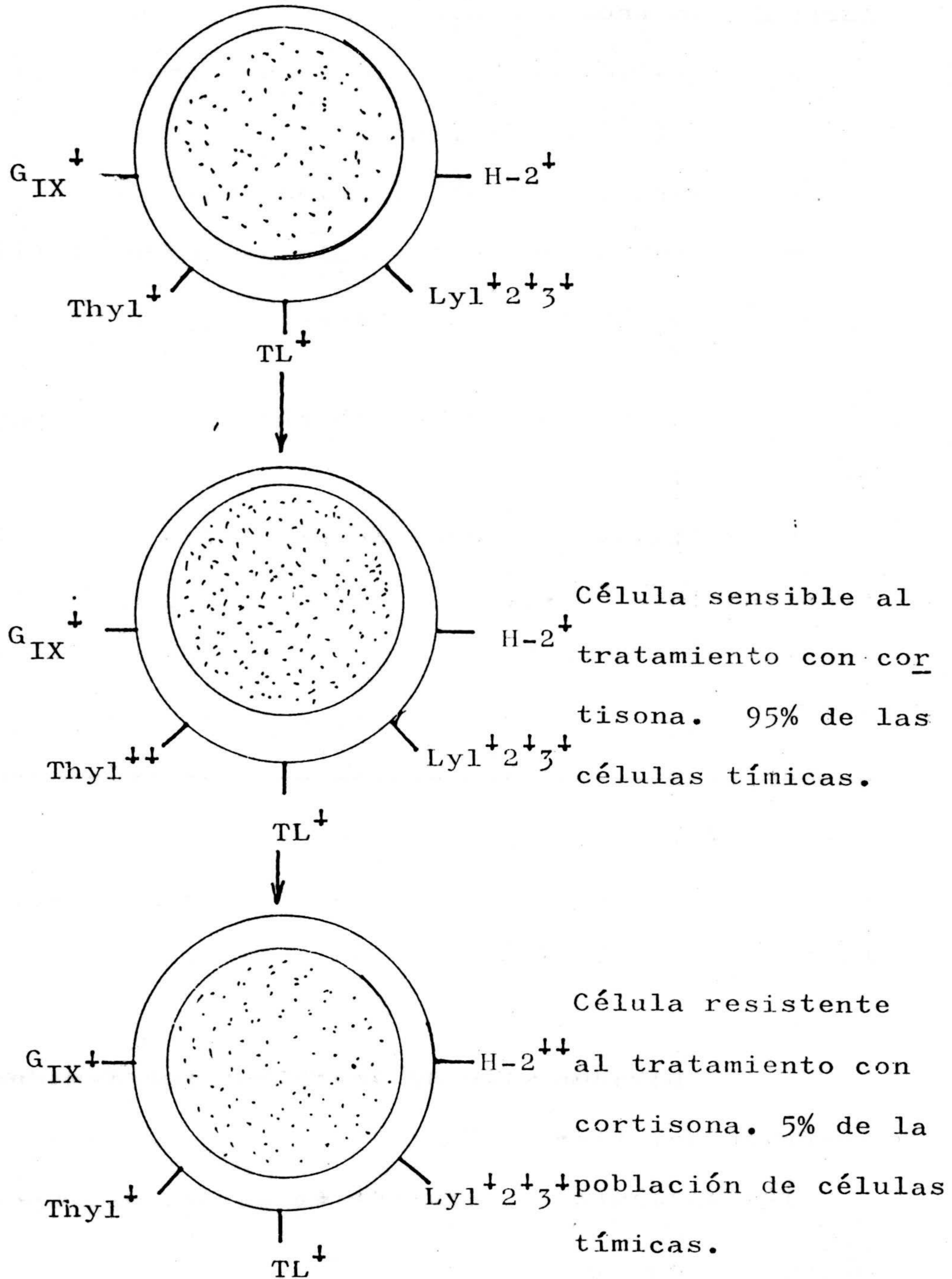


Fig.III.5.- Esquema simplificado de la diferenciación inicial de timocitos inmaduros en el interior del Timo.

res, diferenciadas por su sensibilidad al tratamiento con cortisona.

Concretamente, el 5% de las células derivadas de los timocitos inmaduros, son células resistentes al tratamiento con cortisona (CR). Mientras que el 95% restante son sensibles a la cortisona (CS).

Aunque las poblaciones CS y CR, coexisten en el Timo, se supone que las células resistentes derivan de la población sensible y que son las células exportadas por el Timo para originar las células T competentes periféricas. (Fig.III.5).

Sin embargo, el esquema simplista supuesto en la fig.III.5, posiblemente sea mas complejo de acuerdo con algunos hallazgos:

1/ Las células TP, no expresan una baja densidad del antígeno Thy-1 (como se esperaba al suponer que derivaban de células CR que expresan baja densidad del antígeno Thy-1), manifestando, por el contrario, una gran heterogeneidad en la expresión de este marcador (CANTOR y col.,1975). La heterogeneidad se ha explicado suponiendo que las células T periféricas (TP), derivarían tanto



de células CS como de células CR.

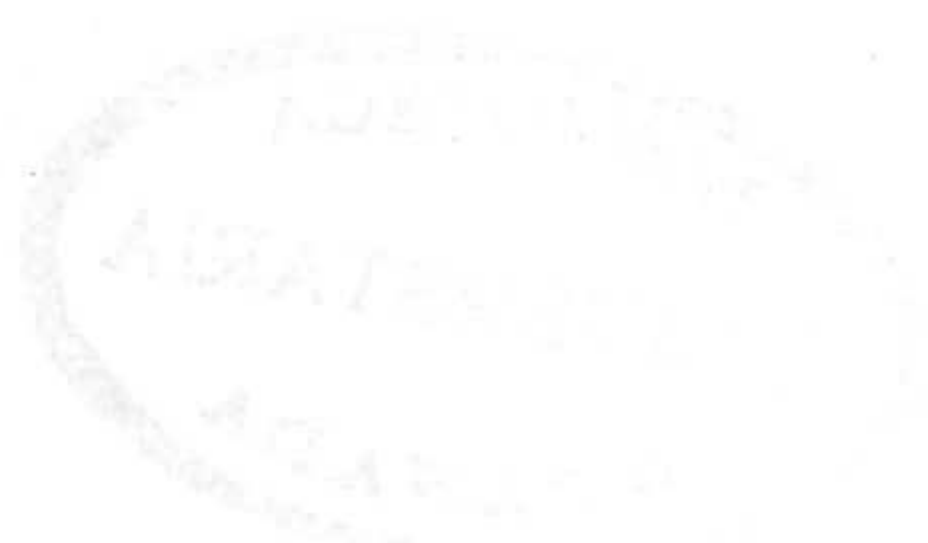
2/ Las células CR, representarían una línea de diferenciación distinta, procediendo directamente de timociitos inmaduros y no de células CS (SHORTMAN y col.,1975).

3/ La existencia de células postímicas precursoras, fuera del Timo y sensibles a la cortisona, indica que al menos parte de las células T periféricas derivan de células CS (STUTMAN y SHEN.,1979).

4/ La presencia en el Timo de células $Ly-1^{+}2^{-}3^{-}$ (MATHIESON y col.,1979). Mientras que antes (FUDENBERG y HUGH.,1978; BENACERRAF y UNANUE.,1979), se pensaba que todas las células tímicas eran $Ly-1^{+}2^{+}3^{+}$. Esas células $Ly-1^{+}2^{-}3^{-}$, representan el 10% de las células tímicas normales y del 50 al 70% de las células CR.

5/ Por último, las células exportadas por el timo a la periferia, pueden expresar tres fenotipos diferentes, siendo todas TL^{-} :

Células $Thy-1^{+}$, $Ly-1^{+}$	67%
Células $Thy-1^{+}$, $Ly-1^{+}2^{+}3^{+}$	31%
Células $Thy-1^{+}$, $Ly-2^{+}3^{+}$	1-2%



De acuerdo con estos resultados, podemos suponer que las posibles vías de diferenciación intratímicas, sean básicamente tres, Fig. III.6. y Fig. III.7

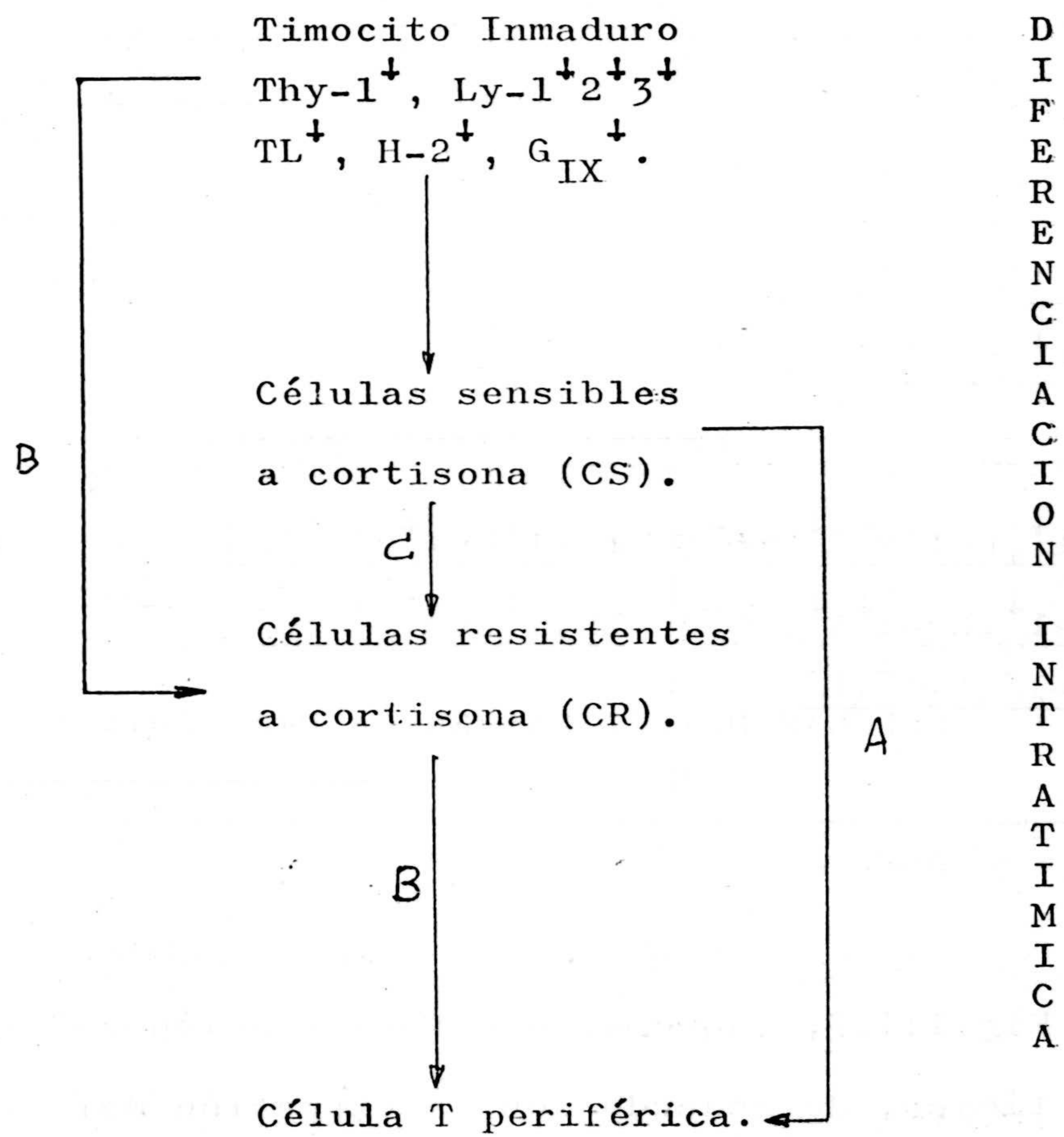


Fig.III.6. Vías de diferenciación intratímicas.

A) (CANTOR y col.,1975),

B) (SHORTMAN y col.,1975)

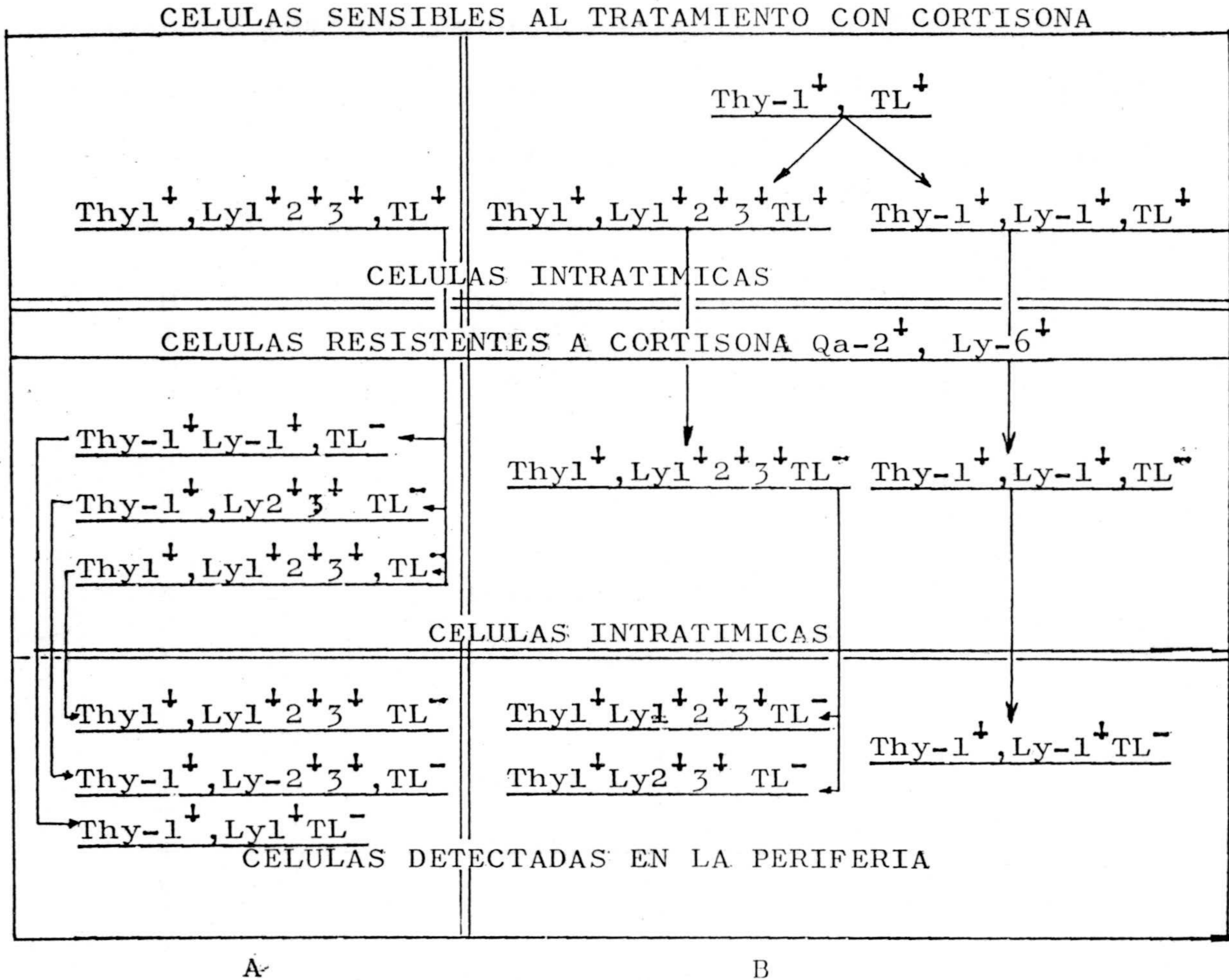


Fig.III.7, Esquema de diferenciación celular intratímica, de acuerdo con la expresión del sistema Ly y de la susceptibilidad al tratamiento con cortisona, A y B, vías alternativas o simultáneas.

c) Maduración y diferenciación en la periferia.

Está bien definido y descrito en el apartado b) de esta sección, que el Timo exporta tres líneas celulares T, de acuerdo con la expresión del sistema Ly, Sin embargo las proporciones relativas exportadas y las presentes en la periferia, son ligeramente diferentes, Tabla. III.A.

Subpoblaciones de células T	% del total de células exportadas por el Timo.	% del total de células T periféricas.
-Ly-1 ⁺ 2 ⁺ 3 ⁺	31%	50-55%
-Ly-1 ⁺ 2 ⁻ 3 ⁻	67%	30-35%
-Ly-1 ⁻ 2 ⁺ 3 ⁺	1-2%	10%

TABLA.III.A. Porcentaje de las distintas subpoblaciones de células T exportadas por el Timo y presentes en la periferia. En ratón.

Manifestando cada una de estas subpoblaciones funciones a veces bastante diversas:

-Células $Ly-1^+2^+3^+$, son las células precursoras de los otros tipos celulares ($Ly-1^+$ y $Ly-2^+3^+$). Entre sus funciones hemos visto que intervienen como células T_K frente a antígenos tumorales, como células supresoras de las respuestas de anticuerpos frente a antígenos modificados con TNP, como células T colaboradoras no específicas de antígeno e inducidas por especificidades H-2D ó H-2K, y son las células que proliferan "in vitro" al estimularlas con PHA, ConA, antígenos solubles o por antígenos H-2D ó H-2K.

-Células $Ly-1^+$, de igual forma, esta subpoblación celular, ha mostrado un amplio mosaico funcional. Colaboran con las células B en la producción de anticuerpos, colaboran con las células $preT_K$, para que se diferencien en células T_K . Se han identificado como las células que inician las respuestas de hipersensibilidad retardada, a pesar de lo cual se ha descrito su capacidad supresora de la producción de IgE. Proliferan en

respuesta a determinantes de la región I, al enfrer-
tarlas en un MLC, proliferando igualmente en respuesta
a antígenos tumorales. Por último, son células secretoras
tanto de factores colaboradores como de MIF.

-Células Ly-2⁺3⁺, dentro de esta línea celular, la
expresión o no de especificidades Ia, ha servido para
identificar dos subpoblaciones celulares, las que expresan
Ia, son células supresoras generadas en respuesta a
ConA y específicas de antígeno; segregando igualmente
factores supresores con especificidad antigénica. Por
el contrario, las células Ia⁻, son células Killer fren-
te a determinantes alogénicos, virásicos o dependientes
del sexo (H-Y).

Es importante insistir, que los esquemas
de diferenciación (Fig.III.5 y III.7), se basan en la
expresión del sistema Ly y de Thy-1. Es posible que
el empleo de otros marcadores como ALA-1 (antígeno ex-
presado en linfocitos activados), IJ y Qa-1, puedan clari
ficar los procesos de maduración y diferenciación de

las células T en ratón.

III.1.3.2. Ontogenia de las células T humanas.

La detección en el hombre de las primeras células linfoides, se consigue en las primeras etapas del desarrollo embrionario, entre la segunda y tercera semana del mismo, localizándose en el saco vitelino. Estas células iniciales alrededor de la sexta semana de gestación emigran al interior del parénquima hepático, donde se diferencian originando las primeras células con capacidad de respuesta en un MLR, frente a linfocitos alogénos. Estas células MLR⁺ se consideran como las precursoras de toda la serie T (FUDENBERG., 1978).

Posteriormente, entre la novena y décima semana de gestación, se desarrolla el Timo, detectándose en él las primeras células T o Protimocitos; que son incapaces de responder a PHA. Sin embargo, aunque los Protimocitos no expresan los antígenos de membrana característicos de las células postímicas, sí los expresan al

enfrentarlos a endotoxinas, extractos tisulares, AMPc, polinucleótidos, etc. Constituyendo esto, una prueba mas del papel de los protimocitos como células precursoras de la serie T. La función concreta del Timo, es controlar y permitir la transformación de los protimocitos en células T; su extirpación por tanto, no afecta al número de protimocitos pero incapacita al organismo timectomizado para desarrollar cualquier tipo de respuesta inmune dependiente de las células T.

El proceso de diferenciación desde Protimocito a célula T, es poco conocido en el hombre debido al escaso número de CMAD conocidos en estas células. Concretamente se utilizan tres marcadores en los estudios de diferenciación de las células T:

-Presencia o ausencia de receptores para eritrocitos de carnero. Las células que los poseen se designan como células E^+ , en caso contrario como E^- .

-Capacidad de ser lisadas por sueros anti-HTL (linfocitos T humanos). Las que en pruebas de citotoxicidad alcanzan un porcentaje de muerte entre el 80 y el 100%, se designan como células HTL^+ . Para valores inferiores

las células son HTL⁻.

-Expresión o no del antígeno T_{H1}. Este antígeno es tá presente en el 40-60% de las células T periféricas.

Aunque, no se utiliza directamente como marcador con fines ontogénicos. Es interesante, que el antígeno p,23,30 (moléculas relacionadas con los antígenos Ia, de pesos moleculares 23.000 y 30.000) se manifiesta en las células T, cuando se sensibilizan "in vitro" con aloantígenos (EVANS y col.,1977).

De acuerdo con los marcadores descritos, las posibles vías de diferenciación de las células T humanas quedan consignadas en la Fig.III.8.

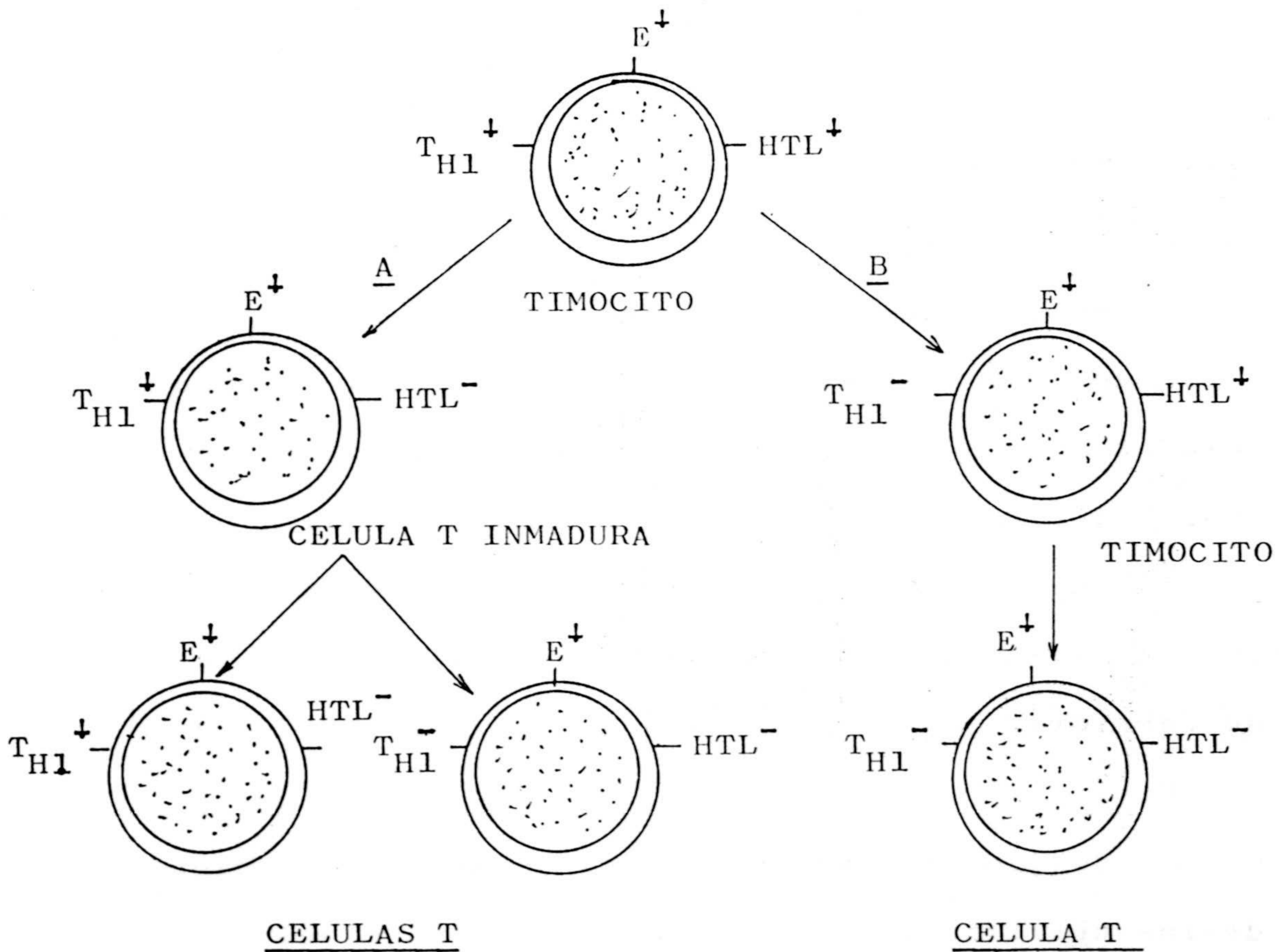


Fig. III.8. Posibles vías de diferenciación de las células T humanas. La vía A, representa el proceso de diferenciación aceptado generalmente; se supone que los timocitos originan células T inmaduras, a partir de las cuales se diferenciarían las células T en la periferia. Sin embargo, la determinación de que todas las leucemias infantiles poseen de fenotipo E^+ , HTL^+ , T_{H1}^- , podría ser una prueba de que la vía B, al menos en ocasiones, puede originar células T maduras. En leucemias linfáticas crónicas, el fenotipo expresado es: E^+ , HTL^- , T_{H1}^+ .

III.2.- Celulas B

Se denominan así, una serie de células linfoides, con un origen similar a las de la serie T (derivan de células hematopoyéticas), pero con una ontogenia independiente del Timo.

En Aves, el procesamiento de las células precursoras para originar células B, se realiza en la Bolsa de Fabricio. En mamíferos aún no se conoce el órgano procesador.

Aunque la mayor parte del desarrollo ontogénico de las células B, parece ser independiente del estímulo antigénico; la transformación en células plasmáticas y consecuente secreción de anticuerpos necesita de un estímulo antigénico previo.

III.2.1. Ontogenia y diferenciación de las células B.

Prácticamente, sólo se conoce algo de la ontogenia y diferenciación de las células B, en el ratón. La escasez de conocimientos, viene condicionada por la

ausencia de algún tipo de marcador (semejante al TL en las células T) que discrimine entre células precursoras y células B maduras. Esta es la razón de que las células pluripotenciales y las células B iniciales, no hayan sido aún identificadas con certeza, aunque su existencia se supone (Fig.III.9). De acuerdo con AHMED y col., (1978), la diferenciación de las supuestas células pluripotenciales en células B, transcurre a través de las siguientes etapas:

- Célula Pluripotencial: no se conocen CMAD, características, no responde a estímulos an tigénicos. No se sabe si se le puede hacer tolerante.
- Célula B inicial: posiblemente con características semejantes a la anterior. En ambas se carece de certeza sobre su naturaa leza.
- Célula Pre-B: es el tipo celular mas primitivo iden tificado. Posee receptores de Fc e IgM intracelular. Es sensible a la inducción de tolerancia y no da res

puesta al tratamiento con LPS.

-Célula B-Inmadura: En la superficie de estas células, se detecta IgM. El tratamiento de estas células con anti-IgM provoca la incapacidad del animal para dar cualquier tipo de respuesta de anticuerpos, inhibiéndose la maduración de las células B (BENACERRAF y UNANUE 1979). Tienen capacidad para responder a mitógenos policlonales, y a antígenos timoindpendientes. Ante el estímulo, las células responden produciendo IgM. Se han detectado en hígado fetal, en médula ósea y en bazo de ratones recién nacidos.

-Célula B1: El tránsito célula B inmadura--- Célula B, viene marcado por la expresión de los antígenos Ia en las células B. Estas células persisten en el ratón durante la primera semana de vida neonatal.

Pueden dar respuestas de IgM e IgD a antígenos timodependientes, Aunque la IgG en membrana solo se detecta en las células Null y muy poco en las células B (BENACERRAF y UNANUE., 1979). Puede inducirse tolerancia en estas células, y aunque son células IgD⁻, el tratamiento de las mismas con LPS, induce la expresión en la membrana de este tipo de Inmunoglobulina (SITIA y col., 1979)

-Célula B2: La expresión de IgD y/o IgA de membrana caracteriza la diferenciación de estas células a partir de las B1. Pero, la posibilidad de que la IgD de membrana, se exprese antes o simultáneamente a la expresión del receptor del complemento, hace suponer que el tránsito célula B1---Célula B2, en realidad comprenda mas de un proceso. Por otra parte, el tratamiento de es

tas células con anti Ig-A, inhibe las respuestas de IgA, pero continúan sin ser afectadas las respuestas de IgM e IgG (BENACERRAF y UNANUE.,1979), indicando esto el carácter mas diferendo de estas células B2. Aunque estas células expresan IgD, el tratamiento de las mismas con LPS, origina su reversión a células IgD⁻ (siendo esta ausencia de IgD en membrana una de las características de las células plasmáticas. Y, aunque ya son verdaderas células B inmunocompetentes, todavía, es posible la inducción de tolerancia.

-Células B3 y B4: aunque poseen unas características muy similares, se han considerado como dos tipos diferentes (AHMED y col., 1978) de acuerdo con su capacidad de respuesta a antígenos timoindependientes; ya que el tipo B3 solo responde

a antígenos timoindpendientes de la clase I, mientras que el tipo B⁴, responde a antígenos timoindpendientes de los tipos 1 y 2.

-Célula B⁵: Posiblemente la última etapa en la diferenciación de las células B, previa a su transformación en células plasmáticas.

-Células B⁶, B⁷, y B⁸, posiblemente representan subpoblaciones independientes, teniendo todas ellas en común ser células formadoras de placas y el expresar las especificidades Pca-1 y ALA-1, este último es específico de las células plasmáticas.

La numeración asignada a los distintos tipos de células B identificados, es totalmente arbitraria. Quedando reseñada en la fig. III.9, la diferenciación aceptada de las células B,

<u>Tipo celular</u>	<u>CMAD y/o Receptores</u>	<u>Respuestas antigénicas</u>	<u>Inducción tolerancia</u>
Pluripotencial	?	-	?
↓ Célula B inicial	?	-	?
↓ Célula Pre-B	Fc ⁺ , IgM en citoplasma	?	+
↓ Célula B Inmadura	Fc ⁺ , sIgM, Lyb-2 ⁺	PCA, TIClase 1, TD IgM	+
↓ Célula B-1	Fc ⁺ , Ia ⁺ , IgM ⁺	PCA, TIClase 1, TD IgM, IgG	+
↓ Célula B-2	Fc ⁺ , Ia ⁺ , IgM ⁺ , IgD ⁺ , C3 ⁺ , Ly-4 ⁺ , Lyb-2 ⁺ .	PCA, TIClase 1, TD IgM, IgG, memoria de IgM e IgG.	+
↓ Célula B-3	Fc ⁺ , IgM ⁺ , IgD ⁺ , Ia ⁺ , C3 ⁺ , Ly-4 ⁺ , Lyb-2 ⁺ , Lyb-3 ⁺ , Lyb-4 ⁺ , Lyb-5 ⁺	PCA, TIClase 1, TD IgM, IgG, memoria de IgM e IgG.	-
↙ Célula B-4	Fc ⁺ , Ia?, IgD ⁺ , C3 ⁺ , Ly-4 ⁺ , Lyb-2 ⁺ , Lyb-5 ⁺ , LyM-1 ⁺ .	PCA, TIClase 1, y2, IgG PFC.	-
↓ Célula B-5	Fc ⁺ , Ia ⁺ , IgM ⁺ , IgD ⁺ , C3 ⁺ , Ly-4 ⁺ , Lyb-2 ⁺ , Lyb-3 ⁺ , LyM-1 ⁺ , Pca ⁺	PCA, TIClase 1, y2; PFC de IgM e IgG.	-
↓ Célula B-6	Ly-4 ⁺ , ALA-1 ⁺ , Pca ⁺	PFC de IgM	-
↓ Célula B-7	Ly-4 ⁺ , ALA-1 ⁺ , Pca ⁺	PFC de IgG	-
↓ Célula B-8	IgG ⁺	Células con memoria	?

Fig. III.9. Esquema de diferenciación de las células B. TD: antígenos Timodependientes. TI: antígenos timo independientes. PFC: células formadoras de placas. PCA: activadores policlonales de las células B. (AHMED y col., 1978).

La última fase de diferenciación de las células B, necesita del estímulo antigénico. Tras el mismo se originarán las células plasmáticas y las células B con memoria. Fig.III.10.

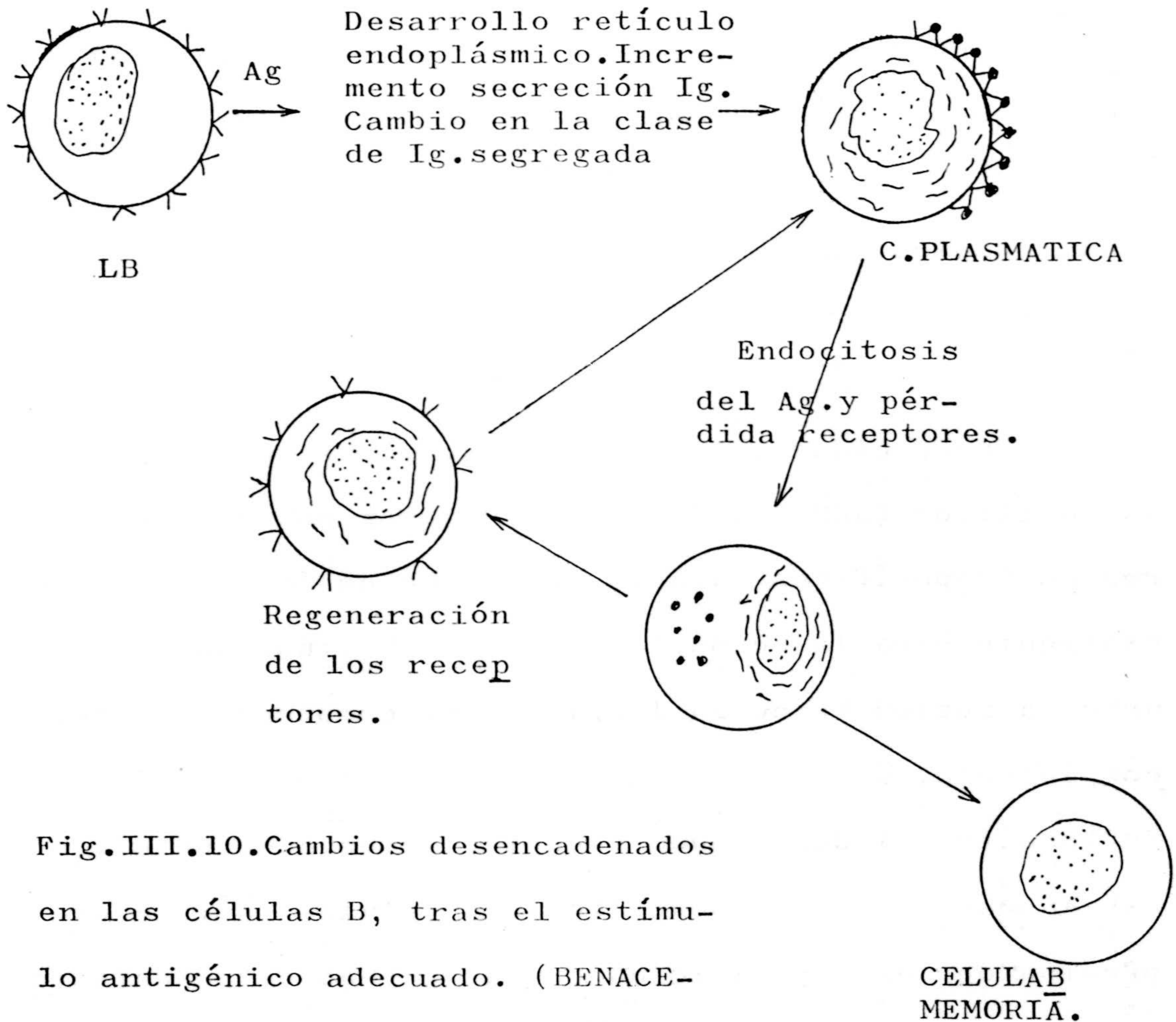


Fig.III.10. Cambios desencadenados en las células B, tras el estímulo antigénico adecuado. (BENACERRAF y UNANUE., 1979).

III.3. Sistema Mononuclear fagocítico.

Comprende este sistema un grupo de células con capacidad fagocítica y que reciben dos denominaciones: Monocitos (para las células mononucleares fagocíticas presentes en médula ósea y en sangre periférica) y Macrófagos (para células con características y funciones similares y presentes en los distintos tejidos, hígado, nódulos, cavidades, sistema nervioso...).

Estas células, además de poseer capacidad fagocítica, se caracterizan por adherirse a la lana de vidrio, por su incapacidad para reproducirse, por ser peroxidasa positivos (GEHRZ y KNORR., 1979), por poseer receptores Fc (específicos para la región Fc de las IgG, especialmente para la Fc de las IgG₁ e IgG₃, no pudiendo unir la región Fc de la IgG₄), y del componente C3 del complemento, después de su rotura por el enzima C3 convertasa (es el denominado receptor inmunoaderente),

Aunque se les ha descrito como células Ia⁺, la expresión de las especificidades Ia, parece estar relacionada con la distribución tisular del macrófago. En ra-

tón, al menos, se han detectado (COWING y col.,1978), tres subpoblaciones de macrófagos de acuerdo con las especificidades Ia expresadas por los mismos:

-Macrófagos que expresan especificidades Ia codificadas por la subregión I-A. Este tipo de células predomina en Bazo.

-Macrófagos que expresan especificidades Ia, codificadas por la subregión I-C. Se han localizado en muy pequeña proporción tanto en Bazo como en Peritoneo.

-Macrófagos que no expresan Ia codificados por la subregión I-A. Son los mas abundantes en los fluidos peritoneales.

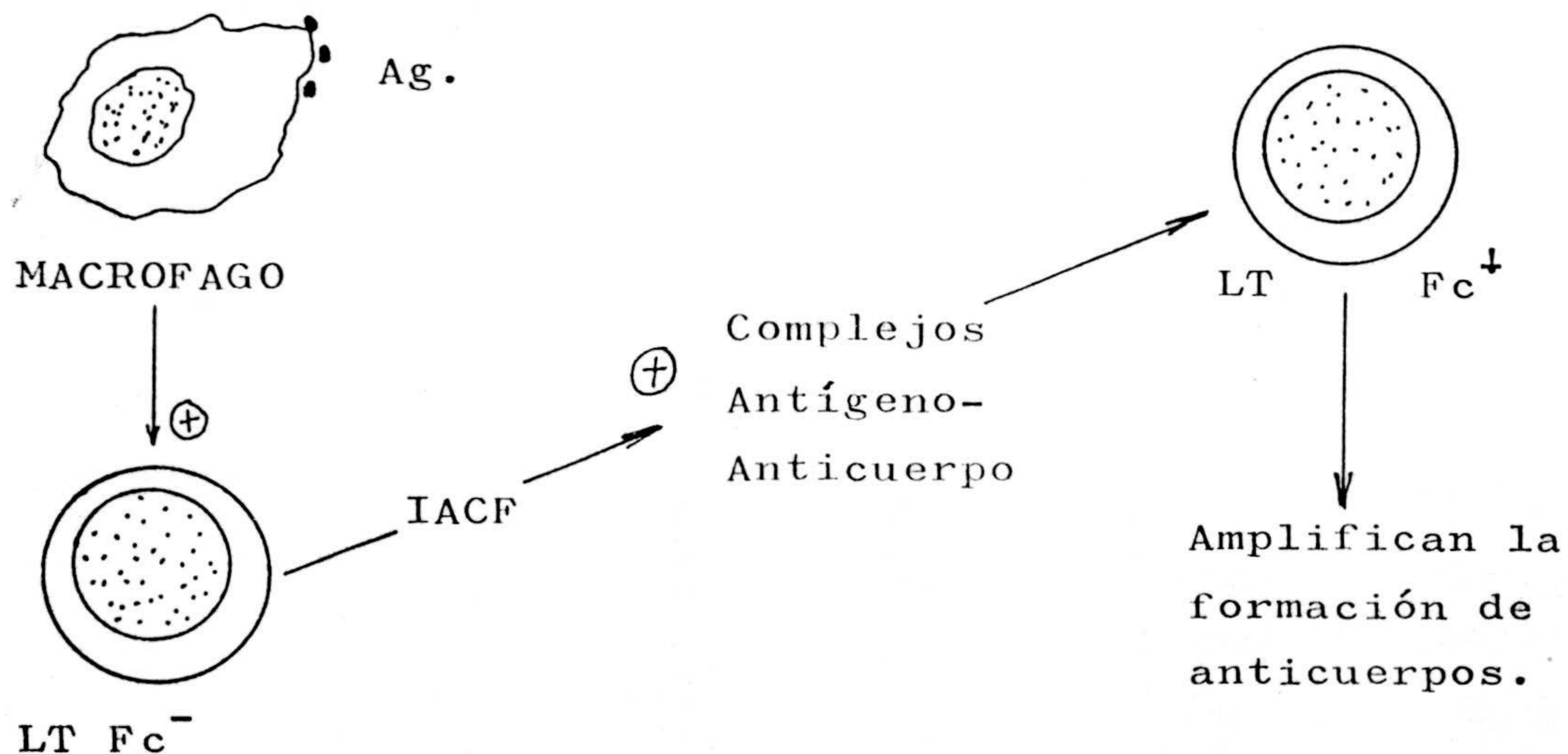
Además de la capacidad fagocítica perfectamente identificada en estas células, sintetizan y segregan al medio una serie de productos, como enzimas (Colagenasa y elastasa, proteasas lisosómicas, activadores plasminógenos), productos relacionados con procesos de defensa (Lisozima, Componentes del complemento-C2,C3,C4 y C5-Interferon-Pm.45000D) y productos moduladores (Proteína mitogénica-15000D-,factores diferenciadores, Citotoxi-

nas y productos de bajo peso molecular).

A diferencia de otras células implicadas en los procesos de inmunidad celular, los macrófagos representan el componente inespecífico de aquellos. Y es el componente inespecífico, porque su activación se efectúa posiblemente tras el contacto con factores solubles (linfoquinas) segregados por Linfocitos T activados por el antígeno desencadenante de la respuesta inmune celular.

Sin embargo, las funciones descritas para los macrófagos, son numerosas, y al parecer intervienen colaborando con otros tipos celulares en diversos procesos inmunes. Entre estas funciones se han descrito:

a) Interacción Macrófagos-Células T. (PARASKEVAS y col., 1979). Fig. III.11.



La interacción, transcurre en varias etapas, inicialmente, tras el contacto del antígeno con el macrófago, éste segrega una sustancia de bajo peso molecular con grupos SH libres, que actúa sobre una población de células T que carecen de receptores para la porción Fc de las Inmunoglobulinas. Estas células T Fc⁻, segregan IACF (factor favorecedor de la formación de complejos antígeno - anticuerpo). Los complejos Ag-Ac formados, son recogidos por células T Fc⁺, que amplificarían la formación de Anticuerpos, frente al antígeno desencadenante.

Además de este tipo de interacción macrófago-célula T, para aumentar la respuesta de anticuerpos; se ha comprobado como necesaria, la interacción de los monocitos con las células T, para que estas puedan responder optimamente al tratamiento con ConA (KAZURA y col., 1979). Basándose en la necesidad de esta interacción para las respuestas blastogénicas, se emplean sustancias del tipo del Levamisole, sustancias cuyo efecto es favorecer la asociación Monocito-Linfocito.

b) Interacción Macrófago-célula diana recubierta de Anticuerpos.

Básicamente, el contacto se realiza a través de la porción Fc del anticuerpo fijo a la superficie de la célula diana. Los cambios posteriores al contacto inicial, son variables, pudiendo consistir en: Fagocitosis de la célula diana (BENNET.,1964; EVANS.,1971), Lisis (ZIGHELBOIM y col.,1973; MANTOVANI y col.,1977; JOLLEY.,1976), Inhibición del crecimiento (PASTERNAK.,1978), Incremento de la fragilidad osmótica (SCORNIK.,1978a); de una forma o de otra la finalidad es la destrucción de la célula diana. Sin embargo, a veces se ha observado que la interacción macrófago-célula diana da lugar a la protección de la misma por inactivación del anticuerpo fijo en su superficie (HERSEY.,1973; JOLLEY y col.,1976). La explicación de que exista destrucción o protección de la célula diana, no es clara, suponiéndose causada por el distinto grado de estimulación del macrófago o a la presencia de otros factores no bien determinados (HALLORAN y STYLIANOS.,1978-1979).

Otras funciones asignadas a los monocitos son, su capacidad para inhibir la ADCC (citotoxicidad dependiente de anticuerpo) y la lisis mediada por complemento (HALLORAN.,1979), la lisis de eritrocitos humanos mediada por macrófagos también humanos (HOLM y col.,1974), la destrucción de células tumorales (MANTOVANI y col.,1977, SHAW y col.,1978; ZIGHEBOIM y col.,1973; JOLLEY y col., 1976) o su citostasis (PASTERNAK y col.,1978) en estudios "in vitro" o "in vivo" (MILLER y FELDMAN.,1977; HASKILL y FETT.,1976; SCORNIK y KLEIN.,1978b y c).

Para finalizar, los macrófagos, son responsables de las respuestas inflamatorias en las reacciones inmunes mediadas por células, o en reacciones inflamatorias crónicas no causadas por procesos inmunes.

III.4. Células Inflamatorias.

Con este nombre genérico, se denominan una serie de células responsables de procesos inflamatorios. Básicamente, son tres los tipos celulares involucrados:

-Granulocitos: A este tipo de leucocitos pertenecen los Neutrófilos (que constituyen del 50 al 60% del total de los leucocitos periféricos, en el hombre), que poseen receptores para los factores quimiotácticos derivados de la rotura de los componentes C3 y C5 del complemento, liberando ellos mismos un factor quimiotáctico para otros neutrófilos. Contienen receptores para la fracción Fc de las IgG y capacidad fagocítica. Intervienen en reacciones mediadas por complejos Antígeno-Anticuerpo y Complemento (especialmente en las inflamaciones bacterianas agudas).

El otro grupo de granulocitos que intervienen en procesos inflamatorios son los Eosinófilos (Del 1 al 5% del total de leucocitos periféricos en humanos), que constituyen un componente frecuente en reacciones alérgicas, al igual que los Basófilos.

-Mastocitos:son frecuentes en reacciones donde hay aumento de los valores de IgE. Tanto este ti

po celular como los basófilos contienen gránulos de ami
nas vasoactivas.

III.5. Células Nulas

Constituyen una subpoblación de células linfoides diferenciada perfectamente de las células T y B ,
Fig.III.12

	<u>Célula B</u>	<u>Célula Nula</u>	<u>Célula T</u>
%del total de linfocitos	5-10%	5-10%	80-90%
IgM e IgD en membrana	+	-	-
IgG en membrana	+ -	+	-
Rosetas E	-	-	+
Estabilidad Ig de superficie.	Estable	Lábil	-
Reexpresión de Ig de superficie	Reexpresa IgM e IgD	No reexpresa IgG	-

Fig.III.12. Características diferenciales entre las poblaciones celulares linfoides, B, T y Nulas.

Sin embargo, las células Nulas, no parecen representar una población homogénea. Pues, si utilizamos la presencia de receptores para C3b, como criterio discriminador, se ha observado que la mayor parte de las células Nulas carecen de ellos, sin embargo, del 20 al 30% de la población total de células Nulas sí expresan esos receptores para C3b y para la Fc de Inmunoglobulinas; Este porcentaje expresa además el antígeno p,23,30 a semejanza de las células B. A este 20-30% de la población de células Nulas, se le supone una función citotóxica en los ensayos de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de Anticuerpo), representa por tanto las denominadas células K mediadoras en ADCC.

Otras características de estas células son: su incapacidad para proliferar al estimularlas con antígenos solubles o células alogénicas; su incapacidad para lisar linfocitos alogénicos en CML (linfólisis mediada por células); Segregan Inmunoglobulinas.

Se piensa, por otra parte, que las células Nulas, que no expresan el antígeno p23,30, tendrían la capacidad de diferenciarse en cualquier célula hematopoyética

o linfoide.

Una tercera subpoblación de células Nulas, parece haberse detectado, las denominadas células "Natural Killer"; son células con una serie de marcadores idénticos a las células K que median en ADCC, pero con un mecanismo efector diferente. Estas células NK, poseen igualmente Receptores de Fc, pero las células dianas no las reconocen por ese receptor, sino por otros específicos para cada diana. O lo que es igual, existirían distintas poblaciones de células NK, cada una con especificidad para un tipo concreto de célula diana. Fig.III.13

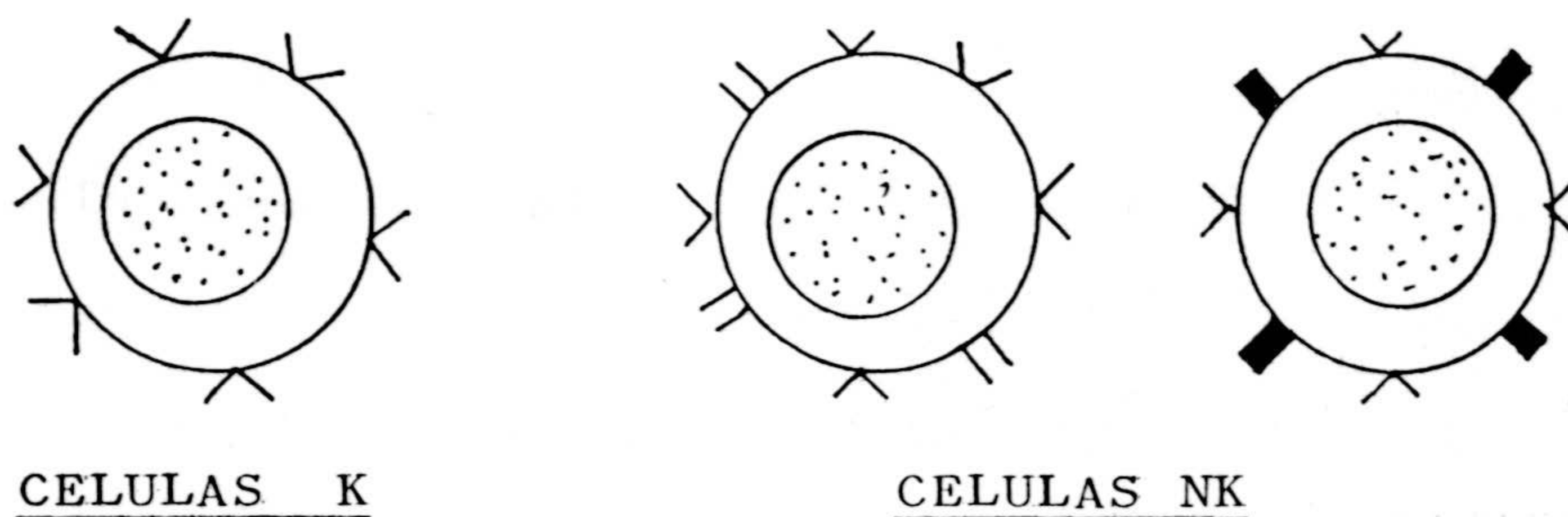


Fig.III.13. Relación entre las células K que median en ADCC y las células NK

- > Receptores Fc
- ▣ ■ Zona de reconocimiento de las células diana.

IV. RECEPTORES.

IV.I. Reconocimiento y comunicación intercelular.

El título de este apartado, alude a la necesidad (de cualquier célula integrada en un organismo pluricelular) ineludible de reconocer y comunicarse con el resto de las células del mismo organismo. Mas aún, si las células consideradas son, como en nuestro caso, las encargadas de proteger al organismo ante cualquier disturbio en su integridad antigénica.

Es evidente, y todos los estudios realizados lo confirman, que la primera estructura que le permite a una célula su vida de relación, es la membrana celular (Ver Apartado I). Pero en último término es el potencial génico de la célula el condicionante de su vida social. De acuerdo con esto, es bien sabido, que una determinada célula y en un momento concreto, está transcribiendo sólo una pequeña parte de su amplio genotipo. La elección por parte de la célula del fragmento a transcribir en

cada momento de su existencia, deberá ser inducida o desencadenada por algún tipo de señal. Señal que podría ser intracelular o extracelular, de acuerdo con la localización de la estructura celular que se activa en su presencia.

Pero, puesto que en nuestro trabajo, se han utilizado Lectinas y lipopolisacáridos bacterianos, cuya capacidad de inducir la transformación blástica de los linfocitos es debida a su interacción con estructuras externas de la membrana celular, serán estas estructuras externas (Receptores de membrana) y las señales extracelulares reconocidas por ellas, el objeto de nuestro estudio.

El tipo y número de estos receptores de membrana, condicionarán el mundo sensitivo de una determinada célula (Fig. IV.1). Y logicamente, existen una serie de procesos que conectarán la activación de un receptor ante el contacto con una señal, con una determinada función celular (función que debe ser la adecuada a la señal recibida por la célula).

El problema de este esquema: Señal--Estímulo del Receptor--Función celular adecuada, reside en que la señal desencadenante de los eventos, es normalmente una molécula de mayor o menor complejidad. La diversidad de estas moléculas (se conocen cientos de ellas) y la posibilidad que actúen en todo el organismo (algunas hormonas) o en una zona muy limitada de la superficie celular (unos 100Å^2 en la unión neuromuscular) ha permitido solo en pocos casos conocer su mecanismo de acción. Es posible que en un futuro no muy lejano sea factible la comprensión del lenguaje intercelular, continuando los estudios de estas moléculas.

En general todas esas señales químicas funcionan como un mensaje en código. La célula o células emisoras de la señal, poseen la información para emitirla. La señal en sí, no tiene nada de especial, puede incluso ser una molécula muy simple. Esta simplicidad permite que una única célula diana, pueda recibir varias señales simultáneamente. Todas esas señales, serán descifradas por la célula diana (el código para descifrarlas, se localiza en su genoma) emitiendo la respuesta adecuada.

Esas respuestas celulares pueden llegar a ser muy complelas, al poseer la célula receptores separados para distintas señales que lleguen simultáneamente a su superficie.



Fig. IV.1. Receptores detectados en la superficie de los linfocitos y que determinan su mundo sensitivo.

Todas esas respuestas, deben estar, a su vez, controladas por un adecuado mecanismo "feed-back", que determine la finalización de las mismas. El resultado, es que en condiciones normales, la sociedad celular sigue unas normas de comportamiento muy estrictas. La alteración de estas normas o el empleo de un lenguaje distinto, puede convertir a una célula normal en un auténtico bárbaro que despreciará todas esas normas de vida en sociedad pudiendo transformarse en un clon de células cancerosas que terminen con la existencia del organismo portador.

IV.2. Localización y Concepto de Receptor.

Los receptores, son estructuras, basicamente con naturaleza proteica, localizadas en las membranas celulares y que tienen como función acoplar el reconocimiento a la respuesta celular.

Podrían estar constituidos por una única proteína. Sin embargo, es mas probable que el receptor sea una estructura compleja constituida por varias subunidades con funciones distintas (Fig.IV.2) (RODBELL.,1972; GREAVES.,1975).

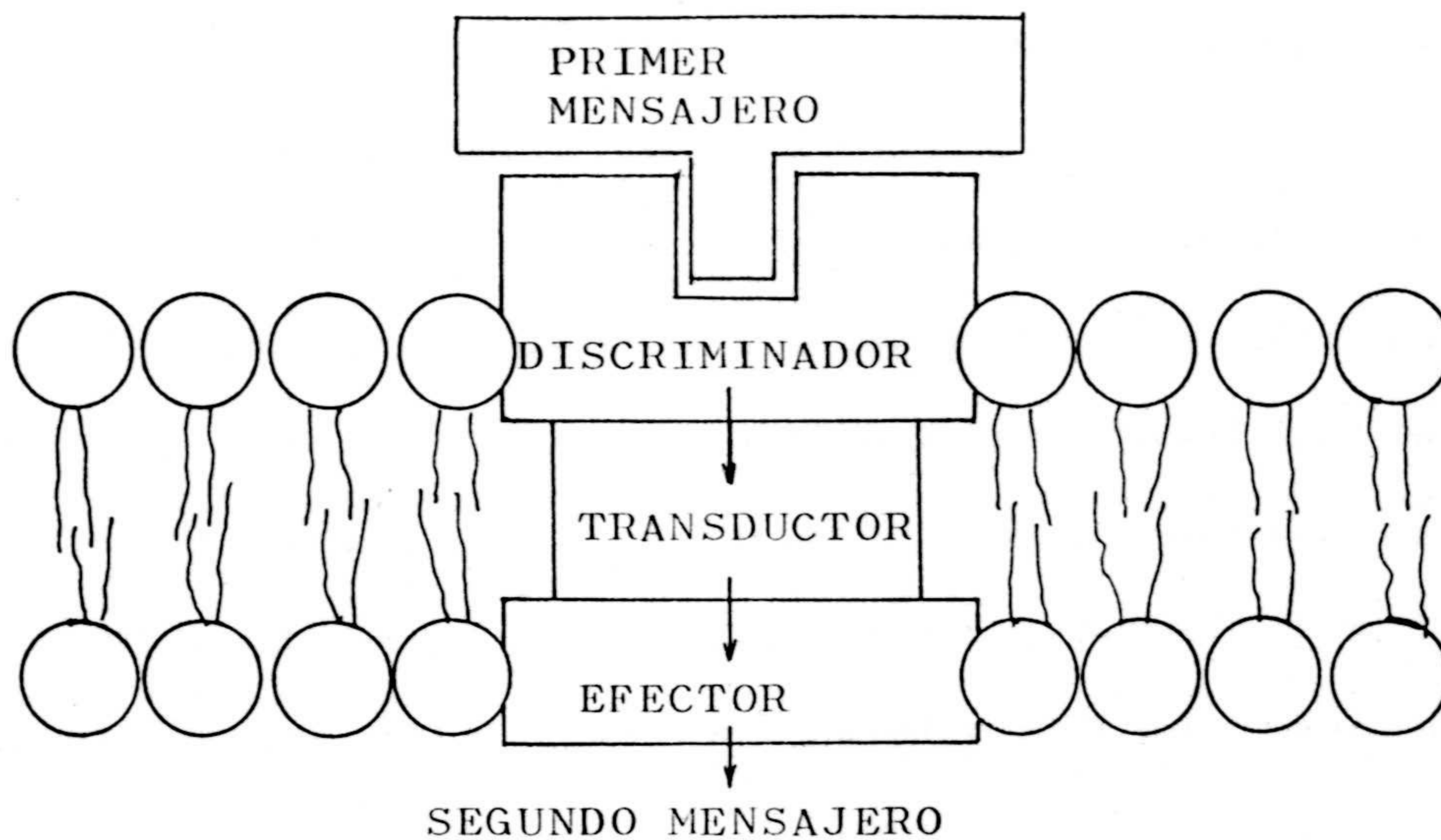


Fig.IV.2. Estructura y disposición de las subunidades de un hipotético receptor en la membrana.

Esas subunidades, se han denominado de acuerdo con la función desempeñada:

-Discriminador: Es una estructura proteica o glicoproteica (parece ser que esto último es mas frecuente) con capacidad para detectar señales originadas en el me dio extracelular. Posiblemente presencia o ausencia de algún componente.

-Transductor: Estructura encargada de transportar la primera señal originada por la unión ligando-Discriminador, a la estructura efectora, mediante una segunda señal.

-Efector: La activación del mismo por la segunda se ñal generada por el Transductor conecta el cambio inicia do en el Discriminador con una determinada respuesta ce lular. Las estructuras Efectoras, en sistemas conocidos poseen actividad enzimática (Adenil ciclase, Guanil ciclase, ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ ...). El efecto final del efector, es sintetizar o permitir la síntesis del denominado Segundo mensajero. Este segundo mensaje ro es una molécula sencilla (AMPc, GMPc,...), al menos

en los sistemas estudiados. Posiblemente puedan existir otros tipos de segundos mensajeros.

IV.3. Especificidad del Discriminador.

La causa final de la misma, al igual que en las interacciones Enzima-Sustrato, es la estereoespecificidad del Discriminador, o en ocasiones del ligando (esto ocurre cuando empleamos Lectinas como ligandos).

La unión ligando-Discriminador, unión que es estereoespecífica, se mantiene al establecerse enlaces entre ellos. Estos enlaces, fundamentalmente corresponden a tres tipos: Puentes de Hidrógeno, Interacciones de Van der Waals e Interacciones Electrostáticas (Fig .

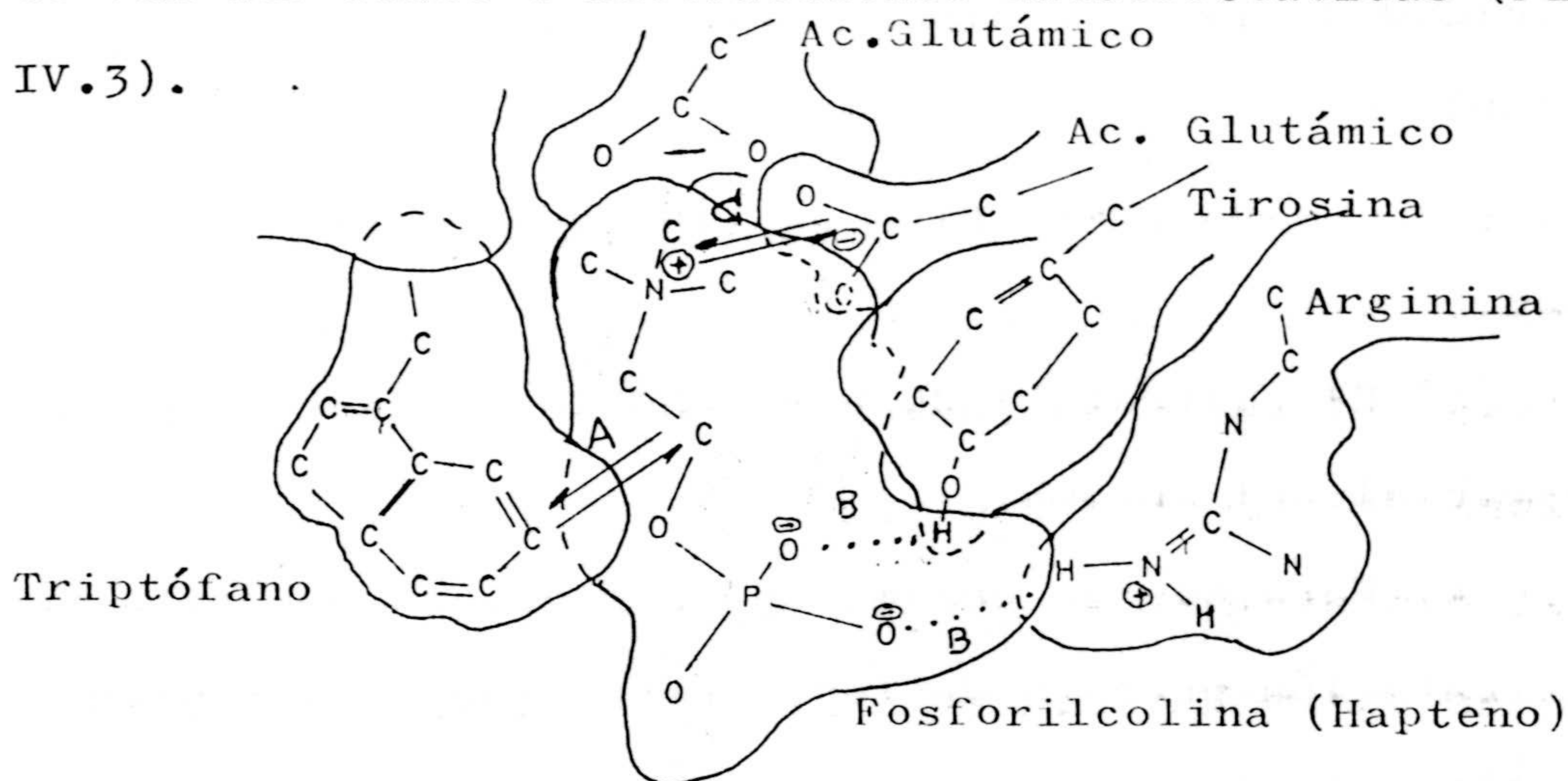


Fig.IV.3. Interacciones que mantienen la unión Hapteno anticuerpo. A. De Van der Waals. B. Puentes de H. C. Electrostáticas. (CAPRA y EDMUNSON., 1977).

IV.4. Modelos propuestos para que se alcance la estereoespecificidad ligando-Discriminador.

IV.4.1. Modelo de llave-Cerradura (FISCHER).

De acuerdo con este modelo, tanto el ligando como el Discriminador poseen una estructura espacial perfectamente definida y siempre constante. Solo podrán reconocerse aquellas parejas Ligando-Discriminador que posean disposiciones espaciales complementarias. (Fig. IV.4). Es un modelo no aceptado actualmente.

IV.4.2. Modelo del ajuste inducido

Modelo basado en la denominada elastoplasticidad enzimática; nombre asignado a la característica plasticidad de las proteínas por el autor del mismo (KOSHLAND).

Los principios por los que se rige este modelo son:

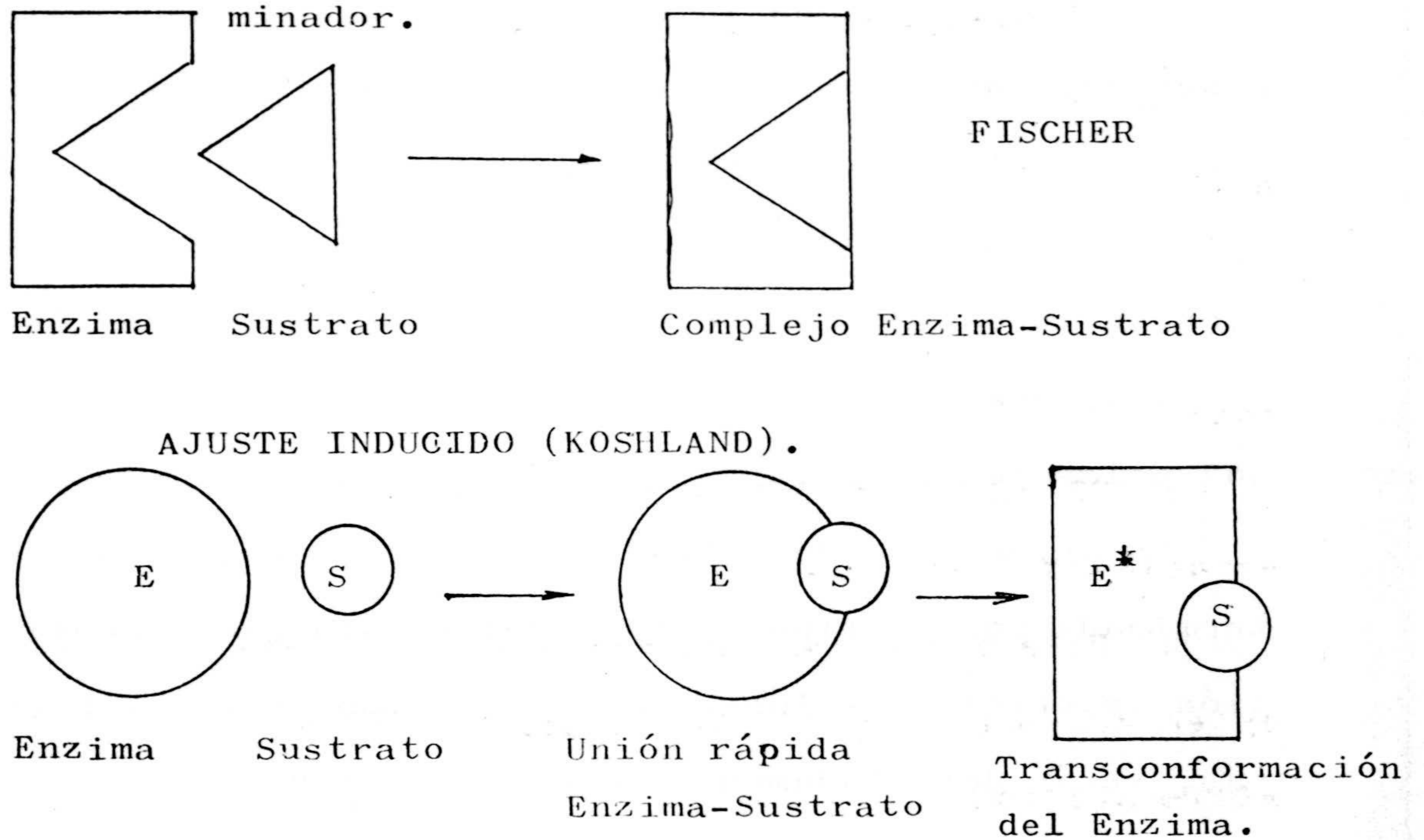
a) El sustrato induce un cambio en la configuración espacial del enzima.

b) Para que un enzima sea activa, se necesita una orientación precisa de los centros que constituyen su sitio activo.

c) El sustrato induce su propia orientación mediante el cambio que ha inducido en la configuración del enzima. (Fig. IV.4)

Ambos modelos fueron originalmente propuestos para explicar la especificidad enzimática y las interacciones Enzima Sustrato. Dado que las interacciones ligando Discriminador poseen unas características similares; se aceptan los mismos modelos para explicar sus interacciones.

Fig.IV.4. Modelos de interacción Ligando-Discriminador.



La descripción de las transiciones alostéricas dio nacimiento a nuevas teorías para explicarlas. Entre ellas el "Alosterismo" propuesto por MONOD, CHANGEUX y JACOB, el denominado "Modelo Secuencial" propuesto por KOSHLAND e incluso el denominado "Mecanismo Flip-flop" descrito por LAZDUNSKI para explicar el particular mecanismo de algunos enzimas.

IV.5 Cambios en la membrana celular tras la interacción Ligando-Discriminador.

Una vez alcanzada la unión entre el Ligando y el Discriminador, se originan una serie de cambios en la membrana celular, redistribución de los receptores, Alteración del grado de fluidez, aumento de la captación de iones y/o metabolitos, reorganización de los fosfolípidos de membrana y activación de enzimas ligados a las membranas.

La intensidad de estos posibles cambios, vendrá determinada por el tipo de ligando; puesto que a continuación describiremos los cambios inducidos por las Lectinas, serán detalladamente descritos entonces.

IV.6. Esquema general de la activación de una función celular, inducida por la unión de un ligando a un Discriminador.

Se ha propuesto el esquema considerado en este apartado, para explicar la acción de aquellos neurotransmisores (Dopamina, Serotonina, Norepinefrina, Histamina y Octopamina) con capacidad de estimular Adenilciclasas específicas (moléculas efectoras). Los receptores de estos neurotransmisores tienen en común activar la síntesis del mismo "Segundo Mensajero", AMPc. La especificidad diferencial de los distintos receptores, vendrá por tanto condicionada por la estructura Discriminadora del Receptor.

El Segundo Mensajero generado, AMPc, posiblemente provoque dos tipos de respuesta celular, una inmediata (aumento de la permeabilidad a los iones) y otra a largo plazo consistente en la desrepresión de determinados genes y/o la represión de otros diferentes.

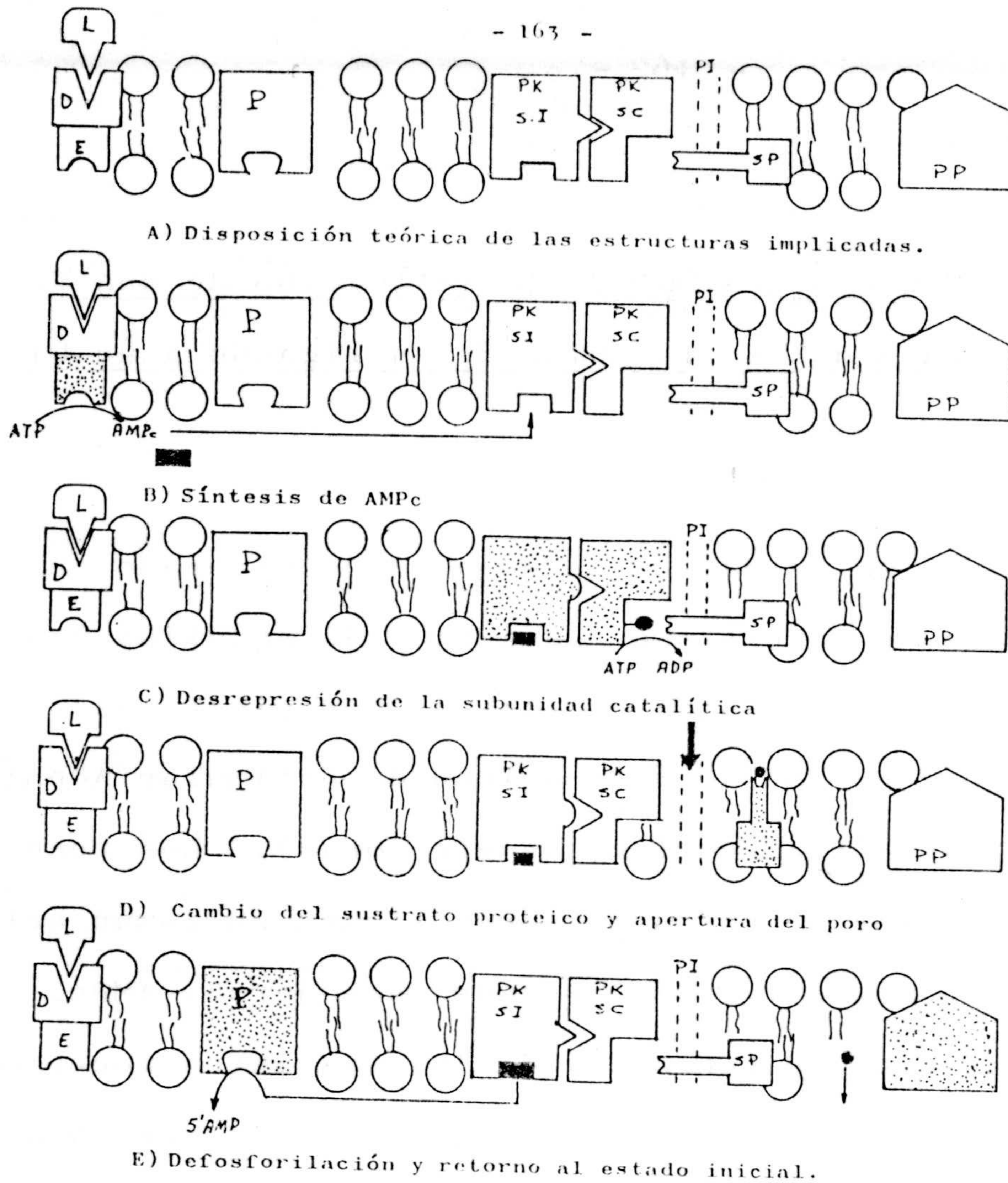


Fig. IV.5. Respuesta celular rápida (a nivel de membrana) ante la presencia de un neurotransmisor.

L: ligando (Neurotransmisor). D: Discriminador. E: Efecto_r (Adenil-ciclasa). P: Fosfodiesterasa. PK: proteín-quinasa. SI: Subunidad inhibidora de la proteín-quinasa. SC: subunidad catalítica. PI: poro iónico. SP: sustrato proteico. PP: Fosfoproteín-fosfatasa.

IV.6.1. Respuesta celular rápida a la interacción
Ligando (Neurotransmisor) Discriminador. (Fig.IV.5)

Esta respuesta celular rápida, consiste en una serie de cambios con una duración inferior a 5 segundos, cambios localizados en estructuras presentes en la membrana. La disposición de esas estructuras podría ser la esquematizada en el apartado A de la Fig.IV.5.

La unión del neurotransmisor al Discriminador, activa la estructura efectora: ADENILCICLASA, este enzima cataliza la síntesis de AMPc, empleando como sustrato moléculas de ATP.

El AMPc sintetizado, se une a la subunidad inhibidora del enzima PROTEINQUINASA, desactivándola. A consecuencia de esto, la otra subunidad del enzima, la subunidad catalítica, queda activa y empleando como sustrato moléculas de ATP, transfiere grupos fosfato del mismo a un SUSTRATO PROTEICO. La fosforilación de éste, origina un aumento en la permeabilidad a los iones, bien porque cambie su configuración al fosforilarse o bien porque active una bomba enzimática encargada de un transporte de iones. Esa entrada rápida origina un cambio en el potencial eléctrico celular.



El restablecimiento de las condiciones iniciales de la membrana, se consigue por la acción de dos enzimas: FOSFODIESTERASA, que empleando como sustrato AMPc, lo transforma en 5'AMP; regenera los niveles iniciales de AMPc. El otro enzima es una FOSFOPROTEINFOSFATASA, su sustrato, es el denominado sustrato proteico fosforilado. La actividad de este enzima, lo defosforila, volviendo a su estado inicial y cerrándose el poro iónico.

Todos estos procesos tienen lugar en un lapso de tiempo muy corto, permiten a la célula unas respuestas inmediatas tras la presencia del primer mensajero en el medio (Neurotransmisor en este caso, pero podría ser otro cualquiera). Sin embargo, no son los únicos cambios producidos en la célula, aunque sí los mas evidentes.

La célula posee además capacidad de elaborar respuestas mas complejas y a largo plazo. La elaboración de este tipo de respuestas es menos conocida, aunque en los últimos años se ha conseguido describirla en parte.

IV.6.2. Respuesta celular a largo plazo tras la interacción Ligando(Neurotransmisor)-Discriminador.

El mecanismo iniciador, es posiblemente el mismo que desencadena la respuesta celular a corto plazo y al menos en ciertos sistemas, ambas respuestas se inician simultaneamente. (Fig.IV.6)

La vía posible de este tipo de respuesta a largo plazo discurriría en las siguientes fases:

- a) Unión del AMPc a una proteinquinasa soluble (localizada bien en el citoplasma, bien en el núcleo celular). Esta unión activa la subunidad catalítica de la proteínquinasa.
- b) Fosforilación de una histona, que unida al ADN estaba impidiendo la transcripción. Esta fosforilación catalizada por el enzima Proteínkinasa debilita la unión de la Histona al ADN, permitiendo el acceso de la ARNasa y la transcripción.
- c) Traducción del ARNm, y síntesis de los productos (proteinas estructurales, enzimas...)responsables de la respuesta celular.

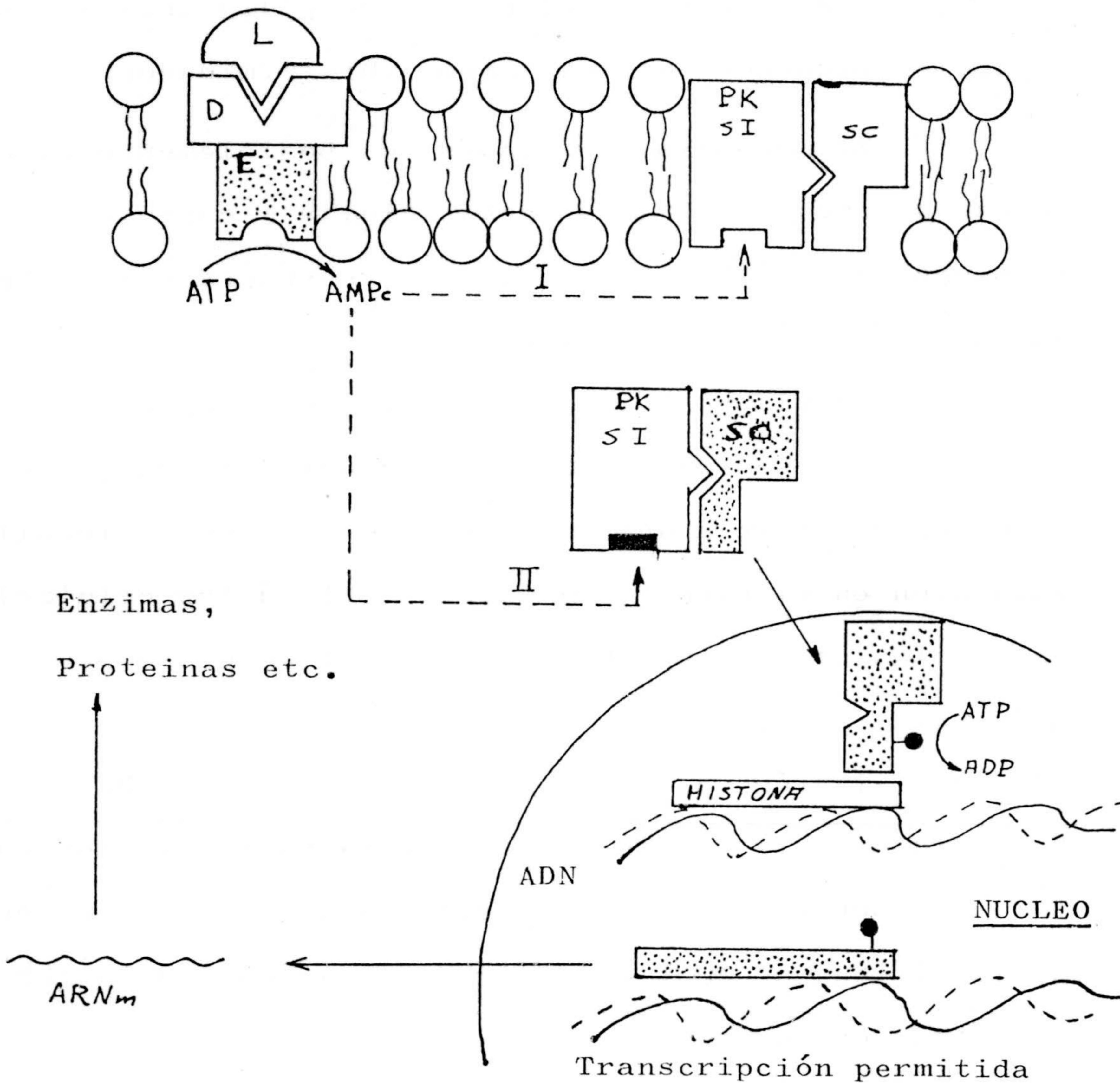


Fig. IV.6. Esquema del posible mecanismo de las respuestas celulares a largo plazo, tras el contacto de un ligando(L) con el discriminador específico del mismo (D) presente en la membrana celular.

Es interesante conocer que no todos los Receptores se localizan en la membrana celular. Concretamente, los receptores de Hormonas esteroideas presentan una localización intracelular.

V. TIPOS DE RECEPTORES.

Es evidente, que un estudio sistemático de todos los receptores presentes en la membrana de los linfocitos y células relacionadas, no sería de gran utilidad para el estudio que estamos realizando. Dado que a nosotros nos interesan fundamentalmente los receptores de Lectinas, y otros de interés en la respuesta inmune o utilizados en el aislamiento de algunas poblaciones de células linfoides.

V.1. Receptores para la Fracción constante de las Inmunoglobulinas. (Receptores Fc).

Inicialmente se detectó como receptor específico de la porción constante de las Inmunoglobulinas G,

solo cuando las inmunoglobulinas están agregadas o formando complejos antígeno anticuerpo. Se pensó además que sólo poseían este receptor los linfocitos de la serie B. El conocimiento de este Receptor supuso un enorme adelanto en las técnicas de aislamiento de las células B; ya que al poner eritrocitos de carnero recubiertos con IgG-anti eritrocitos de carnero en presencia de linfocitos B, se originan rosetas denominadas EA (Fig. V.1).

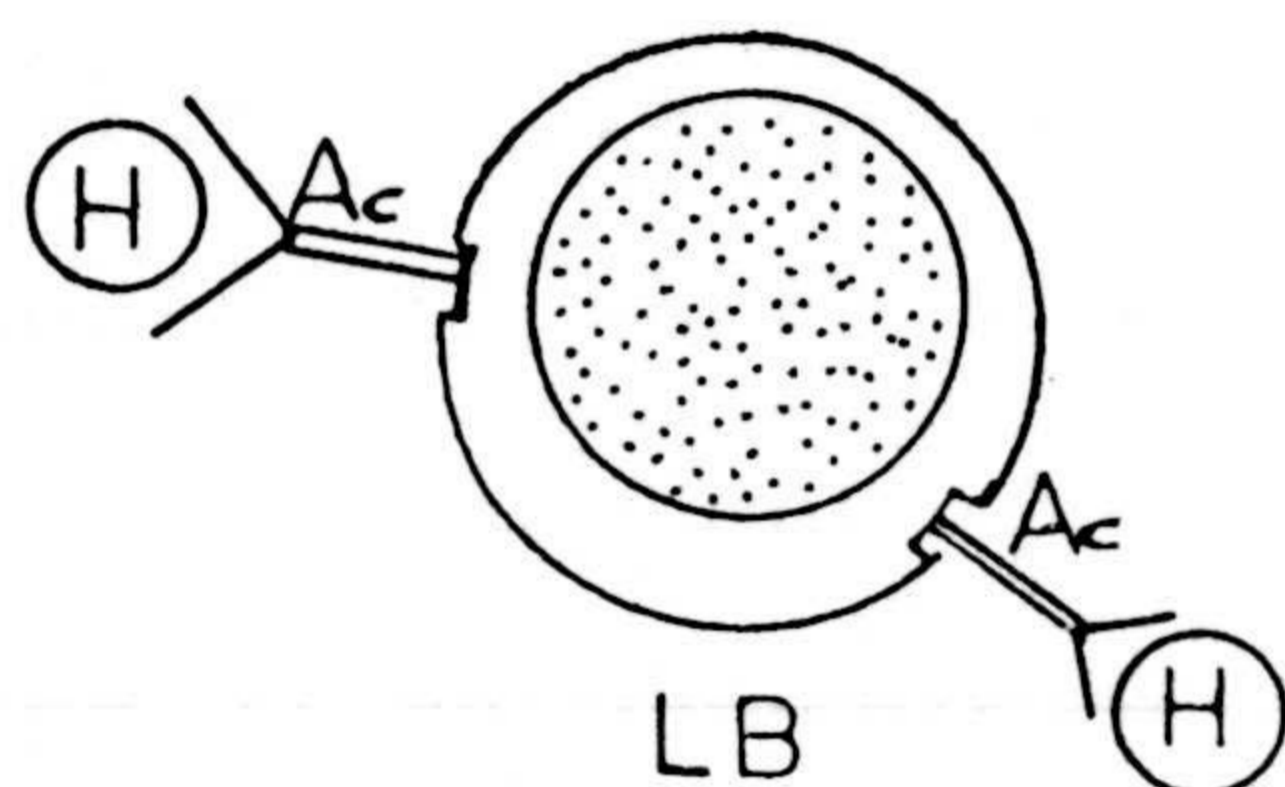
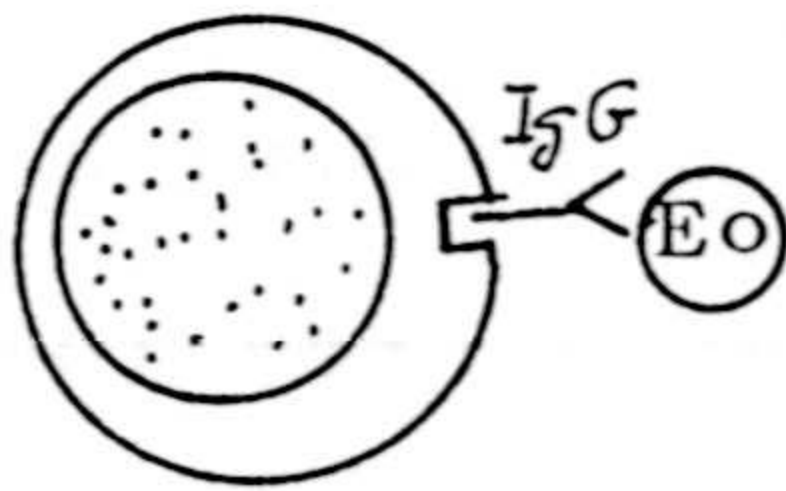


Fig.V.1, Esquema de una roseta EA,
H:Eritrocito de carnero. Ac: anti-
cuerpo-anti eritrocitos de carnero
(IG-G). \sqcup :Receptor Fc.

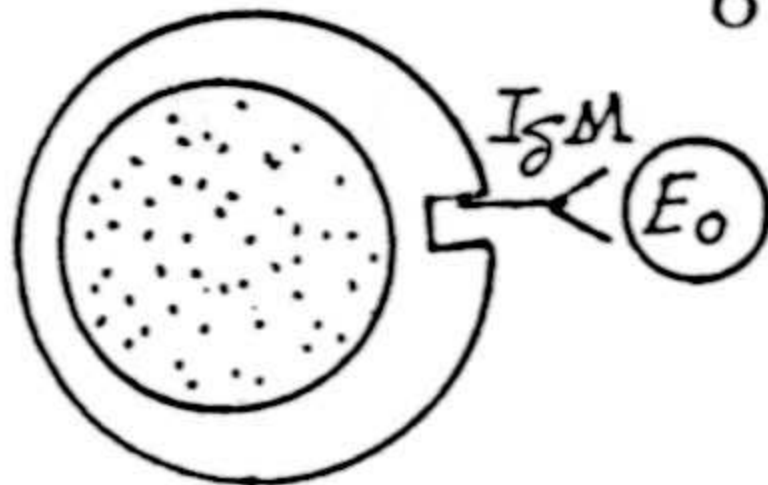
Pero, hoy se sabe que este receptor no une sólo Fc de la Ig-G, al menos se conocen receptores para la porción constante de las cadenas μ , γ y ϵ . El porcentaje, en sangre periférica de humanos, de células con receptores para cada uno de estos tipos de cadenas, ha sido determinada recientemente (SPIEGELBERG y DAINER, 1979), Fig. V.2), utilizando eritrocitos de buey.

a) Rosetas $E_o A_G$: Valores normales: $22 \pm 5.8\%$. Aunque



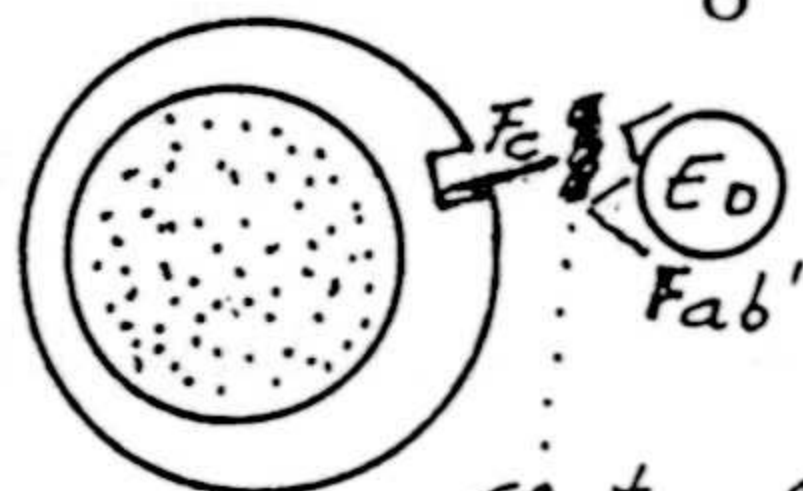
en leucemias linfáticas crónicas, leucemia celular linfosarcoma y leucemia linfática aguda, pueden alcanzar valores del $65 \pm 15\%$.

b) Rosetas $E_o A_M$: Valores normales: $1.2 \pm 5.8\%$. Aunque



pueden alcanzar valores del orden de $37 \pm 22\%$ en algunas de las patologías indicadas para las rosetas $E_o A_G$.

c) Rosetas $E_o A_E$: para conseguir estas rosetas, hay que



emplear fragmentos Fc de IgE procedente de un mieloma, glutaraldehído y Fab'

de anticuerpo de conejo anti Eo. Los valores normales aproximadamente son $1.8 \pm 0.7\%$.

Fig.V.2. Rosetas EA. Tipos y valores normales en humanos.

Aunque el receptor que estamos considerando, no se ha identificado su estructura, sí sabemos que es distinto del receptor del complemento, y que aunque limitado en principio a su expresión en los linfocitos B, hoy sabemos que no solo se expresa en estos; se ha detectado además en neutrófilos, fagocitos mononucleares, células nulas, linfocitos T, macrófagos , en un porcentaje de células NK (Natural killer) y en las células K que median en ADCC.

Por todo ello, este receptor no solo se emplea como marcador diferencial para aislamiento de linfocitos B, sino como un marcador mas en la diferenciación de subpoblaciones celulares:

-Células B Fc γ^+ : o con receptores para la Fc de la Ig-G (en ratón).

Representan las células B supresoras de la síntesis de anticuerpos no específicas del antígeno (MIYAMA y col.,1979). El efecto supresor es realizado por un factor (SBF), segregado por las mismas células BFc γ^+ , resistente a la tripsina, termolábil y con un Peso moleu

cular entre 30000 y 60000. Este factor es efectivo sobre dianas $B Fc \gamma^-$ singénicas o que al menos compartan con la célula productora del factor la zona derecha del complejo H-2.

La función de estas células, posiblemente sea controlar los niveles de Inmunoglobulinas, evitando su producción excesiva. Por similitud con la función desempeñada por las células T supresoras "feed-back", las podríamos denominar "Células B feed-back supresoras.

-Células $B Fc \gamma^-$: representan una subpoblación de células B precursoras de las células plasmáticas formadoras de anticuerpos en respuestas primarias y secundarias frente a DNP (MIYANA y col., 1979).

-Células $T Fc \mu^+$: Son una subpoblación de células T con receptores para la Fc de las Ig-M (MORETTA y col., 1975; McConnell y HUND., 1975). Parece ser que la expresión de este receptor está limitada a la población de células T_H (GUPTA., 1979). En la detección de estos receptores puede utilizarse la técnica descrita por FANGER y LIDIARD, (1979b). Conociéndose que la unión en

tre la Fc de la IgM y el Receptor se establece por el dominio C₄ de la Inmunoglobulina (CONRADIE y BUBB., 1977) y con la misma efectividad independientemente de que la Ig M utilizada esté en forma monomérica o pentamérica.

La expresión de este receptor, al igual que en otros sistemas, no es algo constante para una determinada célula; su capacidad de modulación, dependiente del estímulo antigénico, se ha descrito al menos en dos sistemas:

a) Utilizando linfocitos periféricos humanos estimulados con mitógenos (LYDIARD y FANGER.,1979) a dosis óptimas para su transformación blástica. Si el mitógeno empleado es PHA, a las 24 horas de cultivo, hay una desaparición irreversible de los receptores Fc μ ; pero si el mitógeno empleado es ConA, no tiene efecto en la expresión de los receptores Fc μ aunque si las dosis empleadas son supraóptimas sí existe inhibición en su expresión.

b) En linfocitos periféricos de conejo utilizando como estímulo antigénico Hemocianina de Lapa Keyhole (BIRCH y col.,1979) (Fig. V.3)

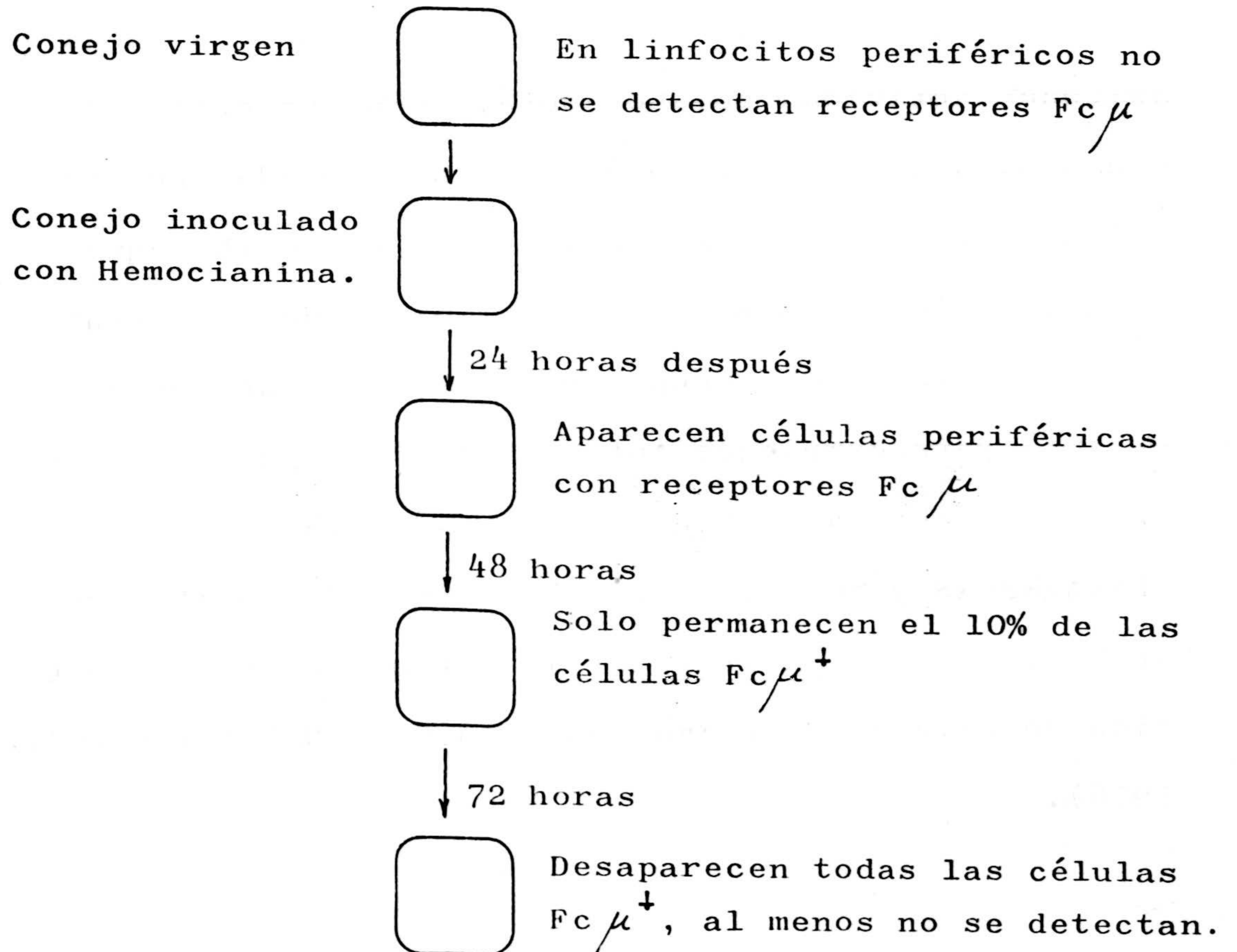


Fig. V.3. Modulación de la expresión de los receptores Fc μ en conejos inoculados con hemocianina de Lapa Keyhole (BIRCH y col., 1979).

En esta subpoblación T Fc μ^+ , a la que se le ha asignado actividad colaboradora, se ha descrito su capa cidad para incorporar moléculas Ia liberadas por los ma crófagos (LEE y PARASKEVAS.,1979). Es posible que la finalidad de estas moléculas Ia sea la de funcionar en estas células como receptores (distintos de los Receptores Fc) para complejos Antígeno-Anticuerpos presentes en los sueros, amplificando la respuesta de anticuerpos (PARASKEVAS y col.,1979). La actividad amplificadora se ha puesto de manifiesto "in vitro" en la diferenciación de células B estimuladas con PWM (MORETTA y col., 1976).

-Células T Fc γ^+ :

Corresponden a células T, detectadas tanto en el hombre (DICKLER.,1976) como en ratón (ANDERSON.,1974), habiendo mostrado actividad supresora de la diferenciación de células B en células plasmáticas en estudios realizados "in vitro" (MORETTA y col.,1977; GUPTA.,1979).

Es muy posible que estemos detectando con este marcador la población de células T $Ly-1^+2^-3^-5^+6^+Ia^+$ (pg.110) y que posiblemente correspondan a las únicas células T que responden al tratamiento con ConA y que han manifestado actividad supresora tanto de las respuestas de anticuerpos frente a eritrocitos de carnero "in vitro" (COOKE y col.,1979) como del MLR (KURIBAYASHI y col., 1979).

- Células T $Fc\gamma^-$: Son la subpoblación de células T que responden en el MLR (KURIBAYASHI y col.,1979), y en presencia de un producto de bajo peso molecular con numerosos grupos SH libres, segregado por los macrófagos tras el contacto con el Antígeno, sintetizan IACF (factor inductor de la formación de complejos antígeno-anticuerpo) segregándolo al medio.

-Células B $Fc\mu^+$: Descritas recientemente (FERRARINI y col.,1977; PICHLER y KNAPP.,1978), aún no se han descrito sus posibles funciones.

V.1.1. Receptores Fc y desarrollo de los granulocitos.

Se ha utilizado en neutrófilos humanos la expresión de este receptor (empleando la técnica de formación de rosetas EA_G) para la descripción de las distintas fases de diferenciación de los mismos:

<u>Tipo celular</u>	<u>% de Rosetas EA_G</u>
Promielocitos	0
Mielocito	5.3
Metamielocito	10.6
Neutrófilo segmentado	21.4
Neutrófilo	78.8
Neutrófilo periférico	98.9

Habiéndose asociado la presencia de Receptores Fc con las funciones fagocíticas de los granulocitos (LO BUGLIO y col., 1967; MESSNER y JEHNEK., 1970).

V.1.2. Receptores Fc y Macrófagos.

En macrófagos se han descrito receptores tanto para la porción Fc de las Ig-G como de las IgM.

En el caso de los receptores $Fc\gamma$, se han descrito dos tipos según el tipo de Ig-G que unan:

-Receptores $Fc\mu$, específicos para Ig-G monomérica. Esta forma de Ig-G, unida al macrófago, le confiere sus propiedades citofílicas. La unión receptor-Ig-G, se establece por la región CH2 de la Fc de la Inmunoglobulina.

-Receptores $Fc\gamma$, específicos para la IgG unida a anticuerpos o agregada por el calor. En este tipo, la unión se establece entre la región CH3 de la Fc de la inmunoglobulina unida al antígeno y el Receptor. Determinando esa unión la fagocitosis inmune del complejo. (SULICA y col.,1979).

La expresión del otro receptor Fc descrito en los macrófagos es menos frecuente; pues los receptores para la porción Fc de las IgM solo existen en el 0,7% de los monocitos humanos (los monocitos representan del 10 al 25% de los linfocitos humanos aislados con Fycoll) aunque este porcentaje puede alcanzar valores próximos al 35% tras el tratamiento de los mismos con Neuramini-dasa de *V. colerae* (HAEGERT.,1979).

Es interesante, por último, que los receptores Fc γ descritos en los macrófagos unen fundamentalmente la porción Fc de las subclases Ig-G₁ e Ig-G₃, muy poco la porción Fc de la Ig-G₂ y nada la Fc de la Ig-G₄ (BENACE RRAF y UNANUE., 1979). Y que en general, los receptores Fc, están ampliamente representados en diferentes poblaciones celulares además de las ya descritas; como hemáties de pollo a partir del 6º día de desarrollo embrionario (MARGUI y col., 1979) y en el 10% de las células epidérmicas de ratón (KRCO y col., 1979).

V.2. Receptores de Eritrocitos.

Este tipo de receptores muy estudiados en linfocitos humanos, parecen corresponder a dos estructuras diferentes, una con capacidad de fijar eritrocitos de ratón (formación de rosetas con estos eritrocitos) demostrado en una subpoblación de linfocitos B humanos (FORBES y ZALEWSKY., 1976) y otro, mejor estudiado, localizado en la membrana del 90-97% de los linfocitos T hu

manos (equivalente al 60-70% de los linfocitos humanos periféricos) y específico para eritrocitos de carnero. Este último receptor, en estudios de radioinmunoprecipitación, con extractos de linfocitos marcados con I^{125} , parece estar constituido por dos estructuras (OWEN y FANGER., 1976); Una de ellas designada como T_S (a su vez constituida por dos tipos de glicoproteínas: T_{S1} , de peso molecular 65000 y T_{S2} de Pm 30000) y $T_{\alpha 2}$, que posee naturaleza proteica y un peso molecular de 86000. Otras características de este receptor para eritrocitos de carnero, son: su sensibilidad al tratamiento con tripsina (CHISARI y col., 1977) y la posibilidad de extraerlo de la membrana de los linfocitos T empleando ClK 3M (PIKE y col., 1975).

Se emplea la formación de las denominadas Rosetas E, como un proceso normal en la purificación de las células T. (Fig. V.4).

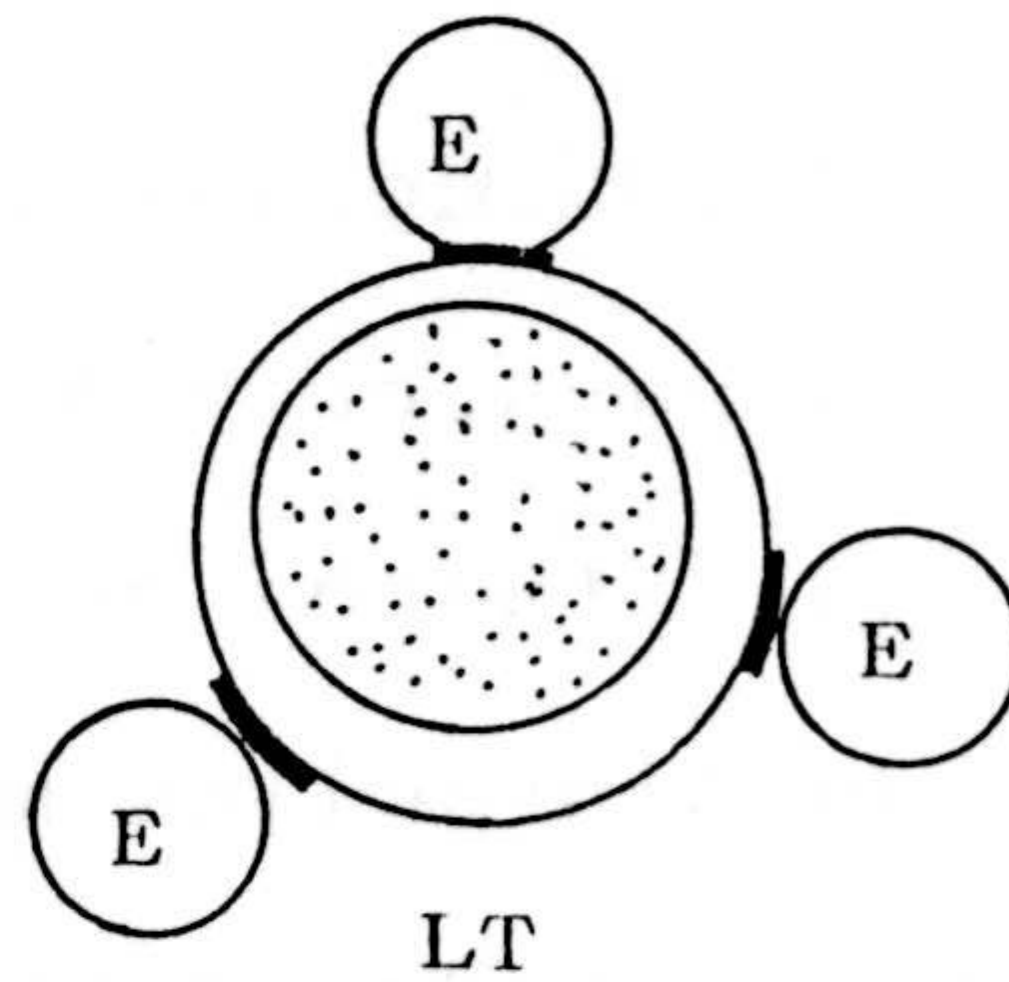


Fig.V.5. Esquema de una Roseta E, utilizada en identificación y purificación de linfocitos T.
E: Eritrocitos de carnero. — Receptor para esos Eritrocitos.

V.3. Receptores para el complemento.

Se conocen al menos dos tipos distintos. Uno para la fracción C3b y otro para C4b, siendo ambos sensibles al tratamiento con Tripsina; y aunque para ambos tipos, su unión a los componentes del complemento, es dependiente de la temperatura, dicha unión no requiere energía metabólica. Esas uniones son estables; denominándose células efectoras las que poseen estos receptores.

Se ha descrito su presencia en multitud de tipos celulares como linfocitos B, Neutrófilos, Monocitos, Macrófagos, Eritrocitos (solo en primates), plaquetas (conejo, roedores, gato, perro, pero no en Primates). En cuanto a su función, parece ser diversa dependiendo de la célula que los posee. Si la célula efectora tiene capacidad fagocítica, la unión a los componentes C3b ó C4b implica el intento, por parte de la misma, de fagocitosis del complejo Ag-Ac o de la célula diana a los que se han fijado esos componentes del complemento; por esta capacidad de los componentes C3b y C4b para fijar células efectoras, se les ha denominado Opsoninas. (Fig,V.6).

Pero si las células efectoras potencialmente poseen la capacidad de sintetizar anticuerpos, la función de los receptores del C', en este caso, es la de facilitar la unión complemento activado-célula efectora para estimular la síntesis de anticuerpos.

Sin embargo, en otras ocasiones, no se conoce la utilidad de este receptor. Tal es el caso de los hematíes humanos. En estas células se han detectado recep-

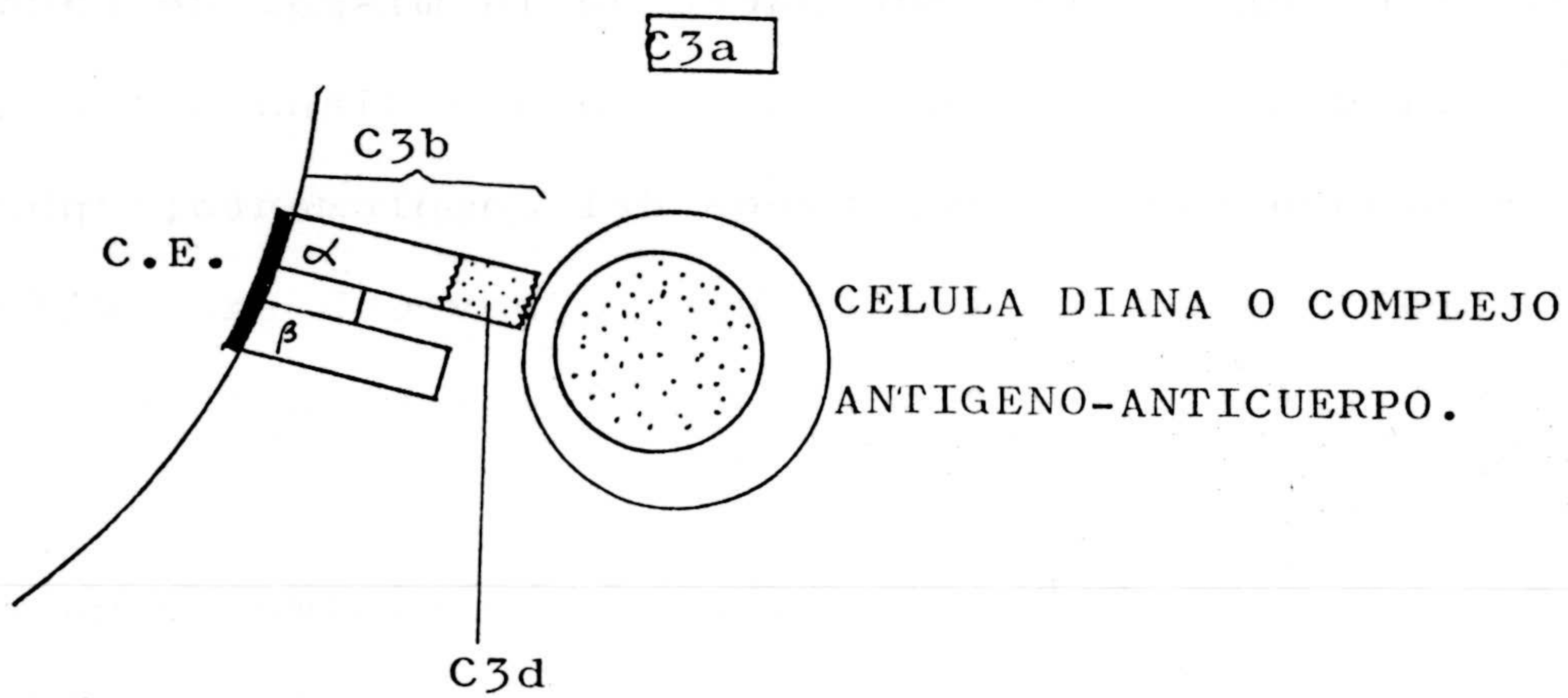
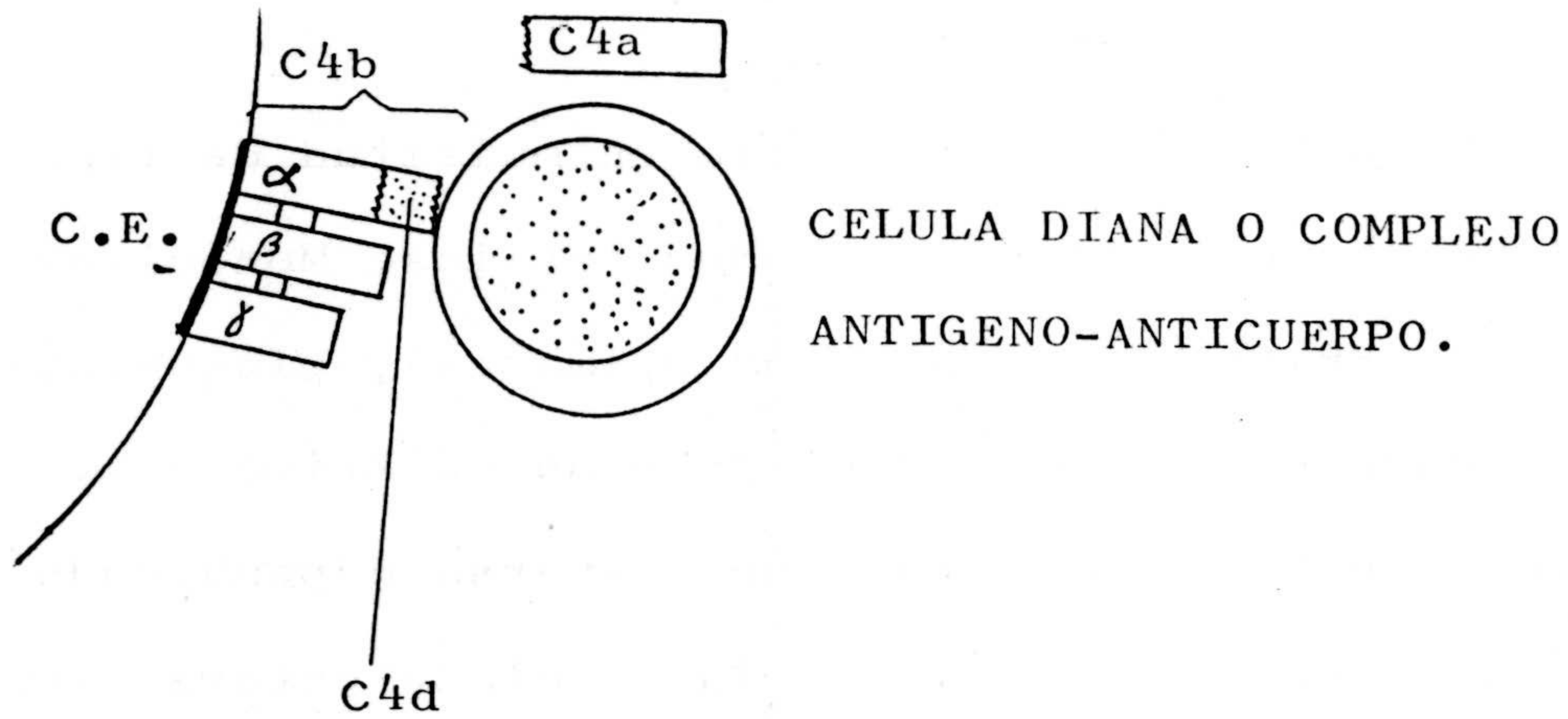


Fig. V.6. Esquema de la disposición de los componentes C3b y C4b en la membrana de las células efectoras (C.E.) en cuya superficie se encuentran los receptores para dichos componentes. La unión lábil del componente C4d ó C3d, se establece entre ellos y las células diana o complejos antígeno-anticuerpo.

tores para el complemento activos, y con capacidad para unirse a los componentes C3b y C4b fijos a una célula diana o complejo Ag-Ac; capacidad denominada adherencia inmune (FUDENBERG.,1978).

Estos receptores, a semejanza de los receptores de las Fc, presentan un cierto grado de modulación en su expresión. Esta modulación se ha comprobado al observar el efecto de factores quimiotácticos sobre los tipos celulares con capacidad potencial de expresarlos. Concretamente los factores quimiotácticos para eosinófilos humanos (ECF-A tetrapéptido -Val,Gly,Ser,Glu ó Ala, Gly,Ser,Glu-; Histamina e Imidazolacético) y para neutrófilos y monocitos (Formil-Met-Leu-Phe; Formil-Met-Met-Phe; y Formil-Met-Phe) aumentan la expresión de los receptores para C3b y C4b (AUWAR y KAY.,1978; KAY y col., 1979) a los 30-60' de incubación "in vitro". Estos resultados, nos permiten afirmar que la acción de los factores quimiotácticos, no se limita a inducir una migración direccional de las células a los lugares de inflamación ya que además, aumentan la posterior adhesión de las células a las partículas opsonizadas por el comple-

mento, derivándose de ello, la fagocitosis de la partícula opsonizada o la activación de la síntesis de anticuerpos, como se indicó anteriormente.

La búsqueda de receptores para el complemento, ha permitido explicar las lesiones renales que se producen en algunos procesos inmunes. Ya que se han descrito receptores para C3b en glomérulos renales humanos (GOLFAND y col.,1975; SOBEL y col.,1976; MORAN y col.,1977).

Para la detección de células portadoras de receptores del complemento, se utiliza la formación de rosetas EAC (eritrocitos, anticuerpo-IgGóIgM- antieritrocitos y complemento), Fig.V.7.

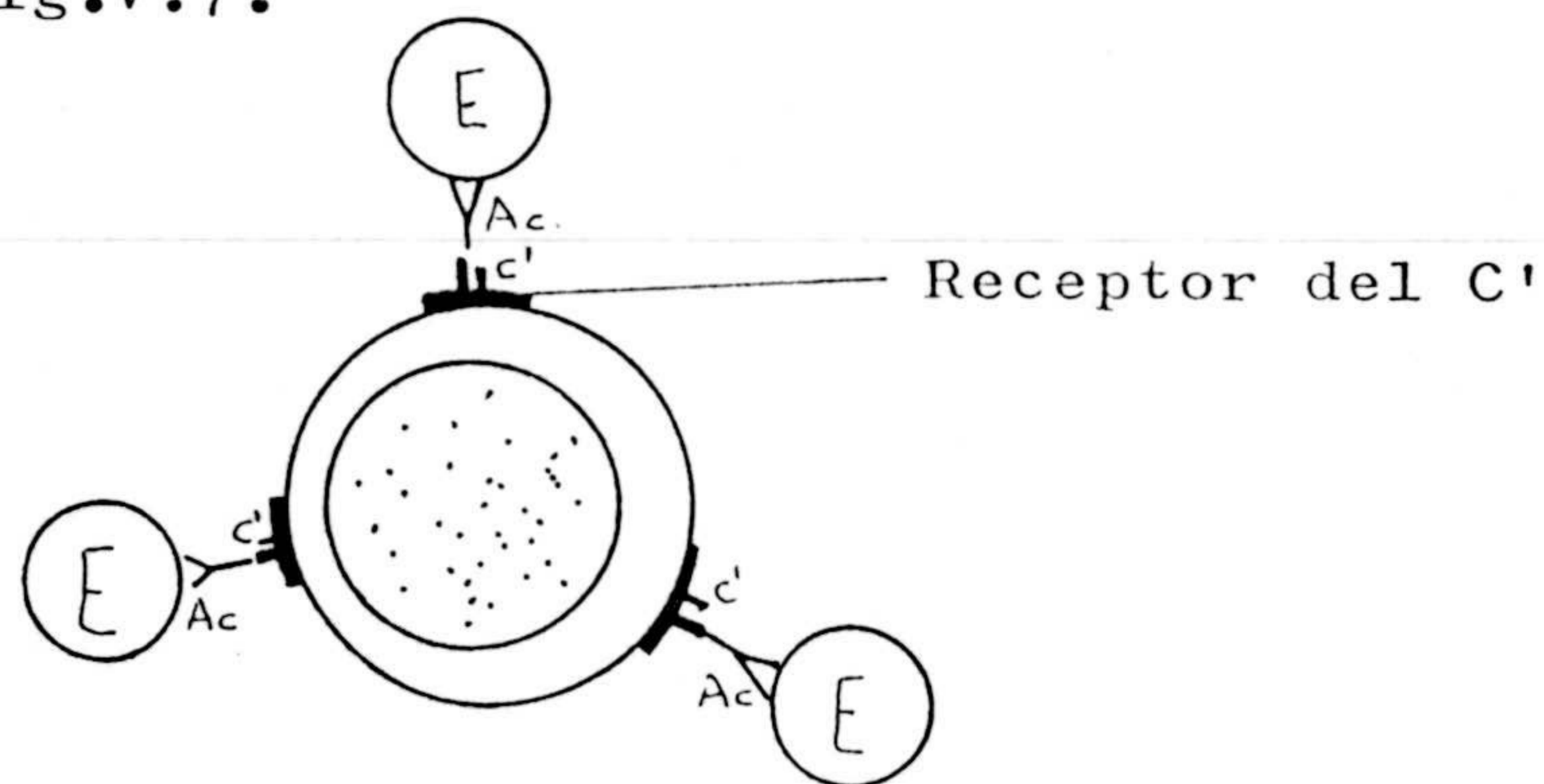


Fig. V.7. Esquema de una roseta EAC.

E:eritrocitos de carnero. Ac:anticuerpo. C':complemento.

V.4. Receptores para el Antígeno en las células B.

Son las mismas moléculas de Inmunoglobulinas presentes en la superficie de dichas células.

La distribución tisular de las Inmunoglobulinas de superficie, y la de los receptores Fc y del C' ha sido realizada al menos en ratón, Fig.V.8.

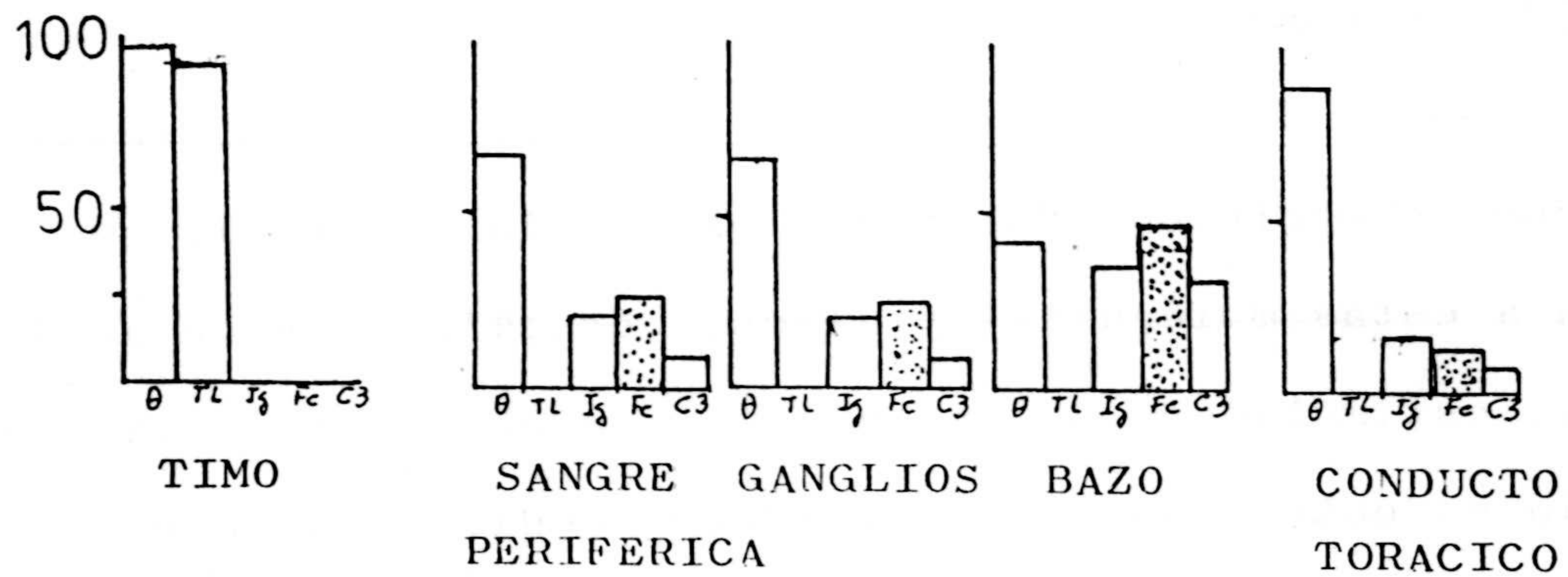


Fig. V.8. Distribución tisular de las Ig de superficie, y de los receptores Fc y C3.

V.5. Receptores para los antígenos en las células T

Son receptores cuya existencia se ha supuesto dado que las células T que reaccionan frente a un determinado antígeno, presentan el mismo idiotipo que las células B reaccionantes frente al mismo antígeno. Además se han detectado moléculas derivadas de células T con capacidad para unirse a antígenos específicamente; estas moléculas poseen un peso molecular de 40000 a 50000 dalton, poseen determinantes codificados por el MHC (anticuerpos específicos de productos de la región I, se unen a estas moléculas) y algunas de ellas tienen actividad estimuladora de las células colaboradoras (expresando en este caso especificidades codificadas por la subregión I-A); para otras se ha descrito lo contrario, un efecto supresor (estas expresan especificidades codificadas por la subregión I-J), (BENACERRAF y UNANUE., 1979).

Aun no se conoce mas, encontrándose en fase de estudio e identificación actualmente.

V.6. Receptores β -Adrenérgicos.

La descripción de que los agentes β -adrenérgicos tienen capacidad para inhibir la producción de anticuerpos (MELMON y col., 1974), la actividad citolítica (HENNEY y col., 1972) y la desgranulación de basófilos y células cebadas (BOURNE y col., 1974), ha conducido a una serie de trabajos para la identificación y distribución tisular de los receptores para esos agentes.

La existencia de estos receptores de membrana en linfocitos periféricos humanos, fue demostrada inicialmente por WILLIAMS y col., (1976), que determinaron la existencia de unos 2000 receptores β -adrenérgicos por linfocito. Posteriormente (POCHET y col., 1979) se vio que la distribución no era homogénea en las distintas subpoblaciones de linfocitos (Fig. V.9). Concretamente en las poblaciones F1 y F2 de linfocitos periféricos humanos, aisladas según el método de DELESSESSE y col. (1976), existe una marcada diferencia, ya que la población F1 carece de receptores β -adrenérgicos y responde muy mal al tratamiento mitogénico con PHA.

	Rosetas E	Igs	Respuesta PHA	Receptores/c.
LB	2.2%	-	-	600
LT	81%	4.4%	-	200
F1	85.3%	2.8%	28	0
F2	80%	9.4%	73.5	650

Fig. V.9. Distribución de los receptores β -adrenérgicos en subpoblaciones de linfocitos periféricos humanos. La última columna indica el número de receptores presentes por célula. (POCHET y col., 1979).

En cuanto a la acción bioquímica de los agentes β -adrenérgicos, solo se ha descrito su capacidad de activar la Adenil-ciclase. Enzima que cataliza la síntesis de AMP cíclico (Adenosina-3'-5'-monofosfato).

VI. TRANSFORMACION DE LINFOCITOS.

La inducción de las respuestas blastogénicas en linfocitos, representa un método "in vitro" muy útil para la cuantificación de la capacidad de activación de los mismos en numerosos sistemas. Entre esos sistemas podemos citar:

- a) Cultivo Mixto de Linfocitos (MLC) (DUTTON.,1966)
- b) Contacto con un antígeno de linfocitos sensibilizados frente a él (DUTTON.,1967).
- c) Empleo de mitógenos inespecíficos (LING.,1968)
- d) Cultivo de linfocitos humanos en presencia de suero fetal de ternera (JOHNSON y RUSSEL.,1965; ZIELSHE y GOLUB.,1976). No ocurriendo la transformación si se utiliza suero humano (ORTALDO y col.,1977; TREVES y col.,1978),
- e) Cultivo de linfocitos T enfrentados con otros linfocitos no T (GREEN y SELL.,1970; BIRNBAUM y col., 1972; OPELZ y col., 1975; KUNTZ y col.,1976; SMITH., 1978; WEKSLER y col.,1978).
- f) Cultivo durante 5 días de células periféricas mononucleares humanas, desprovistas de células adherentes a

la lana de vidrio (JULIUS y col.,1973), presentan transformación (TREVES y col.,1979).

Independientemente del sistema empleado para la inducción de la transformación blástica linfocitaria, la misma se inicia tras una serie de cambios en la membrana del linfocito. Y es muy posible que moléculas glicoproteicas presentes en la superficie de linfocitos y macrófagos intervengan inicialmente en la activación de los linfocitos tras un estímulo mitogénico inducido por antígenos, lectinas o tras la oxidación con periodato o galactosa oxidasa. El hecho de que la transformación se inicie a nivel de la superficie externa de la membrana está realmente claro, ya que mitógenos y antígenos insolubilizados (incapaces de penetrar en la célula), mantienen su capacidad activante de la transformación blástica (RESCH.,1979).

La importancia de las glicoproteinas de membrana se ve confirmada por una serie de datos:

- a) Los receptores antigénicos de las células T y B son glicoproteinas.

- b) Los antígenos codificados por el MHC y los antígenos Ia, poseen naturaleza glicoproteica.
- c) Las glicoproteinas poseen una alta especificidad para las lectinas.
- d) Los compuestos Periodato y galactosa oxidasa, actúan oxidando residuos terminales de glicoproteinas.
- e) La eliminación de las glicoproteinas de superficie de los linfocitos, inhibe la transformación blástica de los mismos, al intentar activarlos con lectinas u otros métodos descritos (O'BRIEN y col., 1979).
- f) Se ha demostrado la necesidad de la presencia de antígenos Ia, para que la respuesta a ConA, LPS, dextrano, periodato y NAGO (Neuraminidasa-galactosa oxidasa) sea normal. Sin embargo la respuesta a PHA es independiente de la presencia de antígenos IA en las células diana.

De acuerdo con esos datos, hay que aceptar el importante papel desempeñado por las glicoproteinas de superficie; pero existen aún algunas dudas con respecto a su función y diversidad. Dudas que podemos concretar

en las siguientes tres cuestiones:

i/ ¿La estructura de membrana a la que se unen los mitógenos, es la misma o distinta para los diferentes mitógenos conocidos?. Aún no está resuelta totalmente esta cuestión. Al menos se sabe que las glicoproteínas de superficie receptoras de los mitógenos PHA y ConA son diferentes (O'BRIEN y col., 1979).

ii/ Si consideramos un único mitógeno ¿Cuántas glicoproteínas diferentes intervienen para que la célula se active?.

La respuesta no se conoce para todos los mitógenos. Sí se sabe que linfocitos T Ia⁻ junto con células adherentes Thy-1⁻ Ia⁺, estimuladas con NAGO, se transforman, interviniendo en dicha transformación más de una glicoproteína. Parece seguro además que distintas dianas estimuladas con el mismo mitógeno, poseen receptores diferentes.

iii/ ¿Cómo se conecta el efecto de un mitógeno sobre una glicoproteína con la señal proliferativa?.

Para explicar esa conexión, se han propuesto varios mecanismos:

-Cambios estéricos en la membrana.

-Formación de uniones cruzadas entre moléculas de la membrana celular. La activación con ConA, origina el establecimiento de uniones cruzadas entre azúcares de membrana y lugares hidrofóbicos de las proteínas constitutivas o de los lípidos de membrana.

-Inducción de interacciones celulares: entre macrófagos y linfocitos fundamentalmente. De acuerdo con esto, se supone que mitógeno y macrófagos proporcionan sendos estímulos a la población de linfocitos. Esos estímulos son incapaces de iniciar la transformación aisladamente, pero son efectivos al actuar conjuntamente (Fig. VI.1). La importancia de los macrófagos es manifiesta, ya que si purificamos una población de linfocitos T ó B, de tal forma que carezcan de macrófagos, los mismos son incapaces de responder mitóticamente al tratamiento con mitógenos. Pueden existir sin embargo, varias posibilidades en la consecución de esta interacción macrófago-linfocito (Posibilidades 1, 2 y 3 Fig.VI.1).

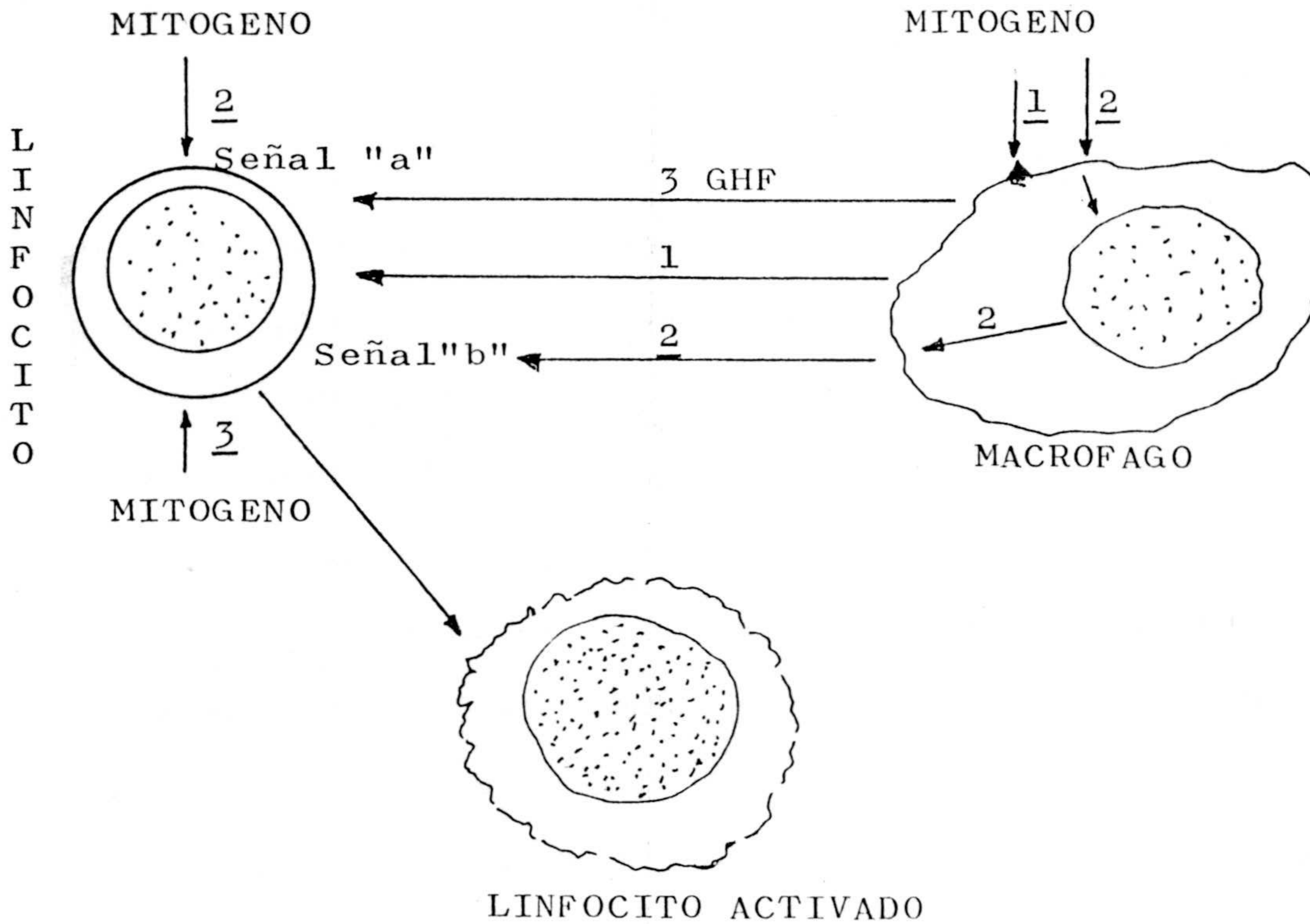


Fig.VI.1. Posibilidades de interacción Macrófago-Linfocito para la transformación de estos. Posibilidad 1: Que solo los macrófagos reconozcan el mitógeno, los macrófagos activados liberarían una señal que induciría la proliferación de los linfocitos. Posibilidad 2: Tanto el linfocito como el macrófago reconocerían el mitógeno, originándose dos señales "a" y "b" necesarias ambas para la proliferación. Posibilidad 3: Que el mitógeno sea reconocido exclusivamente por los linfocitos, respondiendo estos, sin necesidad de macrófagos; tras esta respuesta inicial, los macrófagos liberarían una segunda señal GHF (factor colaborador del crecimiento), que activaría los linfocitos para que inicien la fase S (replicación cromosómica). La liberación de GHF, no necesita el contacto Macrófago-mitógeno. Se considera esta posibilidad como la mas probable (RESCH.,1979).

-Cambiando la función bioquímica de alguna o algunas moléculas de la membrana celular. Aunque esta posibilidad se ha observado para algunas moléculas con actividad enzimática, su verdadero significado permanece aún incierto. De acuerdo con esto se han descrito dos efectos, al parecer directos, de mitógenos sobre moléculas presentes en la membrana:

a) Efecto de la ConA sobre el ectoenzima 5'-nucleotidasa. La actividad enzimática de este enzima resulta inhibida cuando interacciona con la ConA.

b) El enzima ATPasa, dependiente de Na y K, cambia su actividad durante la transformación de linfocitos inducida por mitógenos.

VI.1. Transformación de linfocitos y ciclo celular.

Dado que el efecto inicialmente medido cuando un linfocito responde a un determinado estímulo mitogénico, es su respuesta proliferativa (determinada in vitro usualmente por la cantidad de isótopo incorporada) y concretamente la replicación de su material genético; habrá

que considerar, el desarrollo del ciclo celular durante la transformación y los cambios que experimentan los linfocitos durante las distintas fases de ese ciclo.

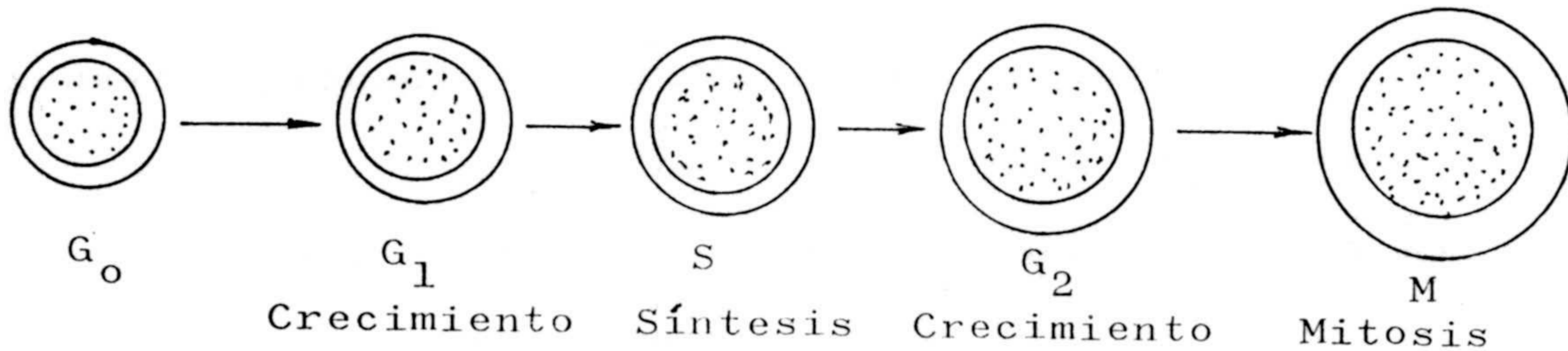


Fig. VI.2. Ciclo celular. Una célula en condiciones de reposo (Fase G_0), con una duración variable, por alguna señal (en el estudio que estamos considerando será esa señal la presencia de un mitógeno) se activa, iniciando una fase de crecimiento inicial (G_1), que normalmente tras un periodo de unas ocho horas (en mamíferos) será continuada con una fase de replicación cromosómica (Fase S) de unas seis horas de duración, posteriormente por un segundo periodo de crecimiento (Fase G_2) de unas cinco horas, tras el cual se realiza la mitosis y división celular (Fase M) aproximadamente en una hora. Tras esta fase M, se originan dos células hijas, que tras un periodo en fase G_0 , iniciarán un nuevo ciclo celular cuando las condiciones intra y/o extracelulares lo determinen.

Puesto que los mitógenos, tienen como función la activación de células en fase G_0 , para que a través de las distintas fases (Fig.VI.2) se realice la mitosis de esas células. Consideraremos el tránsito G_0-G_1 y el G_1-S y los cambios celulares efectuados en ambos tras un estímulo mitogénico.

VI.1.1. Cambios celulares producidos en el tránsito Fase G_0 -Fase G_1 .

-Se inicia el mismo con la unión del mitógeno a estructuras presentes en la membrana celular. Basicamente los receptores son moléculas glicoproteicas (RESCH., 1979) y al menos en estudios realizados en células T, tanto lectinas, como agentes oxidantes o antisueros anti antígenos de histocompatibilidad, utilizan el mismo receptor. Este hecho permite utilizar las Lectinas u otros mitógenos policlonales para simular "in vitro" la transformación, que evidentemente "in vivo" efectúan los linfocitos tras un estímulo antigénico.

Tras la unión mitógeno (ConA fue el utilizado)-Receptor (que parece consistir en un complejo estable con al menos dos enzimas: ATPasa (Na^+ , K^+) y acil-Coa lisolecitín aciltransferasa), se desencadenan una serie de cambios:

a) Cambios en la actividad de enzimas ligados a las membranas plasmáticas en linfocitos activados por ConA (RESCH., 1979). Fig. VI.3.

Enzima	Efecto		Cambios	
	Activación	Inhibición	Vmax	Km
5'.nucleotidasa	No cambia o	↓	↓	↓
♂-glutamil transferasa		↓	-	-
ATP-asa (Mg^{++})	(↑)	↓	-	-
ATP-asa (Na^+ ↓ K^+)	↓		↓	
Fosfatasa alcalina		↓	-	-
Adenil-ciclasa	(↑) o no cambia		-	-
Guanil-ciclasa	↓		-	-
Fosfolipasa-A	↓		-	-
Acil-CoA-lisolecitin acil transferasa	↓		↓	

Fig. VI.3.

En la Fig. VI.3, hay dos enzimas ATP-asa(Na^+ + K^+) y Acil-CoA-lisolecitin acil transferasa, que aumentan su V_{max} , tras la unión del mitógeno; en el primero de ellos, el aumento se debe a la expresión de nuevos lugares de unión del K^+ , y en el segundo a procesos cooperativos de membrana.

b) Reorganización de los receptores formando casquetes. Pero la distribución de los enzimas ligados a la membrana no cambia.

c) Agrupamiento de los microtúbulos localizados en la membrana. No es seguro que este agrupamiento sea una fase obligatoria en la transformación de los linfocitos.

d) Aumento del porcentaje de ácidos grasos insaturados en la membrana celular. Este aumento se consigue por la actividad del enzima Acil-CoA lisolecitin acil-transferasa; implicando una mayor movilidad de los componentes de la membrana. Esa mayor movilidad, podría originar la activación de alguno de los componentes de membrana, generándose en ese caso la señal responsable

Sustrato	Tipo de Transporte	Minutos transcurridos entre activación y detección de incremento	Cambios en		Mecanismo posible del incremento observado.
			Vmax	Km	
Uridina	Difusión facilitada	30	+		Activación del transportador.
Azúcares	Difusión facilitada	20-30	-	-	Activación del lugar de reconocimiento del transportador.
Aminoácidos	Transporte activo	30	+		Hay entrada neta por activación del transportador dependiente de Na ⁺ .
Entrada K ⁺ Salida Na ⁺	Transporte activo	1	+	-	Activación ATPasa dependiente Na y K.
Entrada Na ⁺ Salida K ⁺	Difusión facilitada	1-10	-	-	
Entrada Ca ⁺⁺	Difusión facilitada	1-10	+	+	

Fig.VI.4. Incremento en la entrada de diversos componentes en linfocitos activados.

e) Cambios en el transporte a través de la membrana de los linfocitos activados.

Esos cambios se concretan en una entrada neta de K^+ , aminoácidos, Uridina y Ca^{++} , (Fig. VI.4).

Este último ion: Ca^{++} , parece desempeñar una importante función reguladora de la mitogénesis. Ya que la concentración de calcio intracelular total es del orden de 0.4mM, pero la concentración de Ca iónico es solo del orden de 10^{-7} mM y la concentración de calcio extracelular aproximada es 1 mM. Existe pues un gradiente de Ca entre el exterior y el interior celular, gradiante que permitirá a este ión ejercer su acción reguladora.

Para el mantenimiento de una concentración de Ca intracelular del orden de la indicada, la célula posee dos mecanismos:

-Bomba de Ca^{++} , dependiente de ATP y localizada en la membrana plasmática.

-Mitocondria, actúa como un orgánulo regulador de la concentración de Ca intracitoplasmática, incorporando o eliminando calcio al citoplasma.

Independientemente, se ha observado que la concentración extracelular óptima de calcio para la mitogénesis, es del orden de 5×10^{-4} M (HESKETH.,1979), no existien-
estimulación de los linfocitos ni división si los nive-
les de Ca extracelulares se mantienen elevados. Sin em
bargo, esos niveles elevados de Ca no parecen tener
efecto sobre las células neoplásicas (BOYNTON y WHITFI-
ELD.,1979). Se ha visto, que para células normales, y
durante las primeras 12 horas de cultivo, la concentra-
ción de Ca extracelular, desempeña una importante fun-
ción reguladora, siendo esencial para que exista sínte-
sis de ADN. Función muy selectiva, ya que variaciones
de la concentración de Ca intracelular del orden de
10 M da lugar a un importante cambio dentro de la fase
de activación celular. Y en general aumentos excesivos
resultan tóxicos para las células normales.

Parece ser, que el efecto de los mitógenos
es inicialmente favorecer la entrada de Ca^{++} en la
célula. Esa entrada inicial, originará un cambio en
las características del medio intracitoplasmático, su-

cediéndose una serie de eventos, que darán como resultado neto la activación y proliferación celular. (Fig. VI.5.A y B).

VI.I.2. Cambios celulares que tienen lugar entre las fases G1 y S, tras la activación por mitógenos.

Tras los cambios iniciales entre las fases G₀ y G₁, que afectan fundamentalmente al intercambio iónico y a la actividad de algunos enzimas, inducidos por el contacto de mitógenos con la superficie de linfocitos el ciclo celular continua, habiéndose determinado los siguientes procesos:

a) Aumento inicial de los niveles de AMPc, aumento que se considera el inicio del tránsito G₁-S, debido al aumento de actividad del enzima Adenil-ciclasa. El aumento alcanza un máximo aproximadamente a las 30 horas de cultivo de linfocitos de ratón en presencia de mitógeno (FOKER y col., 1979), Fig. VI.6).

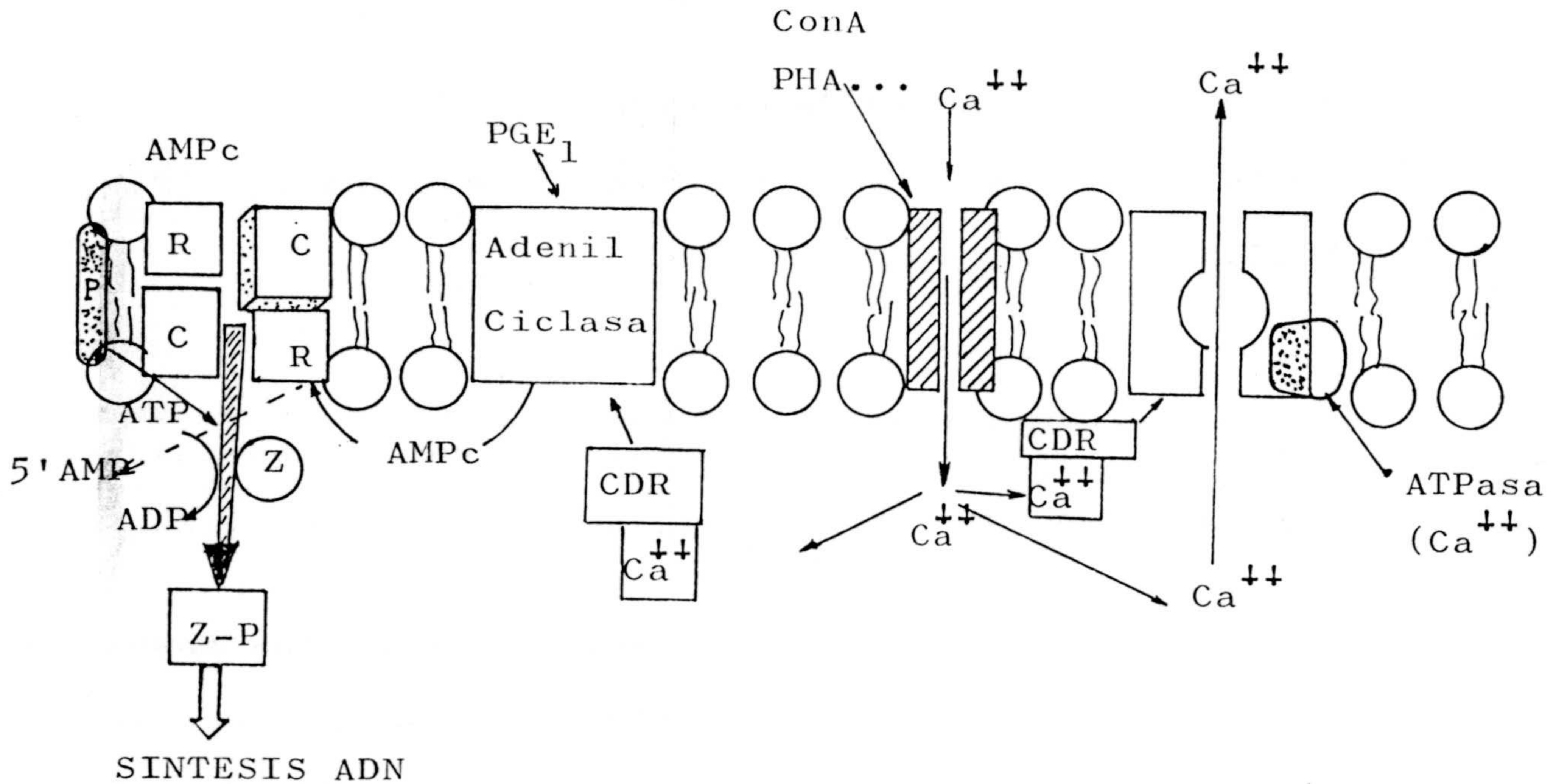


Fig.VI.5.A. Esquema de la activación directa de la Adenil-ciclasa por el complejo CDR-Ca, tras la activación del poro del Ca, por la unión de un mitógeno a la membrana celular (BOYNTON y WHITFIELD., 1979). CDR: Proteína reguladora dependiente de Ca. C: subunidad catalítica del enzima proteínquinasa. R: subunidades reguladoras externa e interna del mismo enzima. Z: sustrato de fosforilación de la quinasa. Z-P: sustrato fosforilado. P: fosfodiesterasa. De acuerdo con este esquema, el mitógeno (PHA...) aumenta la entrada de Ca en la célula, ese Ca, se une al CDR, activando por una parte la expulsión de Ca (para restablecer las condiciones iniciales) y por otra al enzima Adenil ciclasa. Este último enzima, cataliza la síntesis de AMPc, AMPc que uniéndose a la subunidad reguladora de la quinasa, deja activa la subunidad catalítica (activación que puede alcanzarse con AMPc exógeno), produciéndose la fosforilación de Z, originándose el sustrato fosforilado Z-P. El AMPc, se degrada a 5'AMP por acción del enzima fosfodiesterasa P.

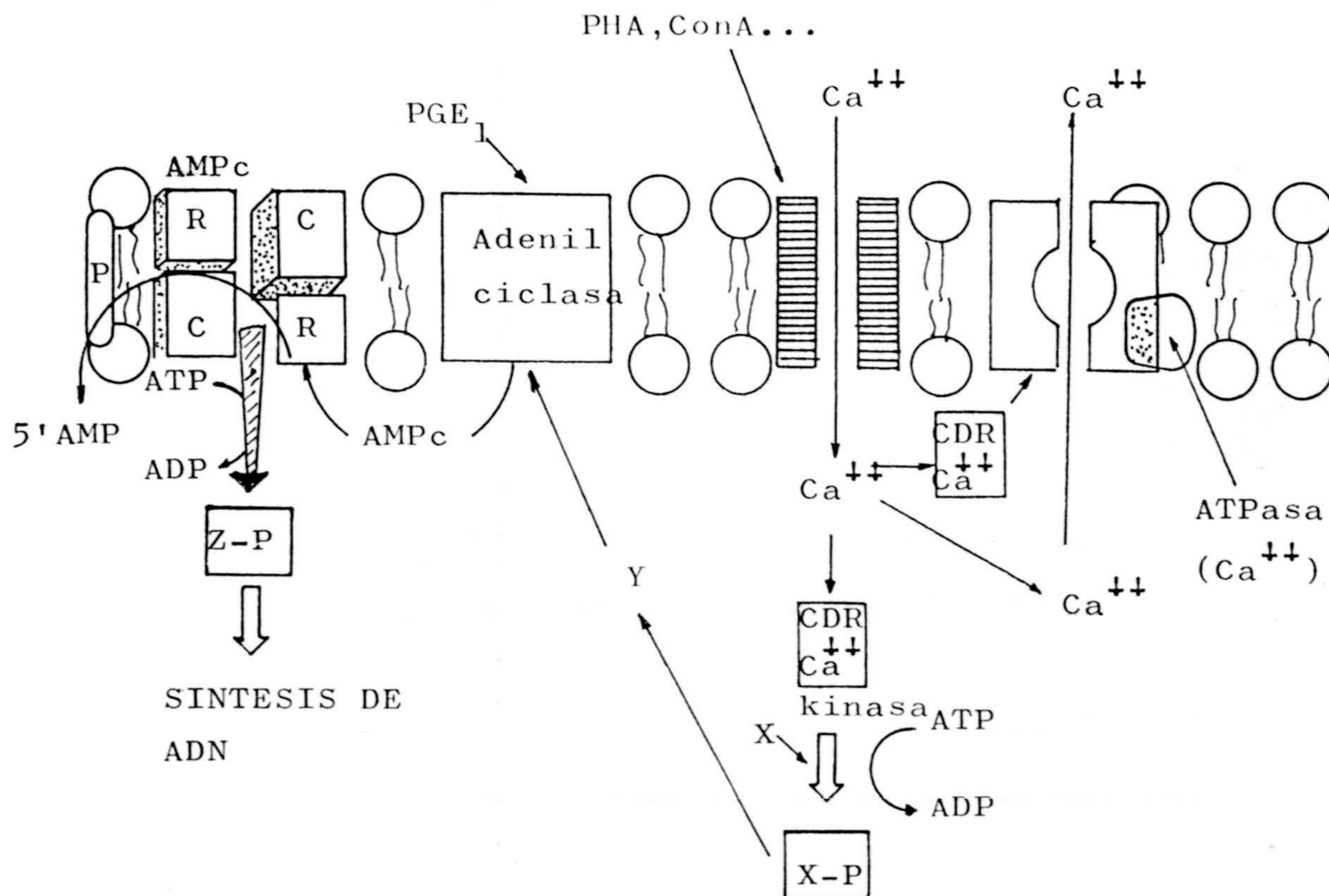


Fig.VI.5.B.Otra posibilidad, es la activación del Enzima Adenil-ciclasa indirectamente (BOYNTON y WHITFIELD.,1979). De acuerdo con esta posibilidad, el complejo CDR-Ca, activaría una quinasa soluble, dando lugar a un sustrato fosforilado X-P, que posteriormente se transformaría en un nuevo compuesto Y, que activaría la Adenil ciclasa. El resto de los procesos sería similar a los descritos en la Fig. VI.5.A.

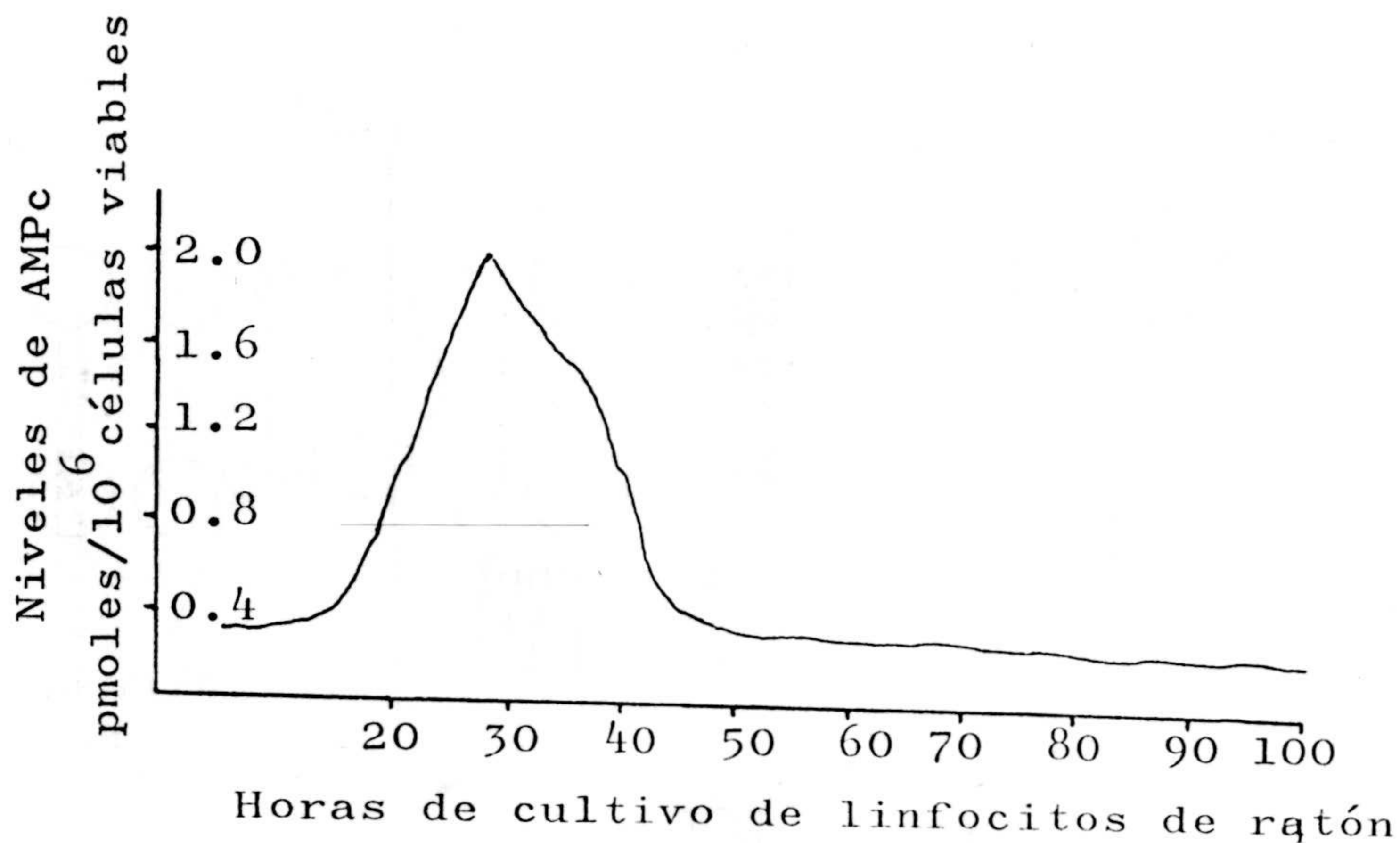


Fig. VI.6. Niveles de AMPc intracelulares en linfocitos de ratón cultivados "in vitro" en presencia de mitógenos.

b) Aumento de la actividad de los enzimas proteínquinasa, aproximadamente el pico de actividad de los mismos, coincide con el del AMPc a las 30 horas de cultivo

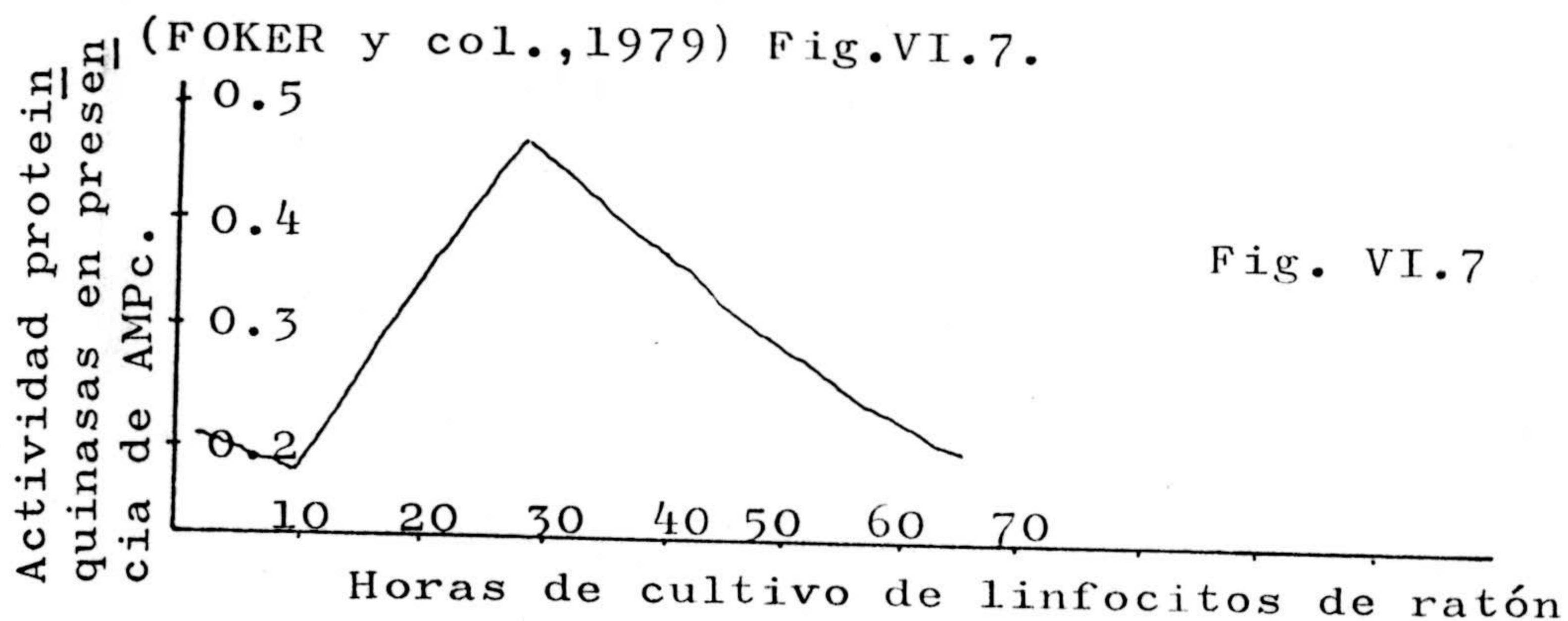


Fig. VI.7

c) La actividad de las proteinquinasas, Fig. VI.7, se determina por la incorporación de P^{32} en moléculas proteicas. Y se ha comprobado que la fosforilación observada en linfocitos activados con mitógenos, es específica para dos moléculas proteicas, una con Pm de 180000 Dalton y otra con Pm de 135000 dalton. Fig. VI.8 (FOKER y col.,1979)

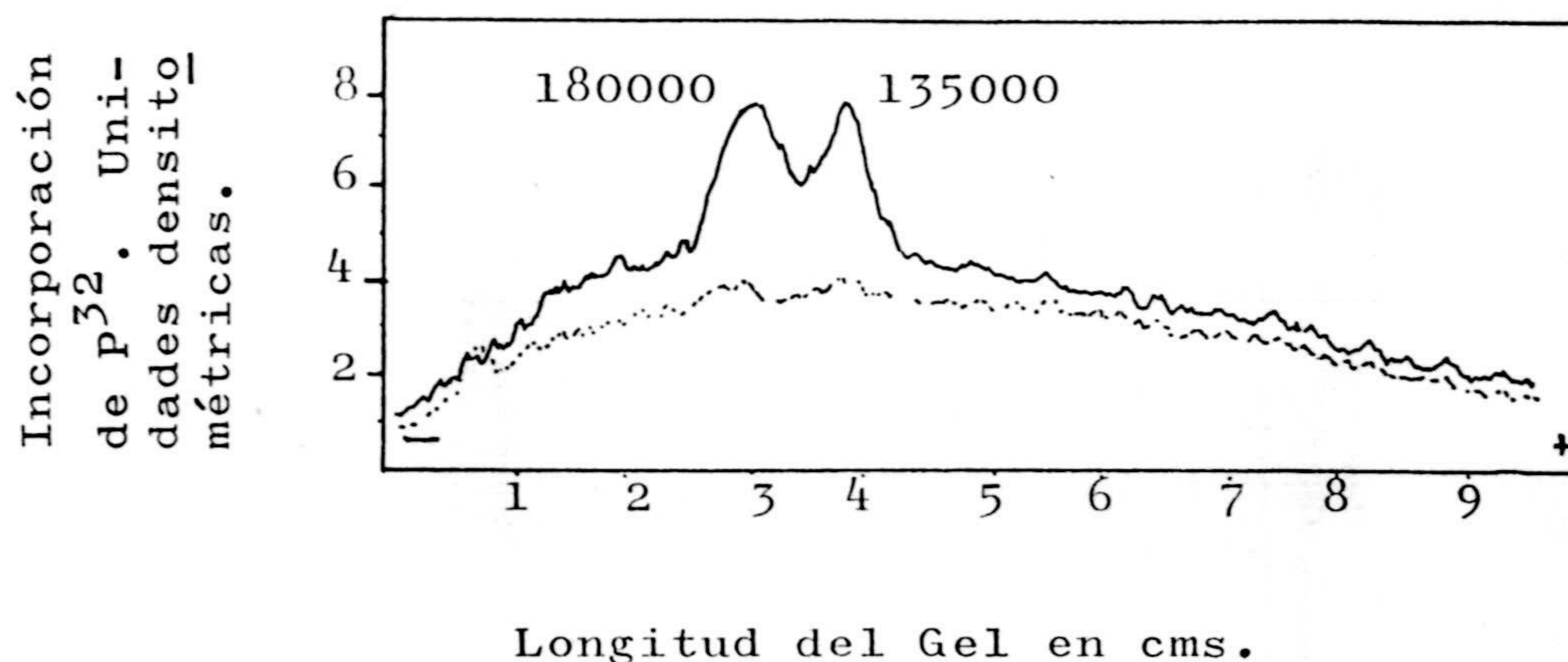


Fig. VI.8. Gráfico densitométrico de la fosforilación de proteínas en linfocitos de ratón estimulados con ConA (línea continua) o sin estimular (línea discontinua).

d) Las fosforilaciones indicadas, van precedidas de un aumento de la síntesis proteica, determinada por la incorporación de Uridina-³H. Este aumento, se inicia a las siete-ocho horas de cultivo, alcanzando un máximo aproximadamente a las 20 horas (Fig. VI.9.A). Iniciándose la fosforilación de las proteínas descritas aproximadamente a las 2-3 horas de comenzar la incorporación de Uridina-³H (Fig.VI.9.ByC).

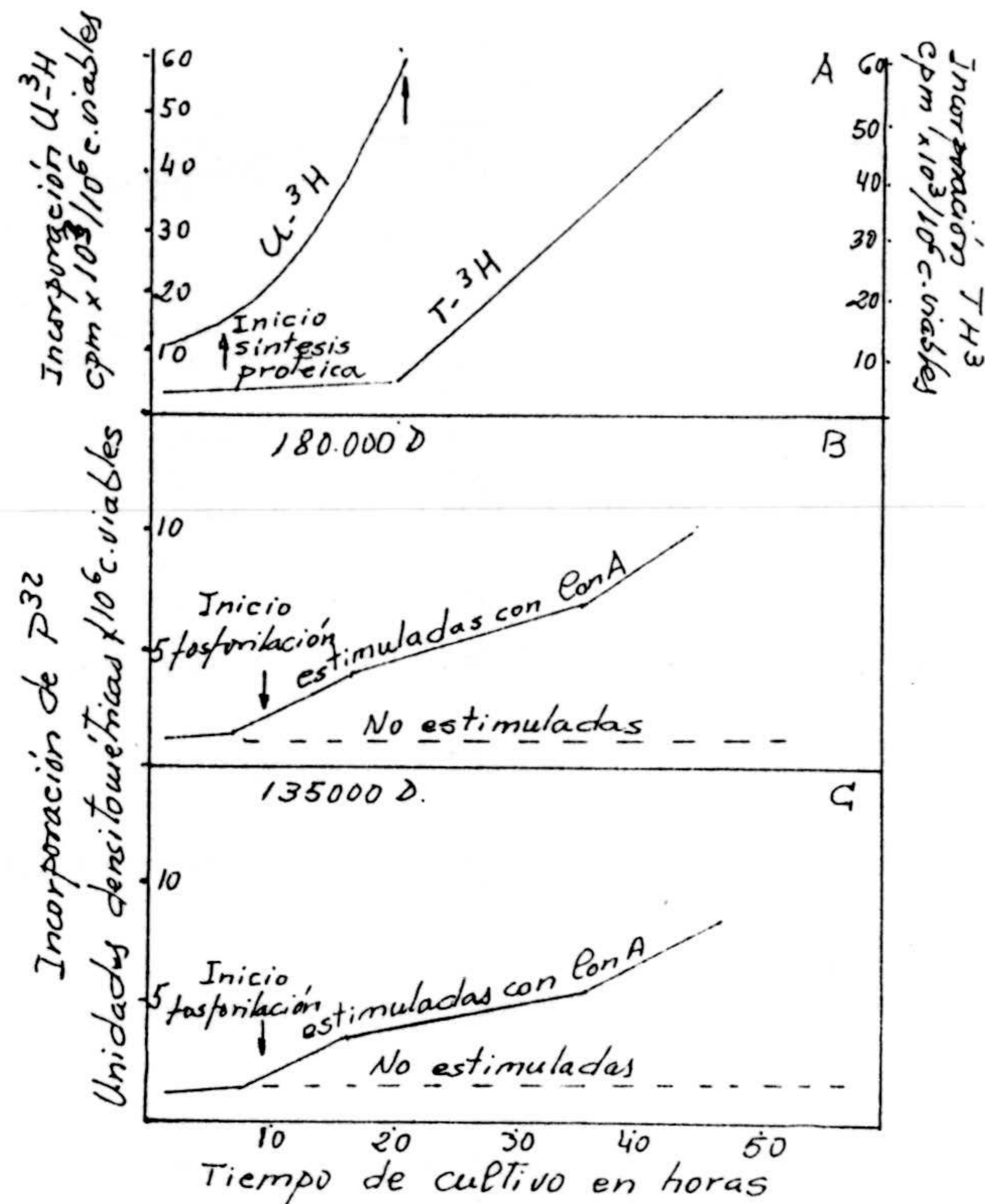


Fig.VI.9. Relación temporal entre síntesis de proteínas, fosforilación de las mismas y replicación del ADN.

VI.1.3. Conclusiones de los cambios bioquímicos en el ciclo celular de linfocitos inducido por mitógenos (ConA).

El ciclo celular inicialmente descrito por los cambios morfológicos observados en las células por microscopia, podemos definirlo ahora (al menos para linfocitos estimulados con mitógenos) como la sucesión de los siguientes procesos:

- a) Unión del mitógeno a la membrana celular.
- b) Aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados de la misma.
- c) Entrada de Ca^{++} en el citoplasma celular.
- d) Activación de la Adenil-ciclasa.
- e) Aumento de la incorporación de Uridina (índice del aumento de la síntesis proteica).
- f) Aumento de los niveles de AMPc.
- g) Aumento de la actividad de las proteinkinases.
- h) Incremento de las fosforilaciones de proteínas.
- i) Síntesis de ADN.

El tránsito entre el proceso h) y el i), es

el menos conocido. Habiéndose propuesto el mecanismo descrito en la Fig. IV.6. Mecanismo aún solo comprobado en parte.

VII. LECTINAS

Bajo esta denominación propuesta por WILLIAM C. BOYD en 1954 (del latín "legere", escoger), se incluyen una enorme cantidad de sustancias de origen vegetal (se conocen mas de mil lectinas diferentes) y generalmente de naturaleza proteica.

Desde su descubrimiento como sustancias con capacidad para aglutinar glóbulos rojos, hasta la actualidad, se les han encontrado múltiples aplicaciones: aglutinación de células tumorales a concentraciones bajas, determinación de grupos sanguíneos, transformación de linfocitos, separación de subpoblaciones de linfocitos, separación de polisacáridos y proteínas, aislamiento de glicoproteínas, en citotoxicidad inducida por lectinas (LICC) etc.

Surge inmediatamente la pregunta, ¿porqué estas moléculas se localizan en los vegetales?, en un principio se pensó, al observar la especificidad de alguna de ellas, que eran moléculas con una función similar a los anticuerpos de los organismos animales. Al parecer

(SHARON.,1977), esa función defensiva es la que desempeñan; pues inhibirían el crecimiento de algunos hongos que contuviesen azúcares en sus paredes celulares y que eventualmente podrían parasitar al vegetal productor de la lectina.

Algo que sí está claro, es que la Lectina siempre se une a residuos glucídicos de glicoproteínas constitutivas de las membranas celulares; y que la unión entre ambas moléculas posee unas características similares a la unión que se establece entre un Enzima y su sustrato (Fig. VII.1). Poseyendo además cada molécula de Lectina como mínimo dos sitios de unión para el azúcar.

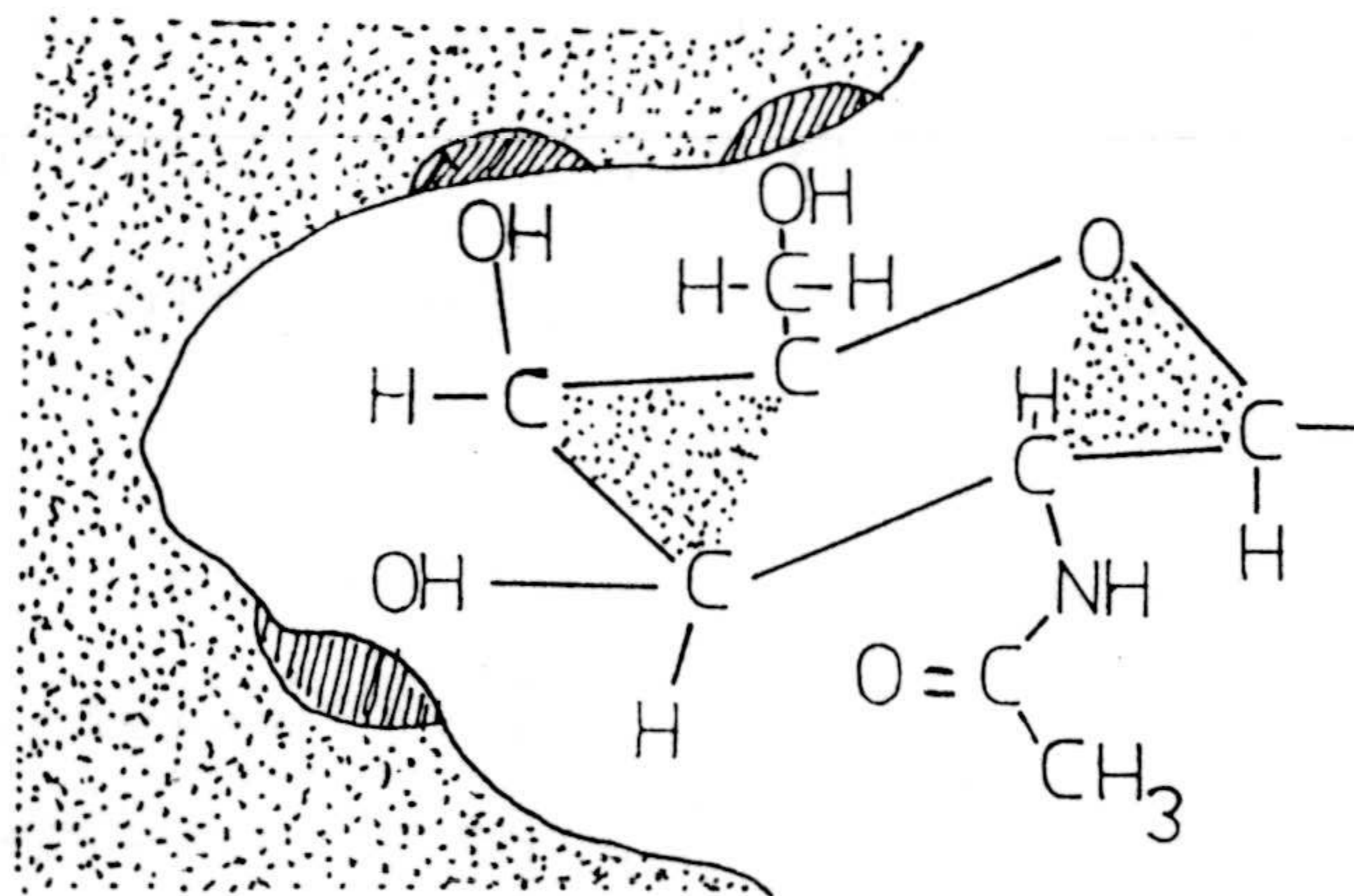


Fig. VII.1. Unión Lectina (PHA) con un azúcar (N-acetil galactosamina-NAcGal).

Ese caracter divalente de las Lectinas, les confiere la capacidad de disponerse en casquetes en la superficie de células tumorales y células normales en mitosis utilizándose a baja concentración (de 10 a 15 $\mu\text{g/ml}$ si la lectina empleada es ConA) Fig. VII.2

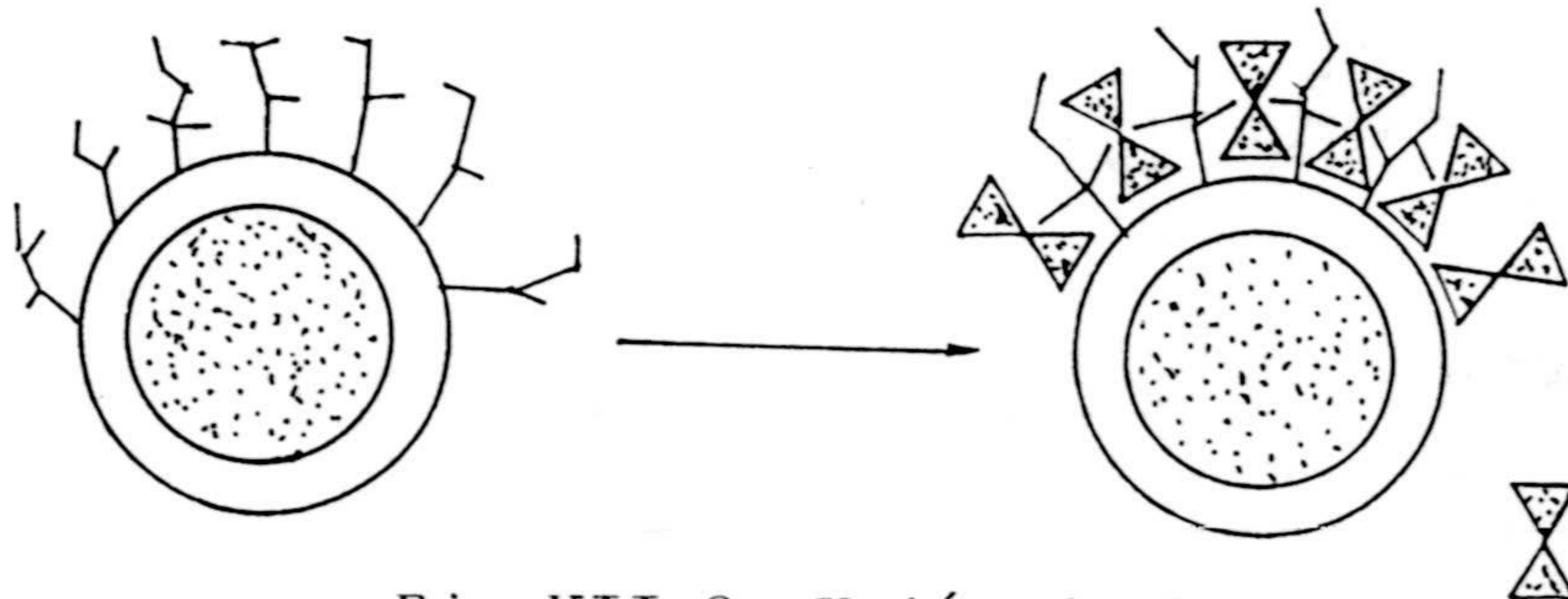


Fig.VII.2. Unión de las Lectinas a las glicoproteínas de membrana y formación de casquetes.

Sin embargo cuando se utilizan las mismas dosis de mitógeno con células normales, las lectinas se disponen regularmente por toda la superficie celular.

El efecto mas patente observado en las membranas celulares tras la unión de las Lectinas a la misma, es el denominado "Efecto transmembrana", descrito en membranas de glóbulos rojos.

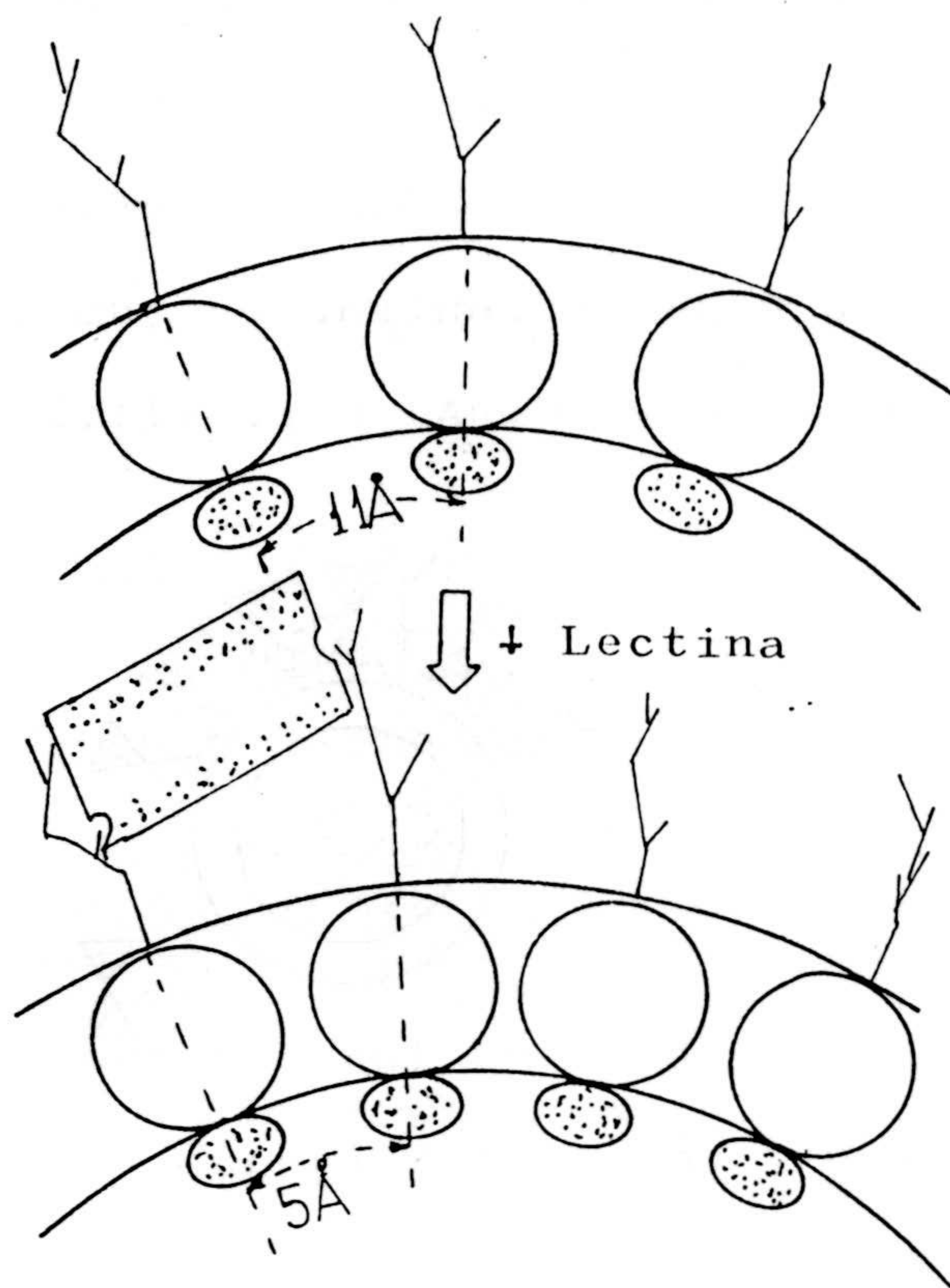


Fig. VII.2. Efecto Transmembrana originado por las Lectinas y observado en las moléculas de Espectrina de las membranas de glóbulos rojos.

Se ha descrito ese efecto atendiendo a la distancia entre las moléculas de Espectrina (proteína periférica unida a glicoproteínas constitutivas de la membrana del glóbulo rojo) antes y después del tratamiento con Lectii

nas. Esas distancias son respectivamente 11 y 5 $\overset{\circ}{\text{Å}}$. Aunque no se sabe si este efecto es general en todas las células tratadas con Lectinas; la redistribución ocasionada por este acercamiento podría desencadenar algún tipo de respuesta celular, como la activación del ciclo celular (SHARON.,1977).

Los otros cambios bioquímicos inducidos por las Lec ti nas sobre las células diana, ya han sido descritos en el apartado VI.1.1.

Otras moléculas, no relacionadas químicamente con las Lectinas, pero utilizadas también como mitógenos policlonales (generalmente de linfocitos B), son lipopolis ac á ri dos de las paredes bacterianas.

De entre la multitud de mitógenos conocidos, describi re mos algunas características de cuatro de ellos, dos específicos de linfocitos T (ConA y PHA), uno con efecto mitogénico sobre células T y células B (PWM) y otro específico de linfocitos B (LPS), que además han sido los utilizados para el desarrollo de este trabajo.

VII.1. PHA -Fitohemaglutinina.

Su nombre alude a la capacidad de esta Lectina para aglutinar glóbulos rojos. Se obtiene de semillas de habichuela de color (*Phaseolus vulgaris*), posee naturaleza proteica con un peso molecular de 128.000 daltons, reconociendo los restos de N-acetil-galactosamina con los que se une específicamente. (Fig. VII.1).

Es una Lectina muy empleada en la determinación de cariotipos, en aglutinación de eritrocitos y en estudios de transformación blástica de linfocitos T; Pero no responden por igual todos los linfocitos T, al menos en ratón las células que responden a PHA, son células Ly $1^+ 2^+ 3^+$, tanto las que poseen receptores Fc, como las que no lo poseen (STOUT y HERZENBERG., 1975). Un dato, quizás exótico, es que los linfocitos de *Rana pipiens* responden dando respuesta proliferativa a dosis de $10 \mu\text{g/ml}$ (WRIGHT y COOPER., 1979).

Evidentemente, la identificación de las células que responden a PHA (y otros mitógenos), ha permitido utilizar linfocitos transformados "in vitro", como un sistema útil en el laboratorio para detectar la capacidad estimuladora o inhibidora de esa transformación, presente en factores solubles o en otros tipos celulares.

La capacidad inhibidora, se ha descrito para numerosos factores solubles:

- Suero de mujeres embarazadas (FIGUEREDO y col, 1979)
- Globulina antilinfocítica (EIFE y col., 1979).
- Factor inhibidor de la proliferación de linfocitos (PIF), aislado en el sobrenadante de cultivos de linfocitos de pacientes con alcoholismo crónico estimulados con PHA (CHEN y LEEVY.,1976).
- Alfafetoproteína humana, aislada del suero de pacientes con cáncer de hígado o estómago (YACHNIN y LESTER., 1976).
- Hormonas esteroides (MENDELSON y col., 1977).
- Suero de pacientes con enfermedad de Hodgkin (AMLOT y UNGER., 1976).



-Factor inhibidor del suero de pacientes con hepatii
tis aguda y/o crónica (BRATTIG y BERG.,1976).

Pero, no solamente se han descrito factores con capacidad de inhibir la transformación de linfocitos estimulados con PHA; también se han podido observar una serie de cambios en la actividad de las células estimu-
ladas con PHA, entre ellos:

-Secreción de un factor mitogénico (MF) estable a 56°C (durante 30') y a 80°C (durante 10'), con un Pm entre 40000 y 55000 con un pHi:8.0-8.5 (LARSSON.,1979).

-Capacidad de crecer en colonias sobre agar. Crecii
miento facilitado por la presencia de 2-ME en el medio (SACHS.,1978).

-Producción de linfotoxinas citotóxicas, al menos en estudios en ratón (LEE y LUCAS., 1979).

-La respuesta es dependiente de la edad (McCORKLE y col., 1979).

-Aumento en la entrada de Ca^{++} (FREEDMAN., 1979).

-Facilitación del aumento de los niveles de AMPc, al tratarlos con PGE_1 (Prostaglandina E_1) (GRUNSPAN y

PICK^r, 1979).

-Expresión de receptores para rosetas E, en células K purificadas (no expresados antes de la estimulación) (ADES y col., 1979).

-La asociación entre antígenos MHC de macrófagos y respuesta de células T a lectinas (THOMAS y col., 1977).

-La necesidad de la expresión de los antígenos IA en macrófagos previamente a la activación de las células T.

-Disminución de la actividad de las células transformadas cuando en el medio se encuentran cantidades elevadas de polimorfonucleares (o extractos de los mismos) (CLEMENT y col., 1979). Este aumento de PMN, podría explicar la falta de resistencia a enfermedades como la tuberculosis o infecciones virásicas.

Una última prueba confirmadora de la utilidad del empleo de la PHA, para simular "in vitro", respuestas linfocitarias, ha sido la descripción de que las cepas Hi/PHA y Lo/PHA (alta y baja respuesta a PHA respectivamente) dan similarmente altas y bajas respuestas al

emplearlas como células efectoras en MLR. Por ello, se propuso un control genético común para las respuestas proliferativas frente a PHA y en MLR (LIACOPOULOS y col 1979).

VII. 2. ConA. Concanavalina A.

Proteína obtenida de *Concanavalia ensiformis*, con un Pm: 110000Daltones. Cristalizada por James B. Summer en 1919 por primera vez.

Reconoce esta proteína, específicamente los restos de α -metilmanopiranosido en glicoproteínas de membrana.

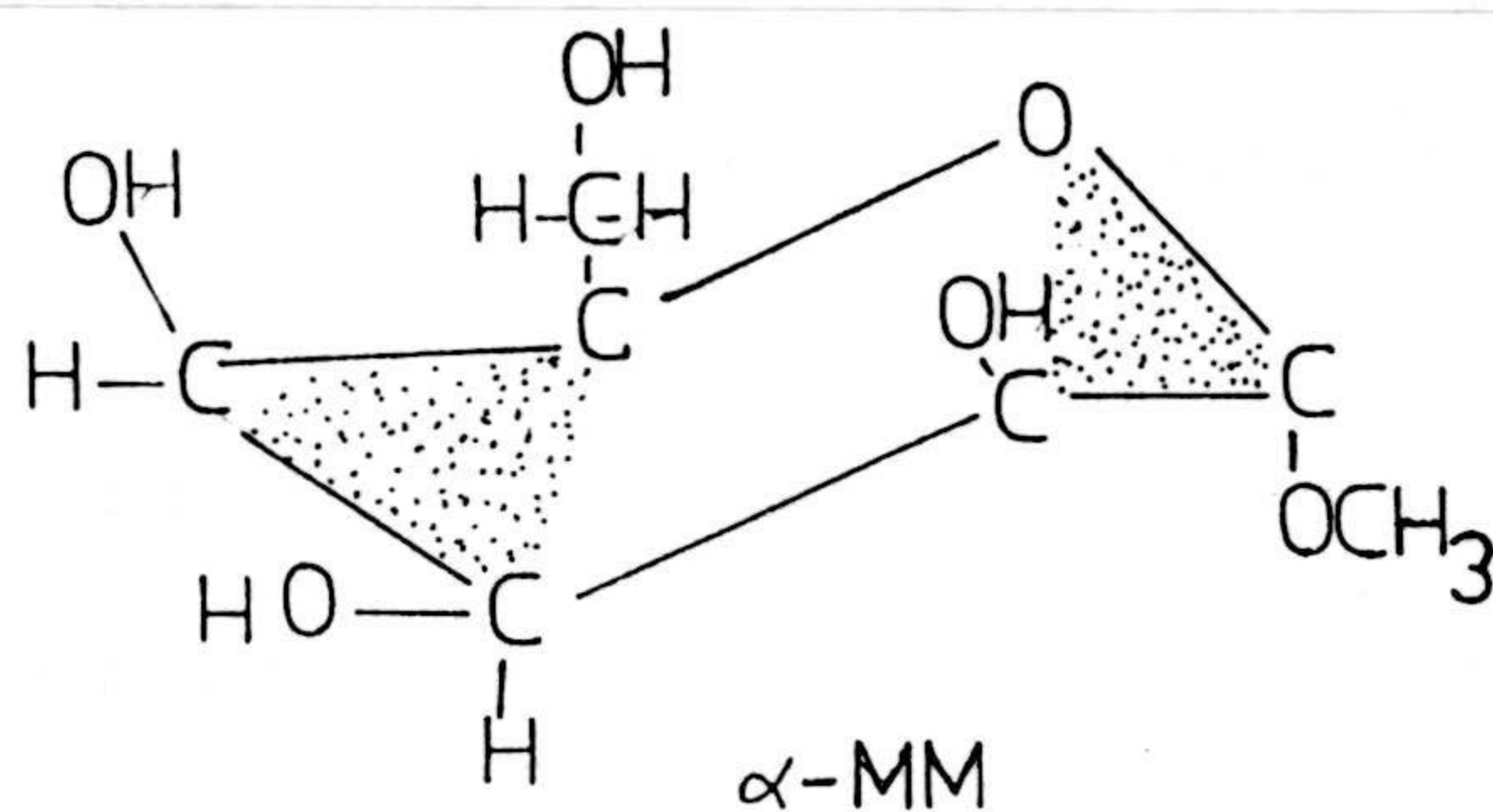


Fig. VII. 4. Molécula de α -metilmanopiranosido.

Empleándose para la aglutinación específica de eritrocitos de caballo, perro, gato y conejo así como para la transformación blástica de linfocitos T de ratón y humanos, no transformando los linfocitos B. En ratón específicamente, transforman células T Fc^+ (STOUT y HERZENBERG., 1975a), $Ly\ 1^-2^+3^+$ (McKENZIE y POTTER., 1979) e Ia^- , aunque para su transformación precisan de la presencia de una población de células Ia^+ , que probablemente son macrófagos (HABU y col., 1979).

Esas células que responden a ConA, además, tienen capacidad de adherirse sobre monocapas de E.coli-2 (KLEINMAN y TEODORESCU., 1979), respondiendo bien en MLC; carecen de citotoxicidad natural frente a células alogénicas.

El estudio tanto de las células estimuladas por ConA, como de los sobrenadantes del cultivo de las mismas, ha permitido describir una serie de características :

-Los esplenocitos de ratón estimulados por ConA, desarrollan actividad supresora en ADCC (citotoxici-

dad celular dependiente de anticuerpo), MLR y producción de anticuerpos (LOMNITZER y RABSON., 1979), suprimen igualmente la producción de anticuerpos inducida por LPS (PRIMI y col., 1979), siendo independiente del tipo de diana empleada y la inhibición no está restringida genéticamente; estas últimas células con actividad supresora de la respuesta a LPS, poseen determinantes I-J (PRIMI y col., 1979) correspondiendo a una población resistente a cortisona diferente de las células T supresoras de la respuesta timodependiente.

-Linfocitos humanos activados por ConA, suprimen la respuesta de linfocitos frescos a mitógenos y la producción de LIF- factor inhibidor de los leucocitos- (LOMNITZER y RABSON., 1979). De la misma forma deprimen la respuesta de linfocitos autólogos estimulados por PHA, ConA o antígenos como toxoide tetánico y la respuesta de células B autólogas a mitógenos. Las dosis óptimas son del orden de los 50 μ g/ml de ConA (FINEMAN y col., 1979). No está claro si la acción de estas células supresoras, se efectúa sobre células B o sobre fac-

tores estimuladores de las células Helper.

- En el sobrenadante de células estimuladas con ConA, se ha detectado un factor o factores que suprimen la formación de colonias de células B (CLAESSOM., 1979) no detectándose este efecto en los sobrenadantes de células cultivadas en presencia de PHA.

- En ratón, la ConA, induce unos niveles de anticuerpos superiores en las respuestas secundarias frente a albúmina bovina (NAKASHIMA y col., 1979).

- "In vivo", la ConA, posee un efecto potenciador de la citotoxicidad celular específica. Este efecto potenciador se ha descrito inoculando unos 120 g de ConA en ratones, 24 horas antes del ensayo de citotoxicidad en ratones previamente inmunizados con EL-4 (SHIMAMOTO y col., 1979). Coincidiendo con estos resultados, se ha conseguido (GLASER., 1979) la supervivencia de ratones Balb/c, inoculados con METHA o mKSA junto con células linfoides de ratón sensibilizadas "in vivo" frente a esos tumores y cultivadas "in vitro" con ConA

o PHA durante 5 días. Esto indica que la ConA puede específicamente estimular células presensibilizadas frente a un tumor e in vivo, neutralizar el crecimiento de ese tumor específicamente (GLASER., 1979).

- Al menos en humanos, los linfocitos presentan una respuesta diferencial a la ConA, dependiendo de la dosis de la misma utilizada (GUPTA., 1979). Si la dosis utilizada es de unos $2.5 \mu\text{g/ml}$ y se cultivan durante 18 horas, esos linfocitos aumentan la producción de IgG, IgA e IgM por linfocitos alogénicos estimulados con PWM. Pero si la dosis empleada oscila entre 10 y $40 \mu\text{g/ml}$, las células originadas, poseen un efecto supresor de la respuesta de anticuerpos estimulados por PWM, (la dosis de PWM utilizada fue de $10 \mu\text{g/ml}$).

- La ConA, interacciona con las glicoproteínas de superficie inhibiendo la modulación antigénica. Inhibición que se ha demostrado en ratones que expresan TL (WILSON y LITTLE., 1979).

- Las células periféricas humanas estimuladas por ConA (a dosis de 3 g/ml), produce factor estimulador de los macrófagos (MSLF) y MIF (FOX y RAJARAMAN., 1979) disminuyendo la producción de MSLF con la edad del individuo y aumentando, por el contrario, la de MIF.

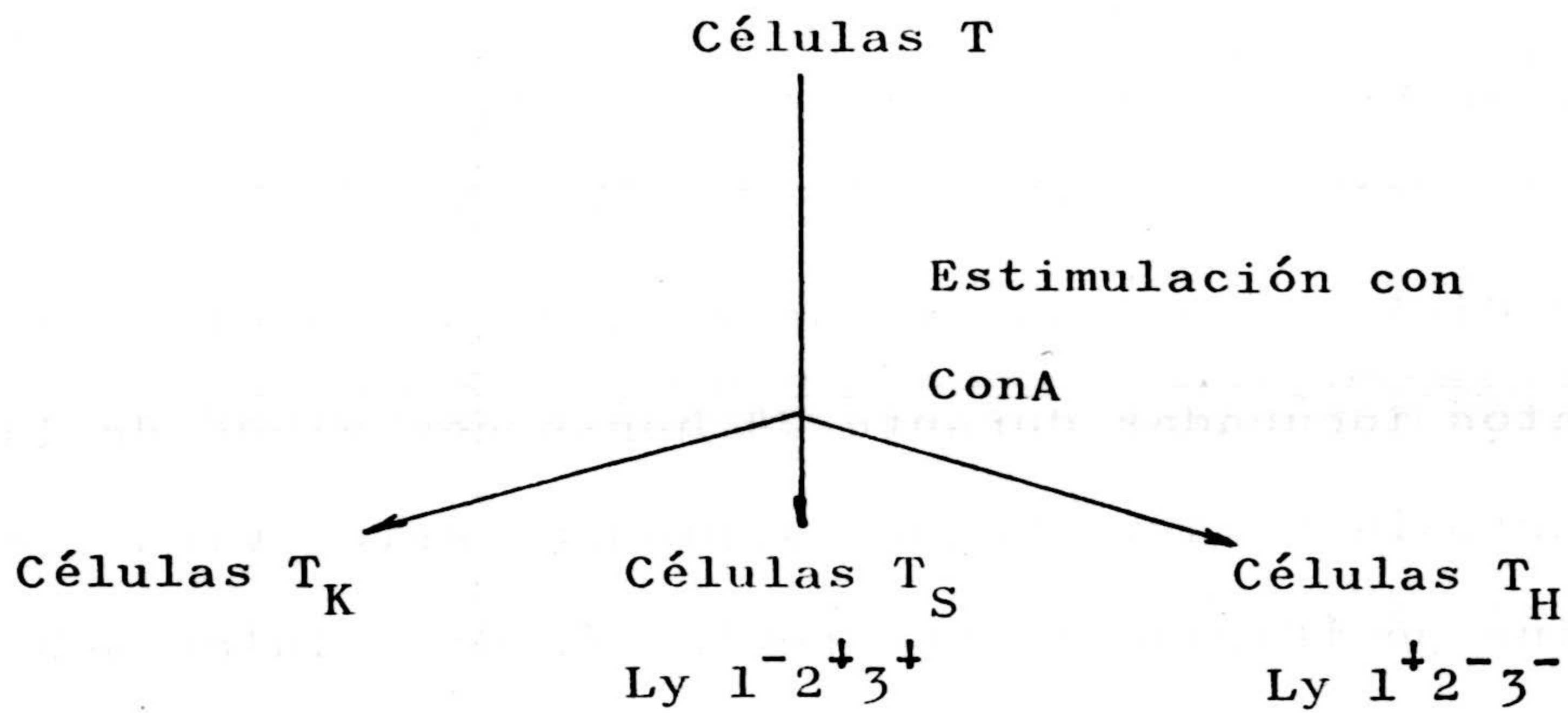


Fig.VII.5. Poblaciones celulares originadas por estimulación de células T de ratón.

(DUTTON., 1975).

- Los mercaptanos (2-ME, cisteinamida, y L-Cisteina) y en particular el Levamisole (a dosis de 25-100 $\mu\text{g/ml}$) favorecen la transformación blástica de linfocitos estimulados con ConA (OTTERNESS y col., 1979).

- La colchicina, a dosis de 10^{-5}M , inhibe la incorporación de Uridina ^3H en linfocitos activados por altas dosis de ConA (FORSDIKE., 1979).

- Se ha conseguido (ISRAEL y col., 1979) inhibir la estimulación de linfocitos de ratón tratados con ConA, al añadirles sobrenadante de cultivo de células de bazo de ratón incubadas durante 24 horas con virus de la mieloblastosis aviar. Según se piensa, estos virus, estimulan inespecíficamente una población de células adherentes (¿macrófagos?) para que produzcan un factor activador de una subpoblación de linfocitos supresores, T_S , los cuales inhiben la respuesta mitogénica de los linfocitos T.

- Linfocitos periféricos de humanos portadores de tumores, muestran una intensa actividad supresora sobre

linfocitos humanos normales, estimulados con PHA ó ConA, mientras que no ejercen ninguna actividad supresora sobre linfocitos estimulados con PWM (HAMMER y col., 1979).

- La respuesta a ConA, de esplenocitos de Hamster, es modulada por concentraciones del orden de 1 a 25 mM de ClLi. Concentración de efectos inhibidores de la transformación para dosis supraóptimas de ConA, y de efectos estimuladores para dosis infraóptimas de ConA, es un efecto específico del Li^+ , pues no se ha observado en otros cationes: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} (HART., 1979).

VII.3. PWM . Pokeweed Mitogen.

Se obtiene del rizoma de *Phytolacca americana* teniendo también naturaleza proteica con un peso molecular de 30000 Daltones; no sabiéndose qué molécula reconoce en la superficie celular. Empleándose por su capacidad de aglutinación de eritrocitos y de transformación de linfocitos T y B de ratón. (KEIGHTLEY y col., 1976).

Los estudios en los que se ha utilizado este mitógeno, han sido menos abundantes, uno de los datos conocidos, es que la Prednisolona añadida al inicio del cultivo de linfocitos estimulados con PWM, la síntesis de IgG, resulta aumentada (COOPER y col., 1979).

VII.4. LPS. Lipopolisacárido de la pared celular de E. coli.

Es un mitógeno policlonal, específico de las células B. Sobre linfocitos de ratón, a dosis de $10 \mu\text{g/ml}$, modifica las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos. La de GMPc aumenta a los 10' del tratamiento y la de AMPc presenta dos máximos, a los 5' y 30' respectivamente (SENKER y GRAY., 1979).

VII.5. Otras Lectinas de posible interés.

-lectina de Lotus tetragonolobus, empleada en la identificación del grupo sanguíneo O, al reconocer las moléculas de Fucosa en la superficie del hematíe.

-Lectina de *Bandeirea simplicifolia*, utilizada en la identificación del grupo sanguíneo B.

-Lectina de *Dolichus biflorus*, utilizada para la detección del grupo sanguíneo A1.

-Peanut Agglutinin, extraída de semillas de *Atachis hipogea*, proteína con un Pm, de 108.000 D. Reconoce moléculas de N-acetil-galactosamina, aglutinando específicamente las células T que expresan Thy-1.

-Soya Bean Agglutinin, también se extrae de semillas, en este caso de *Glycine max.* Su peso molecular es de 120000 D; reconociendo moléculas de Galactosa y de N-acetil-galactosamina. Empleándose para la aglutinación de hematíes de conejo y humanos, linfocitos, células transformadas y algunos microorganismos.

-Wheatgerm Agglutinin, presente en semillas de *Triticum vulgare*. Pm: 36000 D.

VIII. INMUNIDAD CELULAR.

La definiremos como el conjunto de procesos desencadenados por las células de un organismo animal tras el contacto con el antígeno, con la particularidad de que esos procesos pueden transferirse a otros individuos por medio de células linfoides.

Pero no son todas las células linfoides las que median en este tipo de inmunidad; básicamente solo dos grupos celulares intervienen:

-Linfocitos T, que representan el componente específico de la inmunidad celular, y

-Fagocitos mononucleares y células K, que constituyen el componente inespecífico de la inmunidad celular.

Ambos componentes celulares, Linfocitos T y fagocitos mononucleares, deben cooperar en todos los procesos de este tipo, entre otros, la infección por microorganismos, en algunos procesos inmunes frente a proteínas solubles, en inmunidad frente a tumores y trasplantes, en hipersensibilidad de tipo retardado y en algunas enfermedades autoinmunes.

VIII.1. Fases en el desarrollo de la Inmunidad celular.

"In vivo" y en ratón, la inmunidad celular, viene definida por una serie de sucesos consecutivos:

a) Sensibilización de los Linfocitos T:

Cuando un determinado antígeno penetra en el organismo animal, es reconocido por los linfocitos T iniciadores (ITL). A continuación se establece una unión linfocito T-Antígeno, a través de los receptores específicos para el Ag, presentes en la superficie de las células T. Esta fase de sensibilización (formación del complejo Antígeno-célula T) tiene lugar fuera de los órganos linfoides (COHEN y LIVNAT., 1976); y estos linfocitos T iniciadores, eran una población de Linfocitos T sensibilizados capaces de inducir hiperplasia ganglionar al ser inyectados subcutáneamente.

Es probable que esta fase de sensibilización se inicie tras el contacto de una célula T_H precursora (de fenotipo $Ly\ 1^+2^+3^+$ ó $Ly\ 1^-2^+3^-$) con el antígeno, y posterior cooperación con los macrófagos productores de LAF (Interleuquina 1), aunque otra posibilidad sería

que esta fase se iniciara por sensibilización de células T_H precursoras ($Ly\ 1^+2^+3^+$ ó $Ly\ 1^-2^+3^-$) frente a macrófagos singénicos con el antígeno presente en su superficie; este contacto Macrófago-Linfocito T, viene controlado por genes del MHC (BENACERRAF y UNANUE., 1979).

Sea el origen cualquiera de los propuestos, la sensibilización de los linfocitos T, necesita varias horas de contacto entre los ITL y el inmunógeno.

En este periodo, tiene lugar una síntesis activa de proteínas, cambios en la superficie celular y posiblemente incorporación del antígeno dentro del linfocito T (ya que el mismo es inaccesible a la acción de la Tripsina sobre la membrana celular). Pero no es necesaria la síntesis de ADN. Es posible que algunas de las proteínas sintetizadas en esta fase, se localicen posteriormente en la membrana celular confiriéndole a la célula su capacidad de migración y de reclutamiento de otros linfocitos en el ganglio linfático mas próximo al lugar de sensibilización de estos ITL. (Fig. VIII.1)

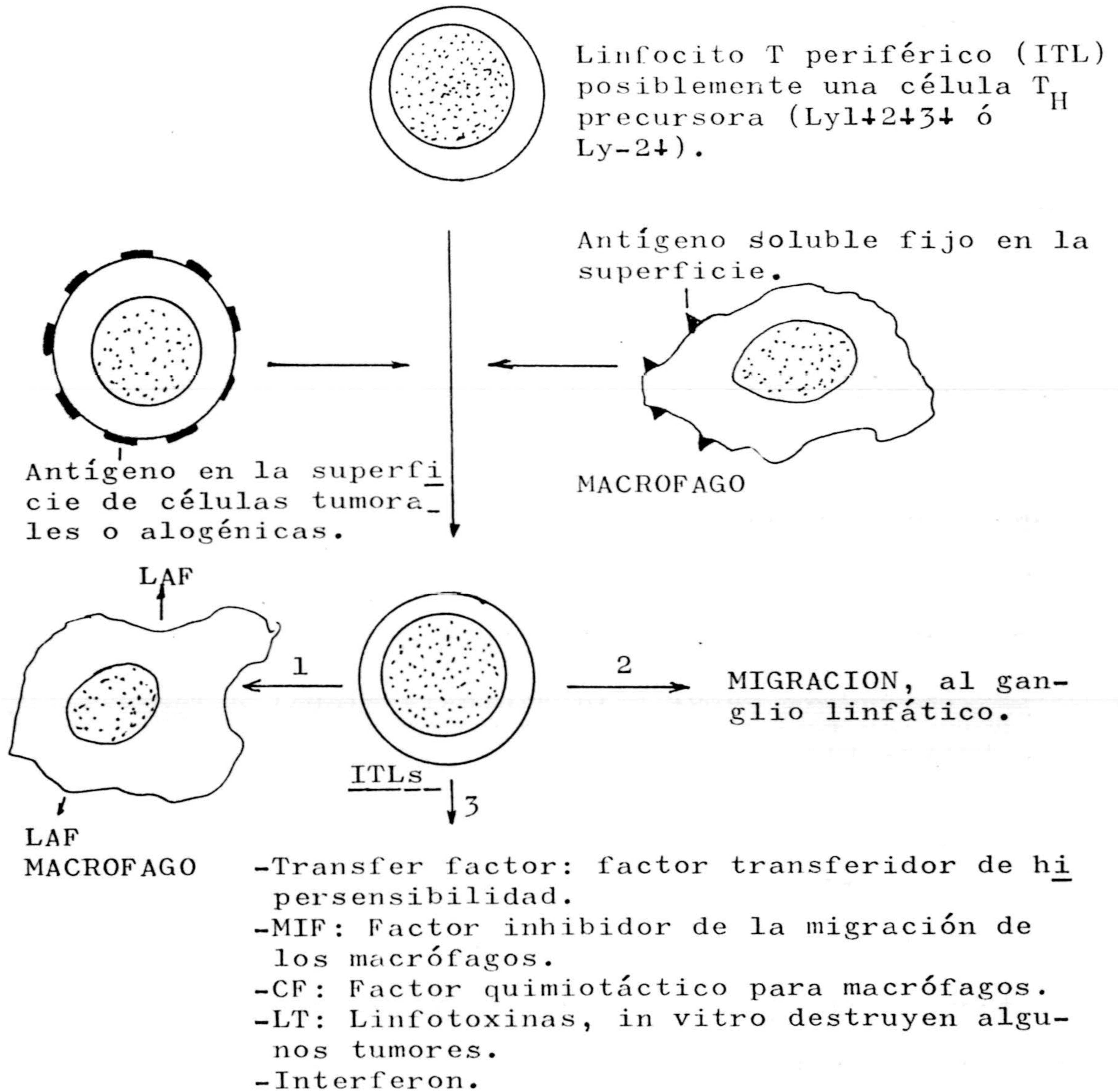


Fig. VIII.1. Fase de sensibilización de los linfocitos. Una vez sensibilizados (ITLs), responden en varios sentidos, activando macrófagos (1), migrando (2) y activando la síntesis proteica(3), no siendo necesaria la síntesis de ADN.

b) Fase de canalización de la respuesta inmune en los ganglios linfáticos.

Los ITL migradores, se localizan en el ganglio unas 12 horas después del contacto inicial de los mismos con el antígeno. Estos ITL han mostrado ser una subpoblación de células T adherentes a la lana de vidrio, y expresando Ia (I-J), y funcionalmente son células T_H , específicamente corresponden a las células denominadas T_{H2} (TADA Y COL., 1978 b).

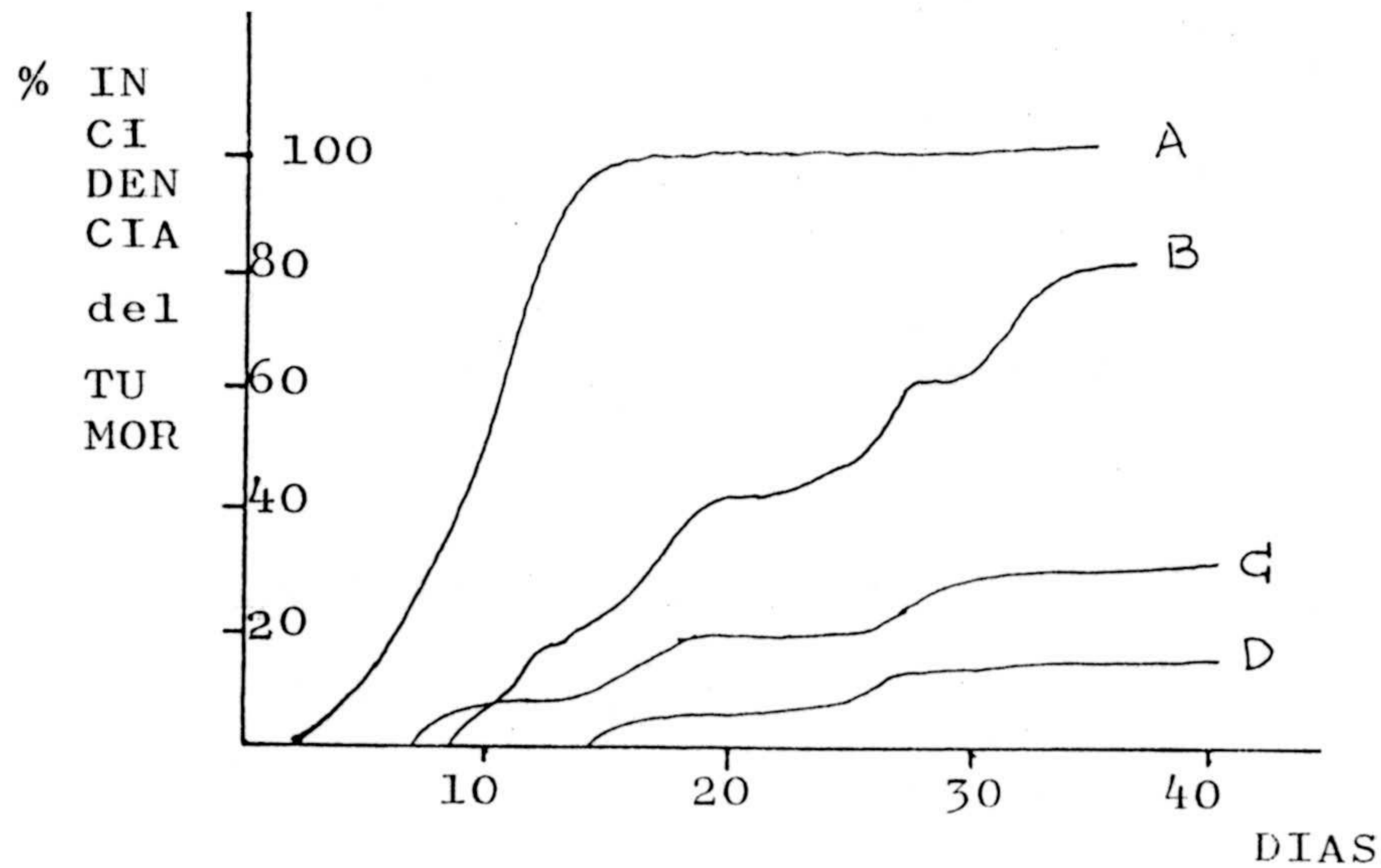
El ganglio responde a la presencia de los ITL aumentando de tamaño e incrementando el número de linfocitos presentes en él y la síntesis global de proteínas.

Es posible que en el inicio de esta fase, tanto el estímulo inducido por los ITL, como el LAF producido por los macrófagos, previamente activados por los linfocitos ITL sensibilizados, induzcan la producción de TCGF (Interleukina II) en una población de linfocitos T reclutados (RTL), estos RTL productores de TCGF, son una población de células colaboradoras $T_H Ly-1^+$. Este TCGF liberado, actuaría sobre el resto de los RTL, originando

su rápida división y diferenciación en células T efectoras citotóxicas (Fenotipo $Ly-1^{\downarrow}2^{\downarrow}$ ó $Ly\ 2^{\downarrow}$), células T con memoria y posiblemente células T_S .

c) Fase de migración de los linfocitos efectores desde la médula del nódulo linfático al lugar donde se localiza el antígeno.

La importancia de los ITL, se pudo comprobar en experiencias "in vivo" (COHEN y LIVNAT., 1976), de la supervivencia de ratones inoculados con tumor. (Fig.VIII.2). Las relaciones celulares que originarán la activación de linfocitos T_c efectores, células con memoria, células T_S "feed-back" y células T_S de la síntesis de anticuerpos, están esquematizadas en la fig. VIII.3.



Gráfica VIII.2. Necesidad e importancia de los ITL en el rechazo de tumores singénicos y en la supervivencia del ratón portador.

- A) Ratones controles inoculados con 5×10^5 células de 3LL (tumor original de C57BL).
- B) Ratones inoculados 5 días antes de la inoculación de 5×10^5 células de 3LL, con 10^7 células ITL tratadas con Tripsina.
- C) Ratones inoculados 5 días antes de la inoculación de 5×10^5 células de 3LL, con 10^7 células ITL, tratadas 15' con Tripsina y dejadas en reposo 4 horas antes de su inoculación.
- D) Ratones inoculados 5 días antes de la inoculación de 5×10^5 células 3LL, con 10^7 células ITL.

Determinándose también, que el reclutamiento en los ganglios por parte de los ITL, es inmunoespecífico.

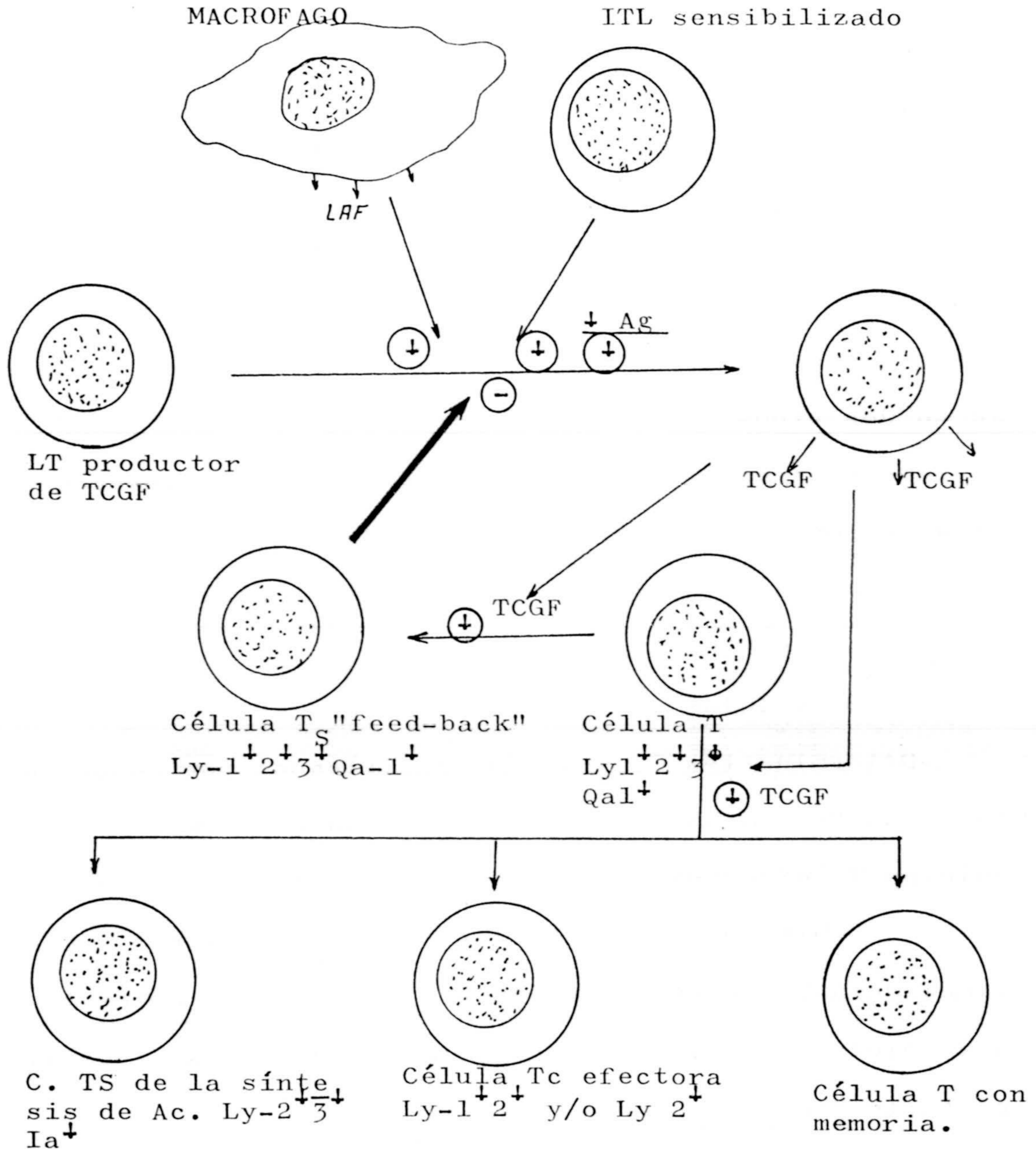


Fig. VIII.3. Posibles mecanismos de activación de linfocitos Tc efectora, LT con memoria, LT_S de la síntesis de Ac y células T_S feed-back. Al menos los tres primeros tipos celulares se activan a nivel del ganglio hiperplásico.

Otros estudios "in vitro", fundamentalmente MLC y CML (cultivo mixto de linfocitos y citotoxicidad mediada por células), han permitido el estudio de las respuestas celulares frente a aloantígenos. En ambos sistemas, se ha podido demostrar, que los determinantes antigénicos activadores de los linfocitos pueden agruparse en dos tipos:

-Determinantes L : son aquellos determinantes codificados por genes de la región H-2 I, y que activan fundamentalmente células T_H . Siendo estas células las que proliferan en MLC. Siendo células Ia^+ , las que funcionan mejor como células estimuladoras en un MLR primario.

-Determinantes C: son los codificados por genes de las regiones H-2K ó H-2Dy que activan fundamentalmente células T_C efectoras o precursoras de ellas.

Diferencias entre las células efectoras y estimuladoras, que provoquen la estimulación de ambos tipos celulares, originará una potente respuesta citotóxica tanto "in vitro" como "in vivo".

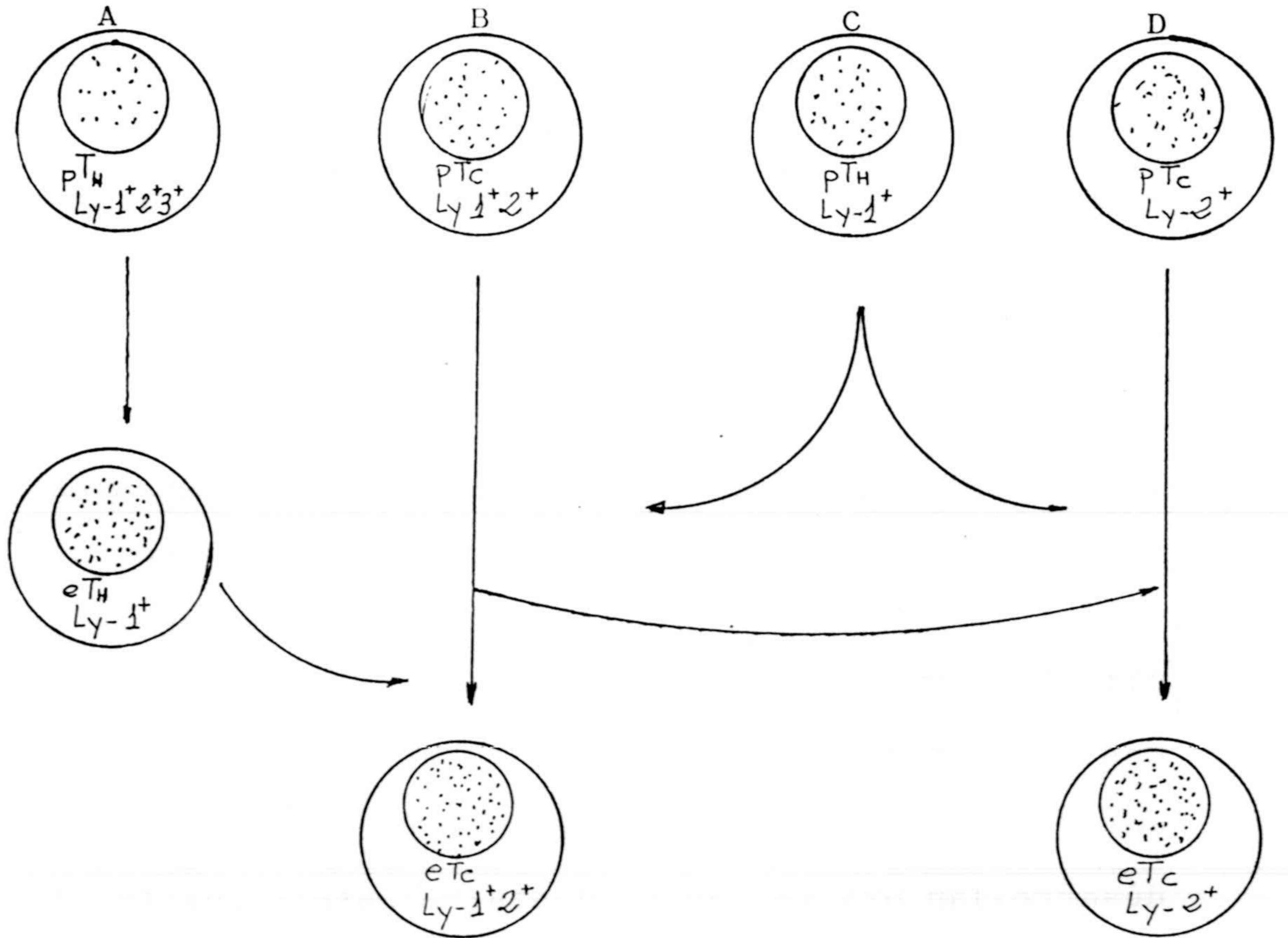


Fig. VIII.4. Vías de activación de los linfocitos T en una respuesta primaria. Las células A se activarían frente a determinantes asociados a la región I mientras que las B lo harían frente a determinantes codificados por las regiones H-2K ó H-2D; ambos tipos celulares se activarían frente a células estimuladoras que difieran solo en las regiones H-2K ó H-2D. Las células C se activarían frente a diferencias en los determinantes codificados por la región I, y en este caso las células D, lo harían frente a determinantes codificados por las regiones H-2D ó H-2K; Ambas poblaciones (C y D), se activarían simultáneamente frente a células que difieran de ellas en las regiones I y H-2K ó H-2D.

Aunque básicamente, los determinantes descritos, son los responsables de las respuestas proliferativas y citotóxicas en un MLR y CML, hay que diferenciar, al ser distintos, los mecanismos de producción de células citotóxicas en una respuesta primaria de los que originan células citotóxicas en una respuesta secundaria.

En una respuesta primaria, frente a aloantígenos o a los mismos antígenos modificados, el mecanismo de producción de las células citotóxicas descrito en la Fig. VIII.4 (BACH y col., 1979) es el aceptado. De acuerdo con ello, los linfocitos T en presencia de un estímulo antigénico codificado solo por la región H-2K ó H-2D, desarrollan una respuesta doble; mientras que los linfocitos T $Ly-1^+ 2^+ 3^+$, se activan por componentes relacionados con la región I, los $pT_C Ly-1^+ 2^+$ (linfocitos T precursores de los citotóxicos) reconocen los antígenos codificados por H-2K ó H-2D. La colaboración entre ambos tipos celulares activados permite la producción de células efectoras T_C .

Pero si el estímulo antigénico es doble (diferencias en las regiones H-2D ó H-2K y en la región I), las poblaciones

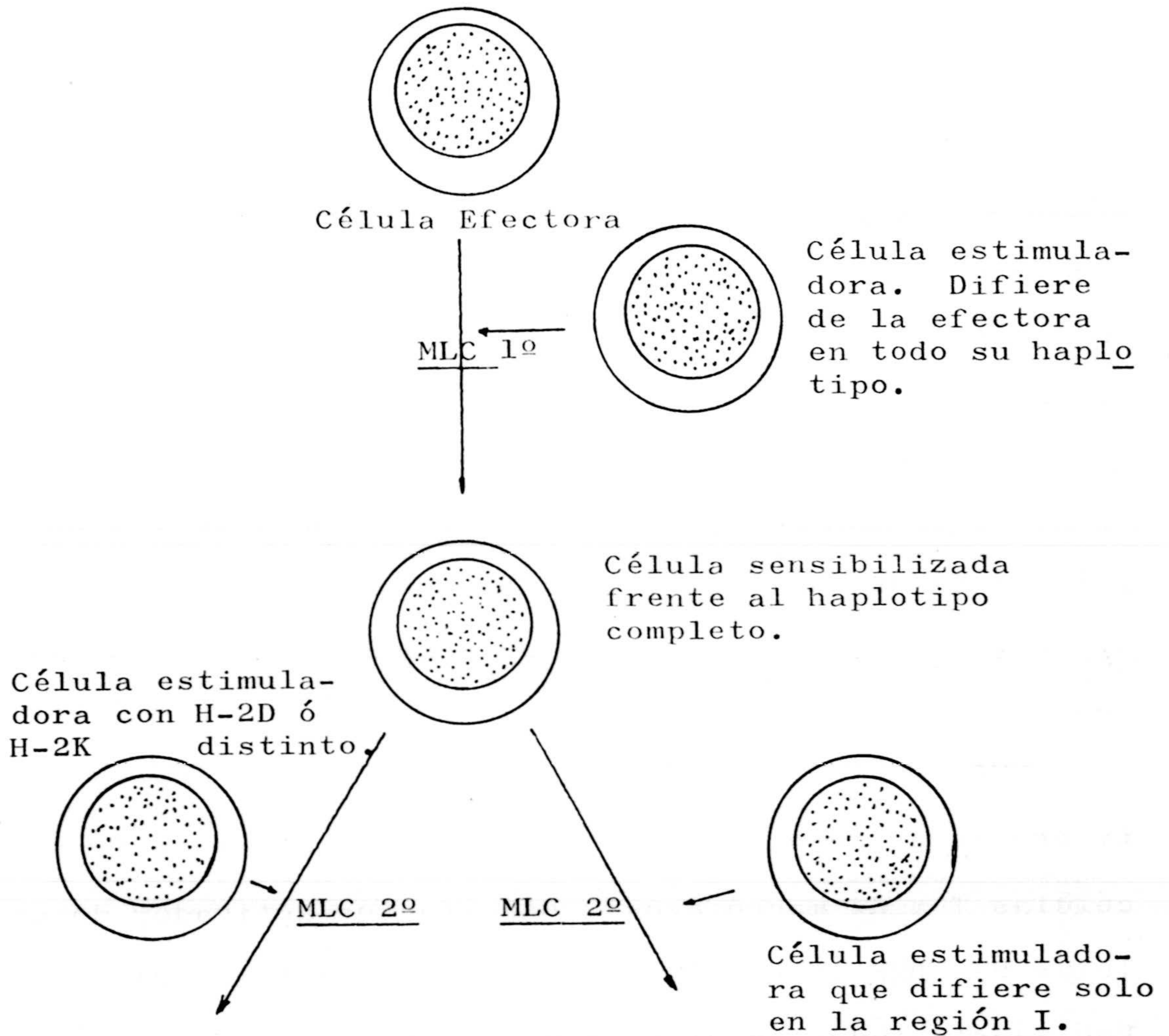
nes que van a responder, serán diferentes. En este caso, las células pT_H Ly-1⁺, se activan frente a determinantes de la región I, y las PT_C Ly-2⁺, lo hacen frente a los antígenos H-2D ó H-2K distintos. Del mismo modo la colaboración entre ambas subpoblaciones celulares activadas permitirá la generación de células efectoras citotóxicas de fenotipo Ly-2⁺ (eT_C).

Podría deducirse de esto que ambas vías son totalmente independientes; se ha observado, sin embargo, que esas dos vías de activación y generación de células eT_C pueden coexistir en un mismo proceso.

En una respuesta secundaria, la activación de los linfocitos frente a diferencias de un haplotipo completo, difiere esencialmente del proceso descrito para la activación en una respuesta primaria. Ya que si utilizamos en la reestimulación de células sensibilizadas frente a un haplotipo completo, células que difieran salo en la región H-2D ó H-2K, no existe o es muy baja la respuesta citotóxica generada en este MLR secundario,

Pero si las células utilizadas como estimuladoras en la sensibilización secundaria, difieren en la región I con las células efectoras previamente sensibilizadas, (frente a diferencias en todo el haplotipo), estas dan una respuesta citotóxica secundaria dirigida a los determinantes codificados por las regiones H-2D ó H-2K, de las células estimuladoras iniciales. Sin embargo diferencias sólo en la región I, son incapaces de inducir respuesta primaria frente a antígenos codificados por las regiones H-2K ó H-2D. (Fig. VIII.5).

Las células que responden a determinantes de la región I en un MLC secundario, tienen de fenotipo Ly-1⁻, denominándoseles células con memoria; representando hasta el momento una subpoblación diferente de las células T_H que proliferan en un MLC primario.



No se origina respuesta
citotóxica secundaria.

Sí hay respuesta citotóxica
secundaria frente a dianas
con igual haplotipo que las
células estimuladoras en el
MLC 1º.

Fig. VIII.5. Génesis de las células responsables de la respuesta citotóxica secundaria.

VIII. 2. Factores solubles implicados en la regulación de la actividad inmune de las células T.

-LAF (Factor activador de los linfocitos) o Interleuquina 1: Se obtiene de sobrehadantes de cultivos de macrófagos y/o monocitos tanto humanos como de ratón. Posee un peso molecular de 12000 a 18000 daltones; y un pI isoelectrico de 4,5-5,5 en ratón y de 6,5-7,5 en el hombre; es insensible a pH 2 no conteniendo determinantes Ia. Este factor ha recibido numerosas denominaciones: MP(proteína mitogénica), H-P-1, TRF-III (factor sustitutorio de células T), TRF-m (factor sustitutorio de células T y de macrófagos), BAF (factor activador de células B), BDF (factor diferenciador de células B).

Por suerte todos estos factores se han descrito como un único factor denominándosele Interleuquina I (2ª Reunión Internacional de linfoquinas., 1979). Este factor posee actividad interespecífica siendo incapaz de promover y mantener las células T en cultivo continuo.

-TCGF (Factor de crecimiento de células T); el nombre asignado actualmente, es el de Interleuquina II (2ª Reunión Internacional de Interleuquinas., 1979). Corresponde de esta designación a una molécula proteica de Pm:30000 a 35000 Daltones, con pH isoeléctrico=3.5-5.5, estable a pH 2 y al tratamiento con 2-ME; careciendo de determinantes Ia. Se sabe que es producido por las células T con la presencia de células adherentes (macrófagos). Otras denominaciones anteriores para este factor eran: TSF (Factor estimulador de los timocitos), TMF (Factor mitogénico de timocitos), KHF (Factor colaborador de células Killer), y SCIF (Factor inductor de células T citotóxicas en respuesta secundaria).

Al parecer, ambos factores desempeñan una importantísima función en las respuestas celulares a mitógenos, aloantígenos, antígenos tumorales o los mismos antígenos alterados (Fig. VIII.6); siendo muy posible que todos estos factores actúen al menos sobre tres poblaciones de células T (SMITH y col., 1979), que estarían conectadas entre sí de acuerdo con el esquema descrito en la Fig. VIII.6.

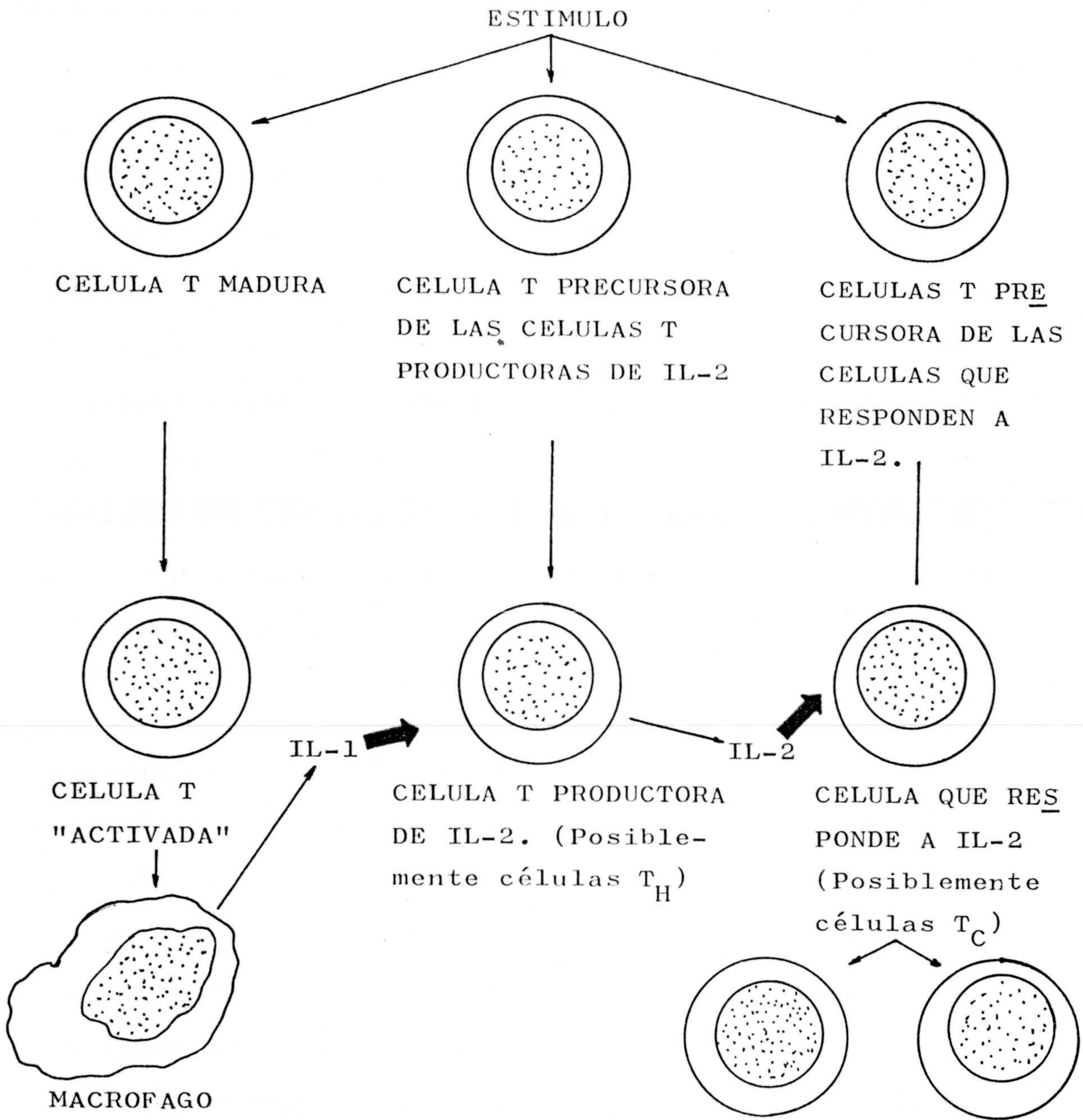


Fig.VIII.6. Modelo de colaboración intercelular mediada por factores solubles (SMITH y col., 1979).

Ese mismo esquema, explicaría:

a) La necesaria presencia de los macrófagos para que las respuestas de transformación blástica sean normales.

b) La función de los coadyuvantes. Estos compuestos favorecen el acúmulo de macrófagos y la interacción con linfocitos T activados. Esa interacción, da lugar a la producción de IL-1 (LAF) por parte de los macrófagos.

c) La supresión de la respuesta Inmune celular, por células o factores solubles que actuarían bloqueando la producción de IL-2(TCGF), bien a nivel de las células productoras, bien a nivel de los macrófagos.

d) Algunas inmunodeficiencias, ya que en estos casos se ha comprobado una estrecha relación entre producción anormal de IL-2 y ausencia de respuesta inmune.

OBJETO DE LA TESIS

Los objetivos que nos propusimos al iniciar este trabajo fueron:

1.- Detectar, mediante la Técnica de transformación linfocitaria, la posible capacidad inhibidora, de dicha transformación, presente en Sueros y/o fluidos ascíticos de ratones portadores de tumores en forma ascítica.

2.- Determinar, en el supuesto de que la capacidad inhibidora fuese manifiesta, la influencia del mitógeno utilizado en la inducción de la transformación linfocitaria.

3.- Analizar la posible relación entre los haplotipos de las células tumorales y el de las células linfoides normales utilizadas como dianas.

4.- Investigar la posible relación entre el origen del tumor y el efecto inhibitorio observado en los sueros y fluidos ascíticos de los ratones portadores del mismo.

**MATERIAL
Y
METÓDOS**

MATERIAL Y METODOS

	<u>Pag.</u>
I.- DESCRIPCION DE LAS TECNICAS.....	253
I.1.-Test de Transformación linfocitaria...	253
I.2.-Inhibición del test de tranformación linfocitaria.....	261
II.-MATERIALES UTILIZADOS EN LAS TECNICAS.....	268
III.-METODOS ESTADISTICOS.....	272

I.- DESCRIPCION DE LAS TECNICAS.

I.1.- TTL (Test de transformación linfocitaria).

= Fundamento.- Las células linfoides de bazo y ganglios de ratón, son capaces de responder transformándose en linfoblastos y reproduciéndose activamente en presencia de pequeñas cantidades de algunas Lectinas u otros mitógenos policlonales.

=Mitógenos empleados:

- ConA : Concanavalina A. (Sigma Lab.) en forma cristalina. Las distintas diluciones se preparan en PBS (solución salina tamponada con fosfato), adicionando $10 \mu\text{l}$ a los pocillos de cultivo (el volumen final en dichos pocillos es siempre de $200 \mu\text{l}$), para conseguir la transformación de las células linfoides. La dilución inicial de este mitógeno, designada por 1/1, corresponde a una concentración de 4mg/ml , que equivaldría a una concentración de $0,4\text{mg/ml}$ de medio de cultivo. Las concentraciones de cada una de las diluciones utilizadas se indican en la

Tabla A:

Dilución	Concentración	
	Inicial $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	en el cultivo $\mu\text{g}/\text{ml}$
1/4	1	50
1/8	0.5	25
1/16	0.25	12.5
1/32	0.125	6.25
1/64	0.0625	3.125
1/128	0.03125	1.5625
1/256	0.01562	0.7812

TABLA A. Diluciones de ConA utilizadas y concentraciones finales de la misma en los pocillos de cultivo.

- PWM : Pokewed mitogen. (Sigma Lab.) en forma cristalina. Las diluciones se preparan en PBS (solución salina tamponada), adicionando $10\mu\text{l}$ a los pocillos de cultivo (el volumen final en dichos pocillos es siempre de $200\mu\text{l}$), para conseguir la transformación de las células linfoides. La dilución inicial de este mitógeno, designada por 1/1, corresponde a una concentración de $2\text{mg}/\text{ml}$.

Dilución	Concentración	
	Inicial $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Concentración en el cultivo $\mu\text{g}/\text{ml}$
1/1	2	100
1/2	1	50
1/4	0.5	25
1/8	0.25	12.5
1/16	0.125	6.25
1/32	0.0625	3.125
1/64	0.0312	1.562

TABLA. B.- Diluciones de PWM utilizadas y concentraciones finales del mismo en los pocillos de cultivo.

- LPS : Lipopolisacárido de pared bacteriana (Sigma Lab.) en forma cristalina. Las diluciones se preparan en PBS (solución salina tamponada con fosfato), adicionando $10\ \mu\text{l}$ a los pocillos de cultivo (el volumen final en dichos pocillos, es siempre de $200\ \mu\text{l}$), para conseguir la transformación de las células linfoides. La dilución inicial de este mitógeno, designada por 1/1, corresponde a una concentración de $10\ \text{mg}/\text{ml}$.

Dilución	Concentración	
	Inicial $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	en el cultivo $\mu\text{g}/\text{ml}$
1/1	10	500
1/2	5	250
1/4	2.5	125
1/8	1.25	62.5
1/16	0.625	31.25
1/32	0.312	15.62
1/64	0.156	7.81
1/128	0.078	3.91
1/256	0.039	1.95

TABLA. C.- Diluciones de LPS utilizadas y concentraciones finales del mismo en los pocillos de cultivo.

- PHA : Fitoheماغlutinina (Wellcome Lab.) en forma liofilizada. Las diluciones se preparan utilizando agua destilada y estéril como disolvente, adicionando $5\mu\text{l}$ a los pocillos de cultivo (el volumen final en dichos pocillos, es siempre de $200\mu\text{l}$), para conseguir la transforma

ción de las células linfoides. La dilución inicial, designada por 1/1, corresponde a una concentración de 9mg/ml (aproximadamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante).

Dilución PHA	Concentración	
	Inicial $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	en el cultivo $\mu\text{g}/\text{ml}$
1/1	9	225
1/2	4.5	112.5
1/4	2.25	56.25
1/8	1.12	28.12
1/16	0.56	14.06
1/32	0.28	7.03

TABLA. D. Diluciones de PHA utilizadas y concentraciones finales de la misma en los pocillos de cultivo.

=Células linfoides : Para cada una de las cepas estudiadas, se seleccionaron lotes de tres ratones de la misma edad (10 semanas). Con cada uno de los lotes, se

procede a la extirpación de los bazos , ganglios linfáticos y Timos respectivos. Con ellos se realiza un homogeneizado en RPMI 1640, filtrándolo en gasa estéril. Previo choque hipotónico (para lisar los hematíes), se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos, al final de los cuales y tras el contaje de las células linfoides en una cámara Neubauer con microscopio de contraste de fase, se ajusta la concentración a 2×10^6 células linfoides por mililitro de suspensión.

=Desarrollo del TTL. Realizado en placas de microcultivo, En los pocillos utilizados como control, se colocan $100 \mu\text{l}$ de la suspensión de células linfoides (equivalente a 200.000 células/pocillo), $90 \mu\text{l}$ de medio RPMI 1640 y $10 \mu\text{l}$ de PBS, si los mitógenos empleados son PWM, ConA ó LPS y $100 \mu\text{l}$ de suspensión celular, $95 \mu\text{l}$ de medio RPMI 1640, y $5 \mu\text{l}$ de agua destilada si se emplea PHA como mitógeno.

En los pocillos empleados para medir la transformación inducida por los mitógenos PWM, ConA y LPS, se colocan $100 \mu\text{l}$ de la suspensión celular, $90 \mu\text{l}$ de medio y $10 \mu\text{l}$ de cada una de las diluciones del mitógeno.

En los pocillos utilizados para medir la transformación inducida por PHA, se colocan $100 \mu\text{l}$ de la suspensión celular, $95 \mu\text{l}$ de medio y $5 \mu\text{l}$ de cada una de las diluciones del mitógeno.

Preparadas de esta forma las placas de microcultivo, se introducen en estufa de CO_2 (5%) a 37°C durante tiempos variables: 72 horas si se emplea PHA, 48 horas si se utiliza ConA, 96 horas para el mitógeno PWM y 72 horas para LPS.

Al cumplir los distintos tiempos de cultivo, se añade a cada uno de los pocillos utilizados, $5 \mu\text{l}$ de una solución en PBS (solución salina tamponada) de Timidina ^{14}C ($0.125 \mu\text{Ci/pocillo}$) (Amersham).

Tras la adición del isótopo (nucleósido marcado en el carbono 2 de la Timina), se vuelve a introducir en la estufa durante 18 horas, para que el nucleósido marcado se incorpore en las moléculas de ADN sintetizadas "de novo". Transcurrido este lapso de tiempo, el contenido de los pocillos se recoge con el recolector semiautomático de cultivos, utilizando como fase dispersante agua destilada (para conseguir la rotura de las células y eliminación de

la Timidina no incorporada a las moléculas de ADN). Las moléculas de ADN, y otros restos celulares quedan retenidas en papel-filtro previamente colocado en el recolector. El papel-filtro correspondiente a cada uno de los pocillos de la placa de microcultivo, se coloca en tubos de contaje, añadiéndole 10 ml de líquido de centelleo.

Estos tubos de contaje se cuentan en un contador de centelleo líquido durante 10 minutos/tubo. Expresándose la Timidina incorporada en cuentas por minuto (cpm).

Una vez conocidos estos datos, el porcentaje de estimulación obtenido para cada mitógeno o para cada dosis de un mismo mitógenos se obtiene de:

$$\begin{array}{l} \% \text{ específico de} \\ \text{Timidina-}^{14}\text{C-} \\ \text{incorporada=} \\ (\% \text{ de transfor} \\ \text{mación}). \end{array} = \frac{x_i - \bar{x}_0}{\bar{x}_0} \cdot 100$$

En donde:

x_i = cpm de un pocillo de la prueba.

\bar{x}_0 = cpm medias de todos los pocillos de control.

I.2.- Inhibición del TTL.

Se ha estudiado en células linfoides de ratón estimuladas a las dosis óptimas para cada uno de los mitógenos, puestas en contacto con suero o fluidos ascíticos de ratones portadores de tumores.

= Tumores empleados:

<u>TUMOR</u>	<u>HAPLOTIPO</u>	<u>CEPA</u>	<u>ORIGEN</u>
METHA	H-2 ^d	BALB/C	Químico (M.C.)
MCG4*	H-2 ^d	BALB/C	Químico (M.C.)
SL-2	H-2 ^d	DBA/2	Espontáneo(Leucemia)
P815X2	H-2 ^d	DBA/2	Químico
L5178YE	H-2 ^d	DBA/2	Espontáneo
L1210	H-2 ^d	DBA/2	Químico
LSTRA	H-2 ^d	BALB/C	V.Moloney(Leucemia)
MCG-3*	H-2 ^b	B10	Químico (M.C.)
EAKR	H-2 ^b	B10	V. Gross
MBL-2	H-2 ^b	C57BL/6♀	V. Moloney(Leucemia)
EL-4	H-2 ^b	C57BL/6♀	Químico(Leucemia) Benzopireno.
TLX-9	H-2 ^b	C57BL/6	R.X. (Linfoma).
GIL-IV	H-2 ^b	C57BL/6	V. Graffi (Leucemia)
EOK1 ♀	H-2 ^b	C57BL/6	V. Gross
GADNER	H-2 ^k	CBA/H	Químico(Linfosarcoma)
TLC/5	H-2 ^k	CBA/H	Químico(Linfoma) M.C.

Todos los tumores, han sido cedidos por distintos centros de Immunología, a excepción de los denominados MCG4 y MCG3, producidos en nuestro laboratorio. Unos y otros, se cultivan y producen tanto "in vitro" como "in vivo", conservándolos hasta el momento de su uso en un contenedor de Nitrógeno líquido.

= Sueros y Fluidos ascíticos de ratones portadores de tumor.

Para su producción se prepararon los siguientes lotes de ratones (todos con 10 semanas de edad).

3 lotes de 5 ratones BALB/C

4 lotes de 5 ratones DBA/2

2 lotes de 5 ratones BALB/C

5 lotes de 5 ratones C57BL/6

2 lotes de 5 ratones CBA/H

A cada uno de estos lotes, se les inocularon 2×10^6 células/ratón, de cada uno de los tumores citados anteriormente, mediante punción intraperitoneal (cada tumor logicamente en la cepa donde originalmente se había obtenido).

a) Obtención de los sueros de ratones portadores de tumor:

Cuando la ascitis tumoral es evidente (aproximadamente a los 7-10 días de la inoculación intraperitoneal), y por punción en la arteria retiniana del ratón con capilar estéril, se realiza la sangría de los ratones de cada uno de los lotes.

Las sangres obtenidas se dejan coagular durante dos hora a 37°C en estufa y una vez formado el coagulo, se centrifugan a 2000 rpm durante 15 minutos, obteniéndose el suero de las mismas. Todos los sueros de un mismo lote se mezclan y se descomplementan manteniéndolos durante 30 minutos a 56°C.

Estos sueros descomplementados se distribuyen en tubos Beckman de 0.3 ml, manteniéndolos en contenedor de Nitrógeno líquido para su uso posterior.

b) Obtención de los Fluidos Ascíticos de ratones portadores de tumores.

Una vez sangrados los ratones de acuerdo con el proce-

dimiento descrito en el apartado anterior, se procede a la extracción con jeringa estéril de las ascitis de los mismos.

Esas ascitis, se centrifugan durante 10 minutos a 1500 rpm, recogiendo el sobrenadante de las mismas. Dicho sobrenadante se vuelve a acentrifugar durante 20 minutos a 2500 rpm. Transcurrido este tiempo, se recogen de nuevo los sobrenadantes y se descomplementan, dispensándolos a continuación en tubos Beckman de 0.3ml y se introducen en el contenedor de Nitrógeno líquido para su conservación.

=Desarrollo de la prueba de inhibición del
TTL.

a) Al emplear los mitógenos LPS, ConA ó PWM.

Se utilizan dos tipos de controles;

-Pocillos en los que se dispensan: $100 \mu l$ de células linfoides, $90 \mu l$ de medio y $10 \mu l$ de PBS. Las cpm obtenidas en los mismos, tras la posterior adición del nucleósido marcado, las designamos por x_0 . Las medias en cpm obtenidas en este control, las comparamos (test de comparación de dos medias) con las obtenidas en los pocillos que con-

tienen $100 \mu\text{l}$ de células linfoides, $90 \mu\text{l}$ de medio, $5 \mu\text{l}$ de PBS y $5 \mu\text{l}$ de suero descomplementado de ratones normales de cada una de las cepas utilizadas en la producción de tumores; no siendo dichas medias significativamente distintas.

-Pocillos en los que se dispensan: $100 \mu\text{l}$ de células linfoides, $90 \mu\text{l}$ de medio y $10 \mu\text{l}$ de mitógeno. Las cpm obtenidas en los mismos, tras la posterior adición del nucleósido marcado, las designados por x_1 y su media por \bar{x}_1 . Estas medias obtenidas (\bar{x}_1), se comparan (test de comparación de dos medias) con las obtenidas en los pocillos que contienen $100 \mu\text{l}$ de células linfoides, $85 \mu\text{l}$ de medio, $10 \mu\text{l}$ de mitógeno y $5 \mu\text{l}$ de suero descomplementado de ratones normales de cada una de las cepas utilizadas en la producción de los tumores; no siendo dichas medias significativamente distintas.

En los pocillos utilizadas para probar el efecto de cada uno de los sueros y fluidos ascíticos de los ratones portadores de tumor, sobre la transformación inducida por el mitógeno, ponemos:

100 μ l de células linfoides, 85 μ l de medio, 10 μ l de mitógeno y 5 μ l de suero o fluido ascítico. Las cpm obtenidas en los mismos, tras la posterior adición del nucleóído marcado, las designamos por x .

b) Al emplear los mitógenos PHA.

Los controles y los pocillos de prueba básicamente son iguales a los descritos en el apartado a, diferenciándose en las cantidades relativas de los componentes presentes en cada uno de los pocillos.

En este caso, las x_0 , representan las cpm obtenidas en pocillos que contienen: 100 μ l de células linfoides, 95 μ l de medio y 5 μ l de agua destilada.

Los valores indicados por x_1 , representan las cpm obtenidas en los pocillos con 100 μ l de células linfoides, 95 μ l de medio y 5 μ l de PHA (dilución óptima).

Por último, los valores indicados por x, representan las cpm de los pocillos que contienen: 100 μ l de células linfoides, 90 μ l de medio, 5 μ l de PHA y 5 μ l de suero o fluido ascítico.

En ambos casos las dosis de mitógeno empleadas son las óptimas, y los sueros y fluidos ascíticos se añaden a los pocillos dos horas después de haberles adicionado el mitógeno, manteniendo las placas de microcultivo durante este periodo en la estufa a 37°C.

Los porcentajes de inhibición obtenidos para cada caso, se expresan de acuerdo con la fórmula:

$$\% I = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_0) - (x - \bar{x}_0)}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0} \cdot 100 = \frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0} \cdot 100$$

II.- MATERIALES UTILIZADOS EN LAS TECNICAS.

a) Agua con pH 7, que ha sido sometida a procesos de destilación, desionización, filtración por Millipore de $0,1 \mu$ y posteriormente envasada en recipientes de 100 ml para ser sometidos a destilación en autoclave.

b) Bicarbonato sódico al 7,5% (GIBCO. BIO-CULT, Glasgow, Scotland. Lote N^o K952702) solución estéril y utilizada al 0,2% en el medio de cultivo.

c) Cloxacilina-Ampicilina.

La solución madre de 100 mg/ml en agua destilada, es envasada en ampollas de 3 ml. conservándose congeladas hasta el momento de su utilización.

d) Suero fetal de Ternera.

Se utilizan envases de 100 ml. se suero (GIBCO, BIO-CULT, lote n^oL594001 S) que se descomplementan a 56°C durante 30 minutos en baño maría y se distribuyen en botes estériles de 10ml que se congelan hasta

el momento de su uso.

e) Medio de cultivo.

RPMI-1640 en polvo con L-glutamina y sin bicarbonato sódico (GIBCO). Preparándose el mismo para su utilización como sigue:

RPMI-1640	10 g.
Suero fetal ternera	100 ml.
Cloxac.-Ampicilina	20 ml.
Bicarbonato	26,6ml.
Glutamina	10 ml

Completar con agua destilada hasta 1 litro. ajustándose el pH final a 7.35. La esterilización se finaliza mediante filtración en Millipore.

f) PBS (solución salina tamponada con fosfato).

La fase dispersa de esta solución, está constituida por ClNa , PO_4HNa_2 y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ a las siguientes concentraciones:

ClNa	7.2 g/l
PO_4HNa_2	1.48g/l
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.44g/l

siendo la fase dispersante agua destilada. Este PBS así preparado, se envasa en botes de 100 ml que se esterilizan en autoclave y se conservan congelados.

g) Placas de microcultivo.

Microtest plate. Tipo Flat well (Sterilin).

h) Estufa de cultivo.

Incubador de CO₂ (Forma Scientific).

i) Centrífuga.

En todos los casos se ha utilizado una centrífuga con 10 cm. de radio.

j) Recolector semiautomático de células.

Recolector Whatman, GFA, 3,8 x 30,5 cm. Papel-filtro Whatman.

k) Isótopo.

Timidina(2-¹⁴C) con una concentración radiactiva de 50 μCi/ml (Amersham). Diluyéndola con

PBS hasta una concentración radiactiva de 25 μ Ci/ml.
De esta dilución añadimos 5 μ l a cada pocillo de cultivo,
equivalente a 0,125 μ Ci/pocillo.

l.) Líquido de centelleo.

Se prepara disolviendo 5 g. de
PPO (2-5-difeniloxazol) en un litro de tolueno.

m) Contador de centelleo líquido LKB.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

En toda la exposición que se incluye en este apartado se utilizará la siguiente notación:

n , para designar a los tamaños de la muestra.

\bar{x} , para designar a la media de una muestra.

S^2 , para designar a la varianza de una muestra.

S , para designar a la desviación típica de una muestra.

En donde la media y varianza se calculan del modo tradicional:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad S^2 = \frac{1}{n-1} \left\{ \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right\}$$

I.- TEST DE COMPARACION DE VARIANZAS.

I.1.- Comparación de dos varianzas.

Dadas dos varianzas S_1^2 y S_2^2 , basadas en tamaños muestrales n_1 y n_2 , en donde suponemos $S_1^2 > S_2^2$, calcúlese la cantidad experimental $F_{exp} = S_1^2 / S_2^2$, cantidad que ha de compararse con la F_α teórica buscada en las tablas de la F de Snedecor con (n_1-1, n_2-1) grados de libertad (g.l.)

al nivel de error α que se desee. Entonces:

Si $F_{\text{exp}} \leq F$ \implies varianzas iguales.

Si $F_{\text{exp}} > F$ \implies varianzas distintas con error 2 .

I.2.- Comparación de varias varianzas.

Dadas k varianzas, $S_1^2, S_2^2, \dots, S_k^2$, basadas en muestras de tamaños n_1, n_2, \dots, n_k , entonces la cantidad:

$$\chi_{\text{exp}}^2 = \frac{1}{c} \left\{ (\sum f_i) \ln \frac{\sum f_i S_i^2}{\sum f_i} - \sum f_i \ln S_i^2 \right\}$$

en donde $c = 1 + \frac{1}{3(k-1)} \left\{ \sum \frac{1}{f_i} - \frac{1}{\sum f_i} \right\}$

$$f_i = n_i - 1$$

ha de ser comparada con una cantidad teórica χ_{α}^2 obtenida de las tablas de la distribución JI-CUADRADO, con (k-1)

g.l. y al nivel de error α deseado. Entonces:

-Si $\chi_{\text{exp}}^2 \leq \chi_{\alpha}^2$ \implies Todas las varianzas son iguales.

-Si $\chi_{\text{exp}}^2 > \chi_{\alpha}^2$ \implies alguna varianza es distinta de las demás, con error α .

Sin embargo, cuando todos los tamaños de muestra son iguales ($n_1 = n_2 = \dots = n_k$), un método más cómodo de comparar las varianzas consiste en calcular las varianzas mayor y menor de entre las S_1^2, \dots, S_k^2 (digamos S_{\max}^2 y S_{\min}^2) y comparar la cantidad $C_{\text{exp}} = S_{\max}^2 / S_{\min}^2$ con la cantidad C_{α} teórica obtenida de la tabla dada por BECKMAN y TIETJEN* con g.l. = n , K el nº de varianzas implicadas y α el error deseado; entonces:

Si $C_{\text{exp}} \leq C_{\alpha} \implies$ todas las varianzas son iguales.

Si $C_{\text{exp}} > C_{\alpha} \implies$ alguna de las varianzas es distinta de las demás, con error α .

II.- TEST PARA UNA MEDIA.

Dada una muestra n , \bar{x} , S^2 , obtenida de una población cuya media real es μ , para comprobar si μ vale cero o no se calcula:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}}{S} \sqrt{n}$$

y se compara con una t_{α} teórica, obtenida de la tabla de STUDENT con $(n-1)$ g.l. y al nivel de error α deseado. Entonces:

Si $t_{\text{exp}} \leq t_{\alpha} \implies \mu = 0$

Si $t_{\text{exp}} > t_{\alpha} \implies \mu \neq 0$, con error α .

III.- TEST DE COMPARACION DE DOS MEDIAS.

Dadas dos muestras n_1, \bar{x}_1, S_1 y n_2, \bar{x}_2, S_2^2 obtenidas de dos poblaciones con medias reales μ_1 y μ_2 , se desea ver si son iguales o no.

Para ello, se comienza por comparar las varianzas de ambas muestras por el método indicado en I.1. y al nivel de error $\alpha = 10\%$ (para protegernos de decisiones erróneas en los dos sentidos).

Cuando las varianzas son iguales, calcular $g = n_1 + n_2 - 1$,

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{y} \quad t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (1)$$

Cuando las varianzas sean distintas, calcular:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}; \quad g = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{(S_1^2/n_1)^2}{n_1 - 1} + \frac{(S_2^2/n_2)^2}{n_2 - 1}}$$

En ambos casos, la cantidad experimental t_{exp} se la compara con la cantidad teórica t_α obtenida de las tablas de STUDENT con g . grados de libertad y el nivel de error

α deseado; entonces:

$$\text{Si } t_{\text{exp}} \leq t_{\alpha} \implies \mu_1 = \mu_2$$

$$\text{Si } t_{\text{exp}} > t_{\alpha} \implies \mu_1 \neq \mu_2, \text{ con error } \alpha .$$

Cuando tengan que compararse varias medias, de un conjunto de muestras homogéneas en algún modo, se comparan inicialmente todas las varianzas por el método indicado en I.2. Si las varianzas resultaran distintas, se aplica lo dicho en el presente apartado; si las varianzas resultasen iguales, entonces puede hacerse una estimación a partir de todas las muestras, de la varianza común, a saber:

$$S_D^2 = \frac{\sum (n_i - 1) S_i^2}{\sum (n_i - 1)}$$

y será S_D , la cantidad a sustituir en la expresión (1), en lugar de la S .

Referencias.

- BECKMAN, R.J. and TIETJEN, G.L. (1973). Upper 10% and 25% points of the maximum F ratio. Biometrika. 60,1, 213-214.

RESULTADOS

RESULTADOS

Pag.

I.- Resultados obtenidos en la búsqueda de la dosis óptima de cada mitógeno en cada cepa..	279
II.- Combinaciones óptimas cepas-mitógenos.....	294
III.-Efecto Dosis-Respuesta de los Fluidos ascíticos sobre células linfoides de ratón..	301
IV.- Resultados obtenidos al adicionar fluidos ascíticos o sueros de ratones portadores de tumores ascíticos a células linfoides de ratones normales.....	313

APARTADO I. Búsqueda de la dosis óptima de cada mitógeno en cada cepa.

Para ello, a los datos iniciales, expresados en cuentas por minuto (cpm) e indicados en las tablas I, II, III y IV, se les calculó la media y la desviación típica en cada casilla, por los métodos usuales.

Los resultados de dichos cálculos están reflejados en las tablas V,a., VI,a., VII,a., y VIII,a., donde puede observarse la gran variabilidad existente entre las varianzas de cada casilla; habiéndose intentado su estabilización por los métodos usuales (método de la raíz cuadrada, método del logaritmo...) sin conseguirlo. Por ello se manifestó como imposible el utilizar los métodos del análisis de la varianza para el estudio de las tablas indicadas. De acuerdo con ello, el estudio citado, lo realizaremos por el método de comparación de medias (ver "métodos estadísticos"). A tales efectos, se ha buscado en cada una de las tablas Va, VIa, VIIa y VIIIa, la dosis de mitógeno que produce una máxima transformación blástica (considerando como máxima transformación el máximo número de

	CBA	B10A	BALB/c
Sin ConA	5932	1630	1984
	4116	2176	3166
	3507	2321	3012
	4238	1981	2780
	5230	1973	3077
1/4	258	100	58
	156	126	134
	177	84	80
	200	97	77
	215	103	98
1/8	700	1810	5324
	1200	2656	2952
	1153	2190	3548
	1190	2321	4213
	875	2173	4520
1/16	41946	34253	15352
	45399	36791	16198
	32375	30507	14727
	31340	32523	15720
	35425	31471	16073
1/32	67241	42500	12912
	78151	27662	9080
	53427	33242	8560
	63250	37411	8933
	65420	38107	10250
1/64	58325	28264	9368
	54270	28872	5774
	55323	28776	10004
	59451	28347	6733
	55873	28431	8788
1/128	73151	15468	7252
	47950	19816	10362
	45323	18324	8437
	46570	16411	9020
	44323	17213	6371
1/256	39508	12012	6206
	40323	9542	6664
	37431	10412	6321
	38731	9870	6720
	37007	10200	5971

TABLA, I.- cpm obtenidas, al estimular distintas cepas murinas, (CBA, B10A, Balb/c), con el mitógeno Concanavalina-A a distintas dosis (indicadas como diluciones, 1/4, 1/16...)

	CBA	B10A	BALB/c
Sin Con A	4604.60 ± 965.79	2016.20 ± 260.14	2803.80 ± 480.06
1/4	201.20 ± 38.88	102.00 ± 15.25	89.40 ± 28.68
1/8	1023.00 ± 224.92	2230.00 ± 304.55	4111.40 ± 909.57
1/16	37297.00 ± 6133.35	33109.00 ± 2483.08*	15614.00 ± 595.48*
1/32	65497.80 ± 8858.68*	35784.40 ± 5603.05*	9947.00 ± 1773.89
1/64	56648.40 ± 2161.03*	28418.00 ± 211.19	8133.40 ± 1801.37
1/128	51463.40 ± 12199.70	17446.40 ± 1690.10	8288.40 ± 1549.81
1/256	38600.00 ± 1388.76	10407.20 ± 955.97	6376.40 ± 315.13

TABLA, V, a.- De medias y desviaciones referida a la Tabla I. Mitógeno, ConA. Cepas murinas, CBA, B10A y BALB/c.

CEPA	Dosis comparadas	t _{exp}	Significación
CBA	(1/16) con (1/32)	5.85	p < 0.001
	(1/32) con (1/64)	2.17	no significativo
B10A	(1/16) con (1/32)	0.98	no significativo
	(1/32) con (1/64)	2.94	p < 0.005
BALB/C	(1/8) con (1/16)	23.65	p < 0.001
	(1/16) con (1/32)	20.42	p < 0.001

TABLA, V, b.- De comparación de las dosis que originan máxima transformación blástica, con las dosis de máxima respuesta a su izquierda y derecha respectivamente.

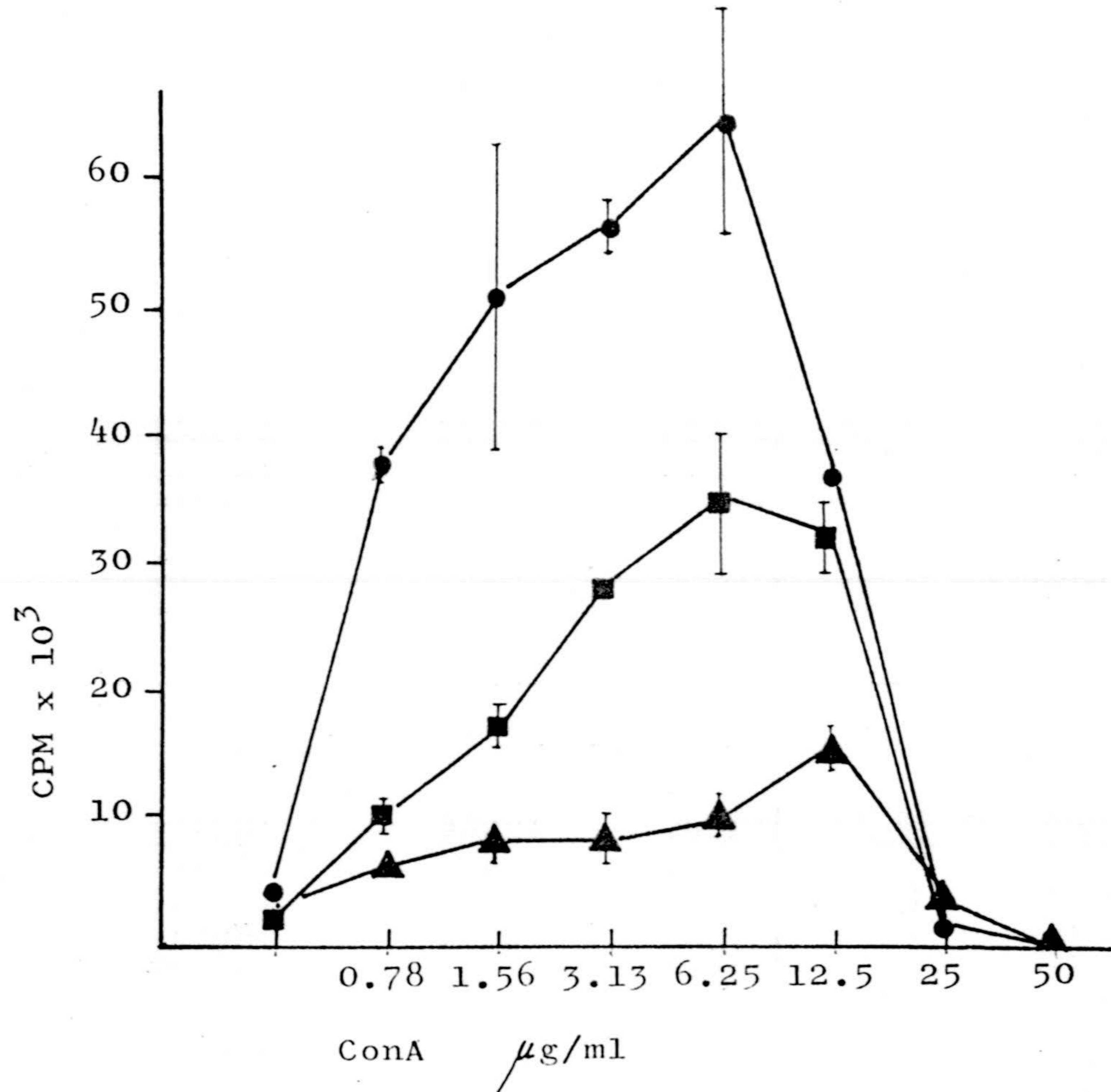


Fig. V.a. Incorporación de $T^{14}C$ por esplenocitos de ratones CBA ($H-2^k$), BALB/C ($H-2^d$) y B10A ($H-2^a$), en respuesta a dosis crecientes de Concanavalina-A. (●—●) CBA; (■—■) B10A; (▲—▲) BALB/C.

	CBA	B10A	BALB/c
Sin PWM	4548	3084	4320
	4754	3158	4216
	4835	5330	4570
	4621	4210	3913
	4320	4520	4411
1/1	14722	4984	4372
	11140	3590	6624
	10280	6324	5552
	10930	5311	5423
	11580	5527	5138
1/2	15370	10760	12216
	18830	12970	12068
	13748	11320	12930
	17720	9321	13010
	16931	10213	12420
1/4	24878	16404	19423
	23885	14530	15750
	22711	14821	14910
	23450	15350	14730
	25012	15510	18027
1/8	22787	12546	18317
	23111	13432	17416
	24213	12615	17211
	24986	12318	18671
	25013	13141	16202
1/16	32095	7118	26091
	28364	12208	27004
	30213	14438	25731
	29811	14121	26219
	31007	13723	27311
1/32	4706	1706	14882
	3150	2456	12662
	5876	1948	13420
	4510	2113	14711
	3711	1872	13717
1/64	2136	2413	7730
	2720	2321	6820
	2115	1784	6917
	2213	2518	7137
	3211	1908	7318

TABLA, II.- cpm obtenidas, al estimular distintas cepas murinas, (CBA, B10A, Balb/c), con el mitógeno Pokewed, a distintas dosis (indicadas como diluciones (1/1, 1/2, ...)).

	CBA	B10A	BALB/c
Sin PWM	4615,60 ± 199.54	4060.40 ± 950.42	4286 ± 245.70
1/1	11730.40 ± 1736.75	5147.20 ± 1000.93	5421.80 ± 813.15
1/2	16519.80 ± 1996.97	10916.80 ± 1364.25	12528.80 ± 422.65
1/4	23987.20 ± 971.01	15323.00 ± 722.00*	16568.00 ± 2066.16
1/8	24022.00 ± 1037.18	12810.50 ± 459.95	17563.40 ± 973.91
1/16	30298.00 ± 1388.94*	12321.60 ± 3031.97	26471.20 ± 660.53*
1/32	4390.60 ± 1039.36	2019.00 ± 284.79	13878.40 ± 924.15
1/64	2479.00 ± 478.23	2188.60 ± 323.90	7184.40 ± 361.27

TABLA, VI, a.- De medias y desviaciones referida a la Tabla II. Mitógeno PWM. Cepas murinas: CBA, B10A y Balb/c,

CEPA	Dosis comparadas	t _{exp}	Significación
CBA	(1/8) con (1/16)*	8.09	p < 0.001
	(1/16)* con (1/32)	29.9	p < 0.001
B10A	(1/2) con (1/4)*	6.38	p < 0.001
	(1/4)* con (1/8)	6.56	p < 0.001
BALB/c	(1/8) con (1/16)*	16.93	p < 0.001
	(1/16)* con (1/32)	24.79	p < 0.001

TABLA, VI, b.- De comparación de las dosis que originan máxima transformación blástica, con las dosis de máxima respuesta a su izquierda y derecha respectivamente.

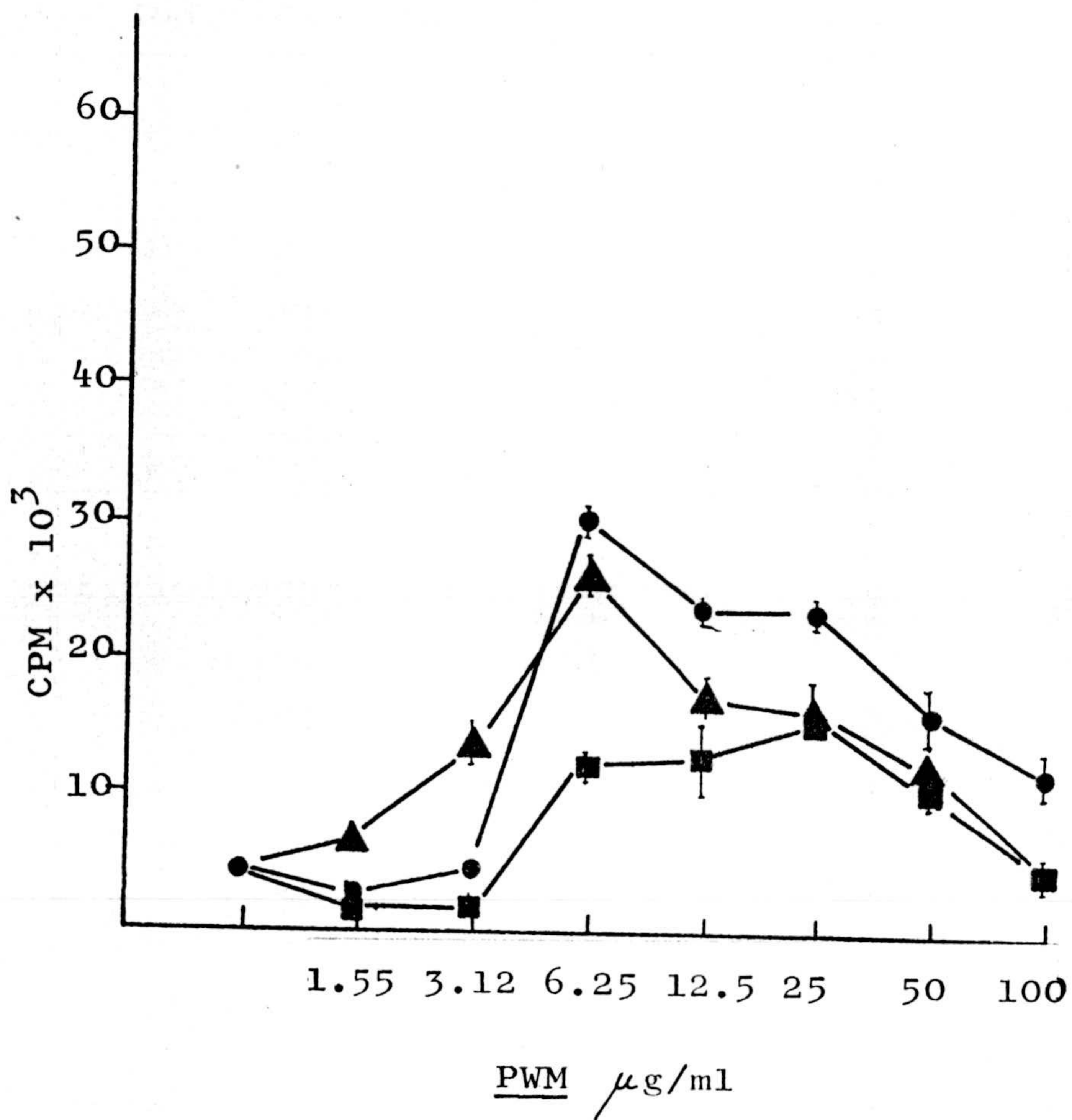


Fig.VI.a. Incorporación de $T^{14}C$ por esplenocitos de ratones CBA ($H-2^k$), B10A($H-2^a$) y BALB/C($H-2^d$), en respuesta a dosis crecientes de PWM. (●—●)CBA; (■—■) B10A; (▲—▲)BALB/C.

	CBA	B10A	BALB/c
Sin LPS	3116	2562	3538
	4620	2504	3764
	3527	2764	3752
	3713	2593	3618
	3611	2811	3912
1/1	4360	1572	3512
	4252	2508	2644
	4627	1882	3498
	4188	2211	2913
	4711	2179	2818
1/4	13406	9848	2624
	16908	7913	2296
	14540	6542	2500
	15119	6871	2417
	14879	7113	2780
1/16	24268	14010	2876
	21173	17094	3308
	22379	15193	2768
	24188	14615	2637
	22680	15552	2915
1/32	19142	28571	4262
	18044	33822	3176
	17793	29123	2530
	16514	30215	3718
	17813	31873	3536
1/64	11490	26199	4734
	11368	17445	3808
	12696	23189	3876
	12189	27113	3915
	11543	25418	3717
1/128	4740	4964	1918
	5486	5270	2456
	4913	7612	2634
	5580	6318	2183
	5619	5711	2719
1/256	6222	3746	3136
	5932	6140	3179
	4907	6674	3615
	5211	4783	3763
	6113	4513	3539

TABLA III.- cpm obtenidas, al estimular distintas cepas murinas, (CBA, B10A, Balb/c), con el mitógeno LPS, a distintas dosis (indicadas como diluciones 1/1, 1/4...).

	CBA	B10A	BALB/C
Sin LPS	3714.40± 553.16	2646.80± 133.40	3716.80 ± 144.31
1/1	4427.60± 230.70	2070.40± 356.00	3077.00 ± 402.47
1/4	14970.40±1266.62	7657.40±1325.04	2523.60 ± 187.12
1/16	22937.60±1306.30*	15292.80±1164.74	2900.80 ± 251.92
1/32	17861.20±934.85	30720.80±2143.33*	3444.40 ± 644.18
1/64	11857.20± 567.13	23872.80±3875.63	4010.00 ± 411.65*
1/128	5267.60± 410.15	5975.00±1047.17	2382.00 ± 330.70
1/256	5679.00± 580.28	5171.20±1205.42	3446.40 ± 276.17

TABLA, VII, a.- De medias y desviaciones referida a la tabla III. Mitógeno LPS. Cepas murinas CBA, B10A y BALB/c.

CEPA	Dosis comparadas	t _{exp}	Significación
CBA	(1/4) con (1/16)*	9.75	p < 0.001
	(1/16)* con (1/32)	7.07	p < 0.001
B10A	(1/16) con (1/32)*	14.14	p < 0.001
	(1/32)* con (1/64)	3.46	p < 0.01
BALB/c	(1/32) con (1/64)*	1.65	No significativo
	(1/64)* con (1/128)	6.89	p < 0.001

TABLA, VII, b.- De comparación de las dosis que originan la máxima transformación blástica, con las dosis de máxima respuesta a su izquierda y derecha respectivamente.

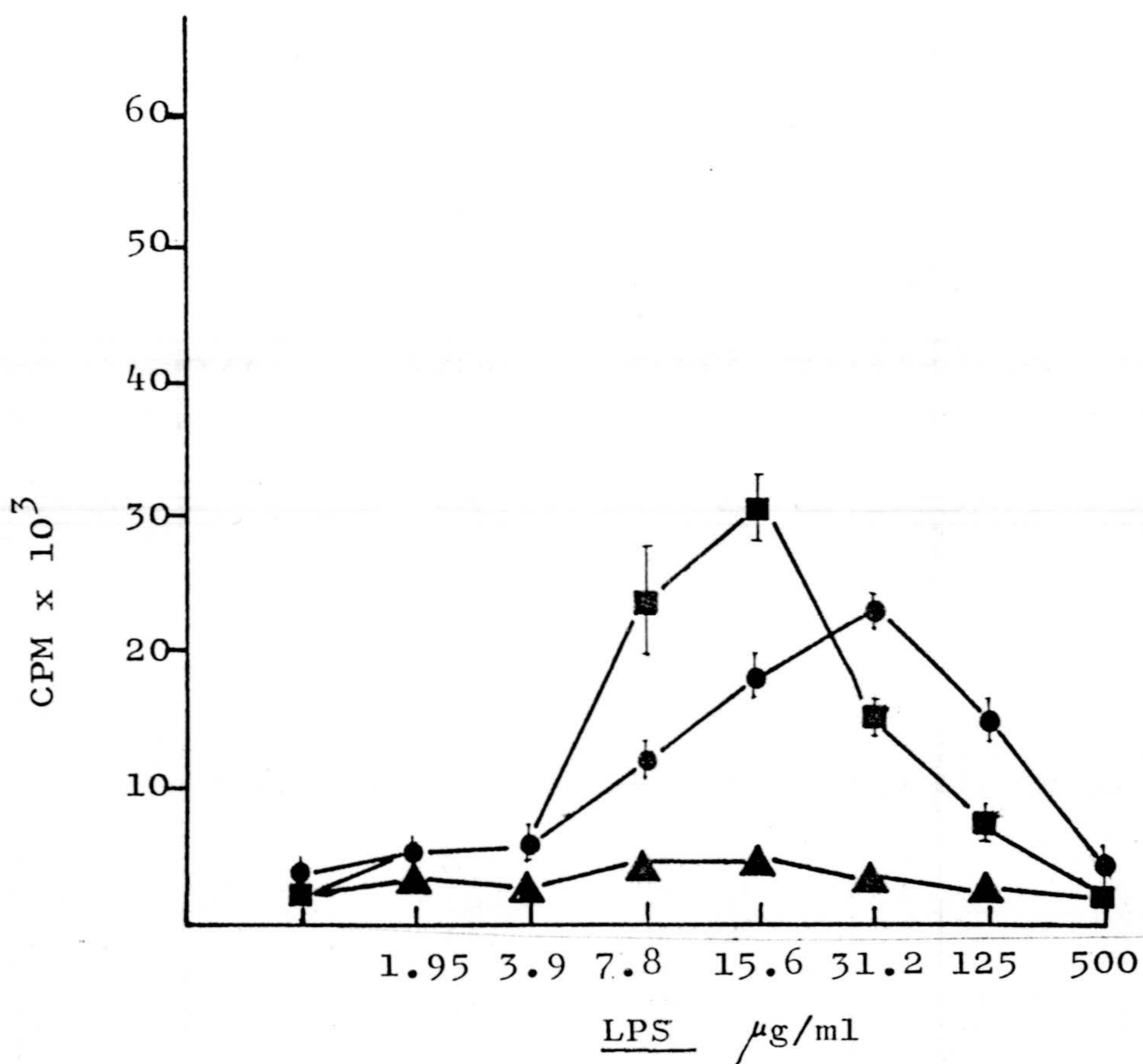


Fig. VII.a. Incorporación de $T^{14}C$ por esplenocitos de ratones CBA ($H-2^k$), B10A($H-2^a$) y BALB/C ($H-2^d$), en respuesta a dosis crecientes de LPS. (●—●)CBA; (■—■)B10A; (▲—▲)BALB/C.

	CBA	B10D2	B10	B10A
Sin PHA	3547	4152	2173	2361
	3853	2542	2792	2463
	3177	3494	2818	1742
	4115	4192	2546	2842
			2311	2313
1/1	2910	9608	1817	2118
	2451	13888	1511	1417
	2179	14710	1305	1787
	2615	12327	1518	1500
	2310	11520	1752	1411
1/2	10211	64466	4637	3483
	11179	35884	4739	3637
	9653	65478	4819	3956
	9548	38450	3986	3876
	10112	43553	4211	3427
1/4	13425	15669	7017	5100
	11782	19823	7476	5483
	10520	17527	7860	4716
	12633	23256	7480	4877
	14113	21323	7497	5087
1/8	15184	52339	13050	7186
	12436	52322	10722	5254
	13498	62155	13620	5842
	18072	66382	11273	5386
	17528	49790	12117	6313
1/16	7432	8457	6201	3889
	7615	8812	6020	3645
	6927	8222	6034	3684
	7107	12988	5654	3216
	6633	14574	6472	3534
1/32	3971	2990	2214	2820
	4310	5088	2636	2506
	4521	5336	2110	1473
	3677	2980	2910	2767
	3816	4060	2684	2378

TABLA IV.- cpm obtenidas, al estimular distintas cepas murinas, (CBA, B10D2, B10, B10A), con el mitógeno PHA, a distintas dosis (indicadas como diluciones, 1/1, 1/2...).

	CBA	B10D2	B10	B10A
Sin PHA	3698.00± 421.57	3056.00± 1378.05	2528.00± 286.02	2344.20± 395.54
1/1	2493.00± 284.00	12410.60± 2007.78	1580.60± 206.14	1646.60± 304.81
1/2	10140.60± 646.72	49566.20± 14336.32 *	4478.40± 361.61	3675.80± 234.08
1/4	12494.60± 1406.31	19519.60± 3004.27	7466.00± 299.20	5052.60± 288.45
1/8	15343.60± 2454.67 *	56597.60± 7234.97 *	12156.40± 1202.09 *	5996.20± 784.69 *
1/16	7142.80± 391.90	10605.20± 2946.42	6076.20± 298.09	3593.60± 247.09
1/32	4059.00± 349.70	4090.80± 1117.09	2510.80± 336.81	2388.80± 543.49

TABLA, VIII, a.- De medias y Desviaciones referida a la tabla IV. Mitógeno PHA. Cepas murinas, CBA, B10D2, B10 y B10A.

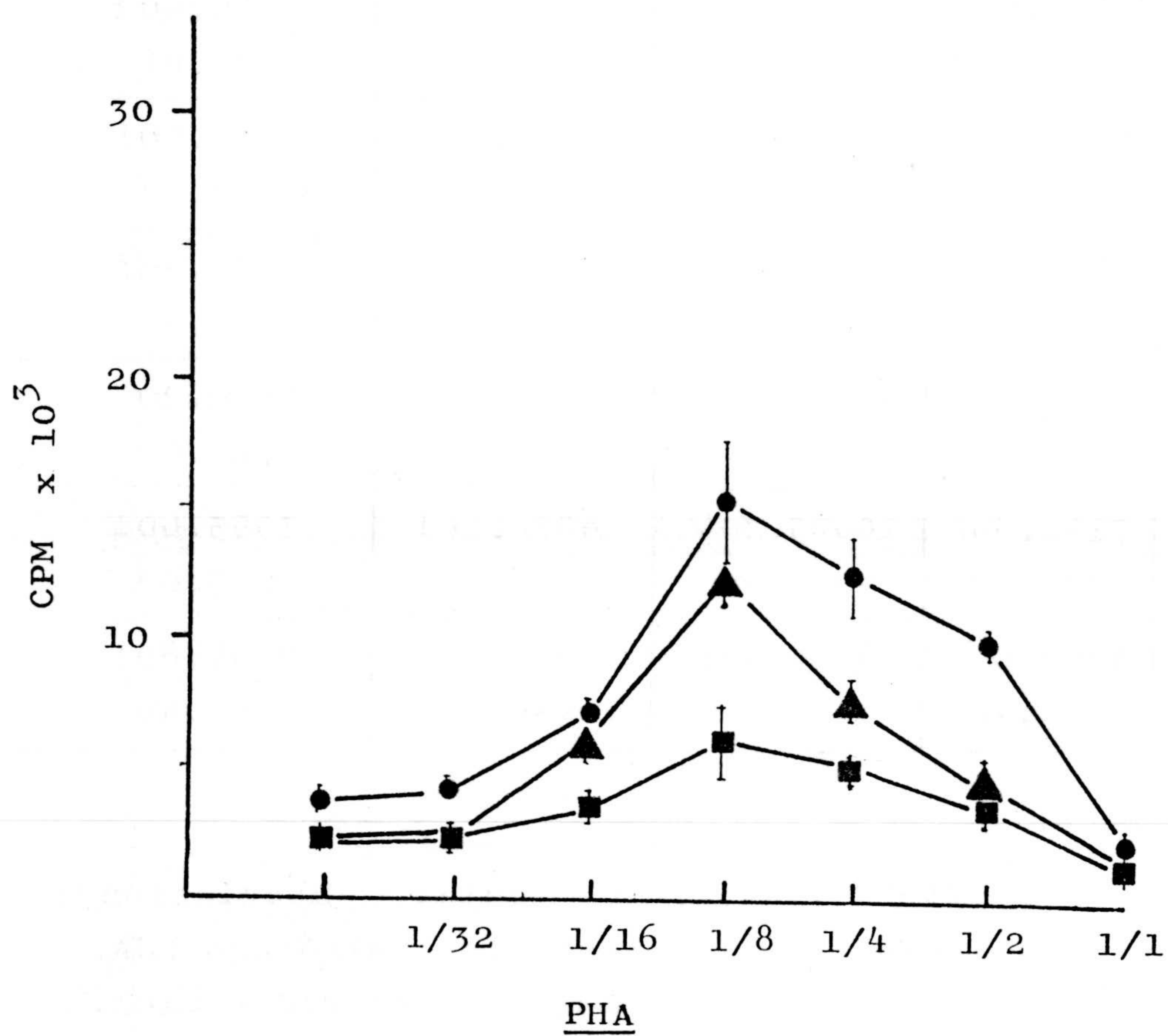


Fig. VIII.a. Incorporación de $T^{14}C$ por esplenocitos de ratones CBA ($H-2^k$), B10A($H-2^a$) y B10 ($H-2^b$), en respuesta a dosis crecientes de PHA. (●—●)CBA; (■—■)B10A; (■—■) B10.

CEPA	Dosis comparadas	t_{exp}	Significación
CBA	$(1/4)$ con $(1/8)^*$	2.25	$p \approx 0.05$
	$(1/8)^*$ con $(1/16)$	7.38	$p < 0.01$
B10D2	$(1/2)$ con $(1/8)^*$	0.98	No significativo
	$(1/8)^*$ con $(1/16)$	13.16	$p < 0.001$
B10	$(1/4)$ con $(1/8)^*$	8.47	$p < 0.001$
	$(1/8)^*$ con $(1/16)$	10.98	$p < 0.001$
B10A	$(1/4)$ con $(1/8)^*$	2.52	$p \approx 0.05$
	$(1/8)^*$ con $(1/16)$	6.53	$p < 0.01$

TABLA VIII, b.- De comparación de las dosis que originan la máxima transformación blástica, con las dosis de máxima respuesta a su izquierda y derecha respectivamente.

cpm). Para comprobar si dichas dosis inducen la máxima respuesta significativa, las hemos comparado con las dosis inferior y superior, que dan máxima respuesta respectivamente. Estas comparaciones se reflejan en las tablas V,b., VI,b.,VII,b., y VIII,b, en las que se indican, la cepa estudiada, la comparación implicada, la t experimental obtenida y la significación que se produce (considerando como no significativas las significaciones superiores al 5%). Las dosis óptimas, elegidas por el criterio anterior, vienen indicadas por un asterisco en las tablas aludidas y resumidas a continuación:

MITOGENO	CEPA	DOSIS OPTIMA
ConA	CBA	1/32 y 1/64
	B10A	1/16 y 1/32
	BALB/c	1/16
PWM	CBA	1/16
	B10A	1/4
	BALB/c	1/16
LPS	CBA	1/16
	B10A	1/32
	BALB/c	1/64
PHA	CBA	1/8
	B10A	1/8
	B10	1/8
	B10D2	1/2 y 1/8

APARTADO II. Combinaciones ideales Cepas murinas-Mitógenos.

En este apartado, se pretende, por una parte, encontrar la cepa de ratón que de una máxima respuesta proliferativa con la dosis óptima de cada uno de los mitógenos empleados y por otra, seleccionar el mitógeno mas adecuado para cada cepa. Realizándose la elección de la cepa óptima, entre varias de distinto haplotipo, CBA(H-2^k), B10A(H-2^a) y BALB/C(H-2^d) para los mitógenos ConA, PWM y LPS; mientras que para el mitógeno PHA, la cepa óptima se ha seleccionado entre las siguientes: CBA (H-2^k), B10A(H-2^a), y B10(H-2^b), de acuerdo con las disponibilidades de nuestro laboratorio.

La selección se realizaría tomando como base los resultados contenidos en las tablas, I, II, III y IV, empleando como criterio el máximo porciento de incremento respecto a los controles. A tales efectos se daría una tabla, con las mismas entradas que la Tabla IX, en cuyo interior colocaríamos los valores obtenidos de la siguiente fórmula:

$$y = \frac{x_i - \bar{x}_0}{\bar{x}_0} \cdot 100$$

en donde:

x_i = valores individuales en cpm a la dosis óptima.

\bar{x}_0 = media en cpm de los controles respectivos.

A continuación, se calcularían las medias y desviaciones de cada una de las casillas de la supuesta tabla. Sin embargo, puesto que las tablas Va, VIa, VIIa y VIIIa nos dan los valores medios y desviaciones de las variables individuales consideradas en la fórmula anterior (\bar{x} , \bar{x}_0 , $D(x)$, $D(x_0)$), podemos construir directamente la tabla IX objeto de este estudio utilizando las fórmulas siguientes:

$$\bar{y} = \frac{\bar{x} - \bar{x}_0}{\bar{x}_0} \cdot 100$$

$$D(y) = \frac{D(x)}{\bar{x}_0} \cdot 100$$

en donde la letra D delante de una variable, alude a la desviación típica de la muestra de dicha variable.

En la Tabla X,a, se relacionan los resultados de las comparaciones oportunas entre parejas de medias, referidas a cada cepa, indicando en la última columna de dicha tabla, el orden de preferencia para la elección de mitóge

CEPAS DE RATON

MITOGENO	CEPAS DE RATON		
	CBA	B10A	BALB/C
ConA	1322.40±192.39	1309.50 ± 10.47	456.89±21.24
PWM	556.43± 30.09	277.38 ± 17.78	517.62±15.41
LPS	517.03± 35.14	1060.68 ± 80.98	7.89±11.08
PHA	314.92± 66.38	155.79 ± 33.47	380.87±47.55
			B10

TABLA IX.- Porcentaje de estimulación inducido en esple_nocitos de distintas cepas murinas, por los mitógenos ConA, PWM, LPS y PHA, utilizados a dosis óptimas.

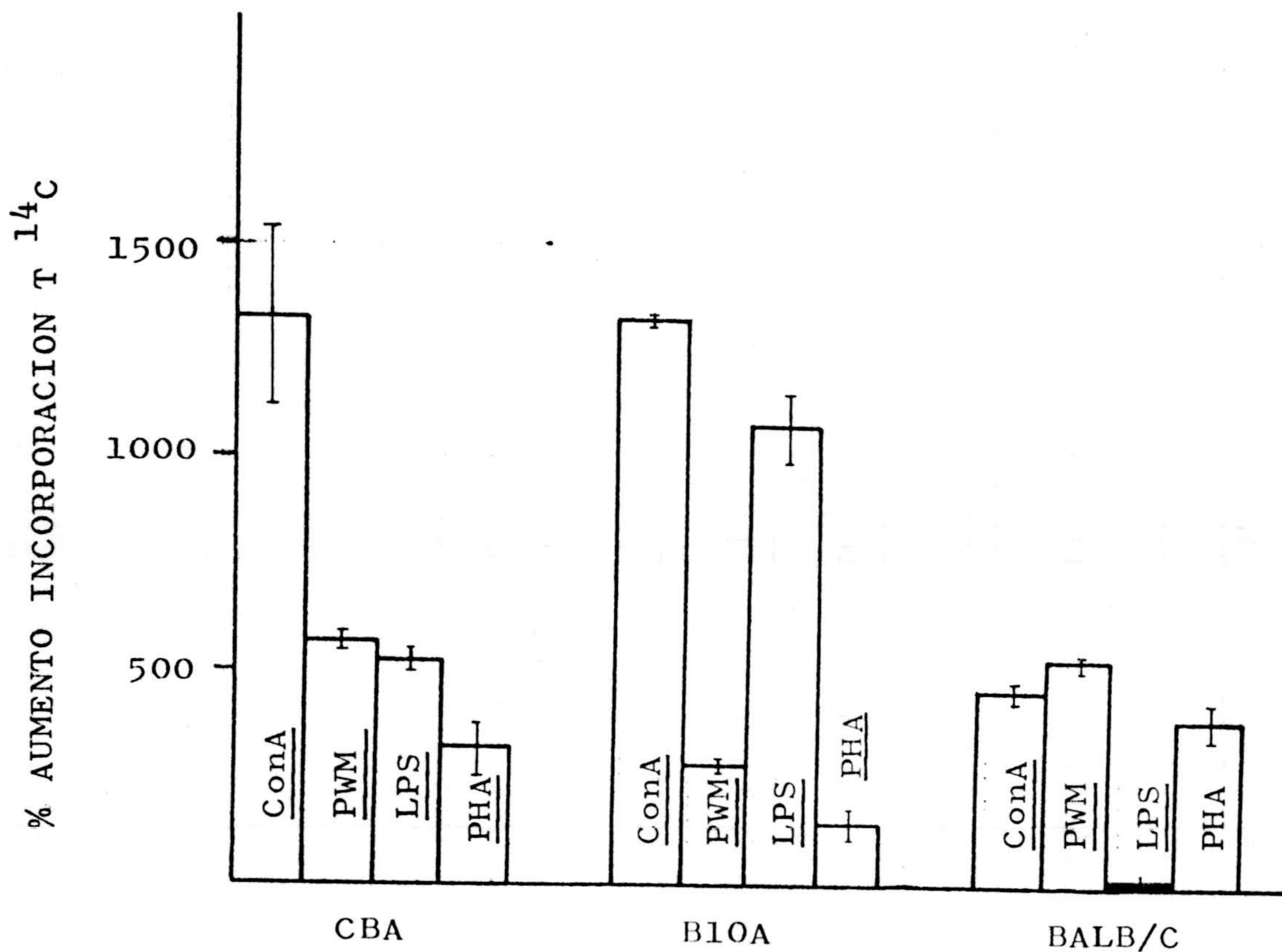


Fig. IX. Porcentajes de estimulación obtenidos en esple nocitos de distintas cepas murinas, en presencia de distintos mitógenos utilizados a las dosis óptimas.

CEPA	MITOGENOS		t_{exp}	SIGNIFICACION	ORDEN DE PREFERENCIA
	COMPARADOS	COMPARACION			
CBA	ConA PWM	ConA-PWM	8.79	$p < 0.001$	ConA PWM LPS
	LPS	PWM -LPS	1.90	$p < 0.1$	
B10A	ConA PWM	ConA-LPS	6.81	$p < 0.01$	ConA LPS PWM PHA
	LPS	LPS-PWM	21.12	$p < 0.001$	
	PHA	PWM-PHA	7.17	$p < 0.001$	
BALB/C	ConA PWM	PWM-ConA	5.17	$p < 0.001$	PWM ConA LPS
	LPS	ConA-LPS	41.90	$p < 0.001$	

TABLA X,a.- Elección del mejor mitógeno para las cepas consideradas.



MITOGENO	CEPAS		t_{exp}	SIGNIFICACION	ORDEN DE PREFERENCIA
	COMPARADAS	COMPARACION			
ConA	CBA	CBA-B10A	0.14	No significat	CBA-B10A BALB/C
	B10A BALB/C	CBA-BALB/C	9.99	$p < 0.001$	
PWM	CBA	CBA-BALB/C	2.56	$p < 0.05$	CBA BALB/C B10A
	B10A BALB/C	BALB/C-B10A	22.83	$p < 0.001$	
LPS	CBA	B10A-CBA	13.77	$p < 0.001$	B10A CBA BALB/C
	B10A BALB/C	CBA-BALB/C	30.89	$p < 0.001$	
PHA	CBA	CBA-B10	1.80	NO signif.	B10-CBA B10A
	B10A B10	CBA-B10A	4.78	$p < 0.01$	

TABLA X,b.- Elección de la mejor cepa para cada mitógeno, entre las cepas y mitógenos considerados.

mitógeno.

En la Tabla Xb, se repite lo anterior, y en la última columna, se indica el orden de preferencia para la elección de cepa para un determinado mitógeno (el ordenamiento se entiende de arriba abajo).

En todos los casos, la decisión sobre si dos mitógenos (o dos cepas) son distintos se ha realizado para un error igual o inferior al 10%.

El estudio global de los resultados indicados en las Tablas IX y X (a y b), pone de manifiesto:

1.- La mejor combinación cepa mitógeno resulta ser ConA-CBA ó ConA-B10A indistintamente.

2.- La segunda mejor combinación la da la pareja LPS-B10A.

3.- La peor combinación que puede elegirse es la pareja LPS-BALB/c.

4.- La cepa que globalmente responde mejor a todos los mitógenos, es la cepa CBA.

APARTADO III. Análisis del efecto dosis respuesta de los fluidos ascíticos, sobre esplenocitos de ratón estimulados con PHA. Influencia del haplotipo.

Para este estudio, se han utilizado dos fluidos ascíticos originados por la inoculación de los tumores EOK1 (H-2^b) y GIL IV (H-2^b). Las células diana del primero de ellos, son esplenocitos normales de las cepas B10(H-2^b) B10A(H-2^a), B10D2(H-2^d) y B10HTT(H-2^{t3}). Para el segundo de ellos, las células diana se han obtenido de las cepas B10(H-2^b), B10D2(H-2^d) y C57BL/6(H-2^b).

De acuerdo con los resultados obtenidos, y para el análisis de la influencia del haplotipo, se han confeccionado las tablas XI,a y XII,a; de acuerdo con el siguiente criterio:

a) Designamos por \bar{x}_1 , la media de las cpm obtenida para cada cepa estimulada con PHA.

b) Designamos por \bar{x}_0 , la media de las cpm obtenida para cada cepa sin estimulación mitogénica.

c) Designamos por x cada uno de los valores en cpm obtenidos para cada dosis de FA y para cada cepa.

d) En base a las definiciones anteriores, $(\bar{x}_1 - \bar{x}_0)$ y $(x - x_0)$, representan las cpm netas obtenidas por deducción de las cpm basales (sin Fluido ascítico ni PHA) a las cpm totales (\bar{x}_1 y x).

e) La diferencia $(\bar{x}_1 - \bar{x}_0) - (x - x_0) = (\bar{x}_1 - x)$, representa el incremento en cpm producido por la adición del Fluido ascítico. Finalmente

f) El cociente
$$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0} \cdot 100$$
, que son los valores

indicados en las tablas XI, a y XII, a, es el porcentaje de inhibición inducido por el fluido ascítico, (los valores negativos de este cociente, indican la existencia de estimulación).

Las Tablas XI, b y XII, b, en su parte superior, presentan la media (\bar{x}) y desviación estandar (S) de los valores de inhibición de cada una de las casillas de las Tablas XI, a y XII, a.

La construcción de estas tablas, tiene por objeto estudiar, comparando, las inhibiciones medias en las distintas cepas para cada una de las dosis de Fluido ascítico utilizadas. Este estudio podría hacerse mediante un

análisis de la varianza doble vía, pero la comparación de las varianzas de cada una de las casillas de las tablas XI,b y XII,b dan una χ^2_{exp} de 67.82 y 136.46 respectivamente, de lo que se deduce que son distintas en cada caso. Por esto y de acuerdo con las razones aducidas en el apartado I, en cada tabla compararemos las medias de todas las cepas para dosis fijas de Fluido Ascítico, de acuerdo con los criterios indicados en Métodos Estadísticos.

III.a.- Estudio de la Tabla XI,b.

Para cada dosis de F.A. (fluido ascítico), han de compararse cuatro muestras, cada una de ellas formada por cinco elementos, por lo que tomando el criterio de la C_{exp} para comprobar sus varianzas, ellas serán distintas si la C_{exp} es superior a 13.9 (significación del 10%); en la quinta fila de esta Tabla, se expresan los valores de dicha C_{exp} para cada dosis, dando su sexta fila, la decisión de si las varianzas son iguales o distintas. En el caso de que sean iguales, podrá calcularse la estimación común S_D^2 de la varianza; sus raíces cuadradas se indican

cuando ha lugar, en la séptima fila. Cuando las varianzas sean distintas, la comparación de medias se realiza por el método clásico ya descrito. Cuando las varianzas son iguales la comparación se hace de modo semejante, pero sustituyendo S^2 , por la estimación común S_D^2 ; en este último caso, las comparaciones pueden simplificarse teniendo en cuenta que los tamaños muestrales son siempre cinco, que la varianza estimada es siempre la S_D^2 citada antes (para cada columna) y que la t_α , siempre tiene ocho grados de libertad; por lo que fijando como significación el 5%, ella valdrá siempre 2,306. De todo lo anterior se deduce que el denominador de la t_{exp} , será en cada caso:

$$2,306 \cdot S_D \cdot \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{5}} = 1,4584 \cdot S_D$$

Por lo cual dos medias serán distintas cuando el valor absoluto de su diferencia, sea superior a la cantidad antes citada.

Por comodidad, las cepas B10, B10A, B10D2 y B10HTT, se han designado por las letras A, B, C, y D, respectivamente.

En esta tabla XI,b, filas nueve a catorce (ambas inclusive), se indican las comparaciones de medias que se efectúan, poniendo en el interior de dichas filas los signos $<$, $=$, $\hat{=}$ $>$, según que la media de la cepa a que alude la primera letra sea menor igual o mayor significativamente (al 5%) que la media que alude la segunda letra.

En la fila nº 15 de esta tabla, se resume para cada dosis, los resultados obtenidos, ordenando las cepas de peor (que experimentan menor inhibición) a mejor (que experimentan mayor inhibición).

Como estudio global, podemos afirmar que la cepa B10A es la peor de todas, seguida por la cepa B10. Las cepas B10D2 y B10HTT son las mejores, si bien la B10HTT, es preferible a dosis bajas de Fluido ascítico.

Por último, la dosis óptima de Fluido ascítico productora de inhibición, es la indicada como 1/1.

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	\bar{x}_1	\bar{x}_0	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$
B10	81.93	88.20	82.78	56.44	50.23	20.57	12156.4	682.8	11473.6
	88.94	84.98	82.07	68.32	38.42	8.06			
	87.37	91.06	83.93	64.85	47.37	14.61			
	80.64	83.93	82.43	66.55	43.06	9.07			
	92.51	86.87	82.30	56.99	37.01	11.15			
B10A	85.13	80.44	48.49	49.50	27.62	42.89	5996.2	1607.6	4388.6
	96.43	75.97	63.67	36.46	18.19	3.79			
	110.61	65.86	78.93	26.48	16.87	4.79			
	109.69	79.48	79.73	27.78	42.20	3.01			
	76.57	81.84	65.33	24.27	23.36	6.22			
B10D2	102.42	95.97	89.94	68.30	56.20	16.76	19459.2	1243.8	18215.4
	98.44	83.97	86.02	67.16	56.77	37.94			
	101.38	97.13	92.32	63.32	65.30	27.70			
	100.08	93.63	91.24	72.71	58.71	22.23			
	101.41	92.32	90.81	66.52	64.35	17.76			
B10HTT	97.44	96.96	89.84	70.63	97.28	71.98	15343.6	1495.6	13848
	85.94	88.18	97.56	84.80	100.47	69.91			
	95.95	94.16	93.74	86.00	96.82	55.51			
	99.04	93.00	87.73	58.73	91.00	60.73			
	91.84	92.55	90.70	78.14	85.36	67.61			

TABLA XI,a.- Porcentajes de inhibición inducida por fluido ascítico, obtenido de ratones B10 inoculados con el tumor EOK1, sobre esplenocitos de distintas cepas murinas estimulados con el mitógeno PHA. (En la parte superior de la tabla, se indican las distintas diluciones de FA utilizadas; la dosis de PHA utilizada es la óptima).

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
B10	86.28 4.9449	87.01 2.8038	82.70 0.7329	62.63 5.5406	43.22 5.6566	12.69 5.0668
B10A	95.69 14.9686	76.74 6.4653	67.23 12.8511	32.80 10.37	25.65 10.20	12.14 17.2315
B10D2	100.75 1.5334	92.60 5.1839	90.07 2.4185	67.60 3.4014	60.27 4.2777	24.48 8.6798
B10HTT	94.04 5.259	92.97 3.1803	91.91 3.8240	75.66 11.2753	94.19 6.0010	65.15 6.8524
C _{exp}	95.3	5.32	307.5	10.99	5.69	11.57
Varianzas.	≠	=	≠	=	=	=
S _D ²		4.6543		8.3207	6.8983	10.5462
Comparaciones.	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
A-B	=	>	=	>	>	=
A-C	<	=	<	=	<	=
A-D	<	=	<	=	<	<
B-C	=	<	<	<	<	=
B-D	=	<	<	<	<	<
C-D	>	=	=	=	<	<
Conclusiones parciales.	A B=D C	B A=C≠D	A=B C=D	B A=C=D	B A C D	A=B=C D

TABLA, XI, b.- De medias, desviaciones y comparaciones entre cepas, referida a la Tabla XI, a. (B=B10A; A=B10; C=B10D2; D=B10HTT; Parte superior, diluciones de FA de EQk1;). Las casillas de esta tabla en las que vienen indicadas dos cifras, corresponden a la media (\bar{x}) y a la desviación típica (S), siendo esta última la colocada en posición inferior.

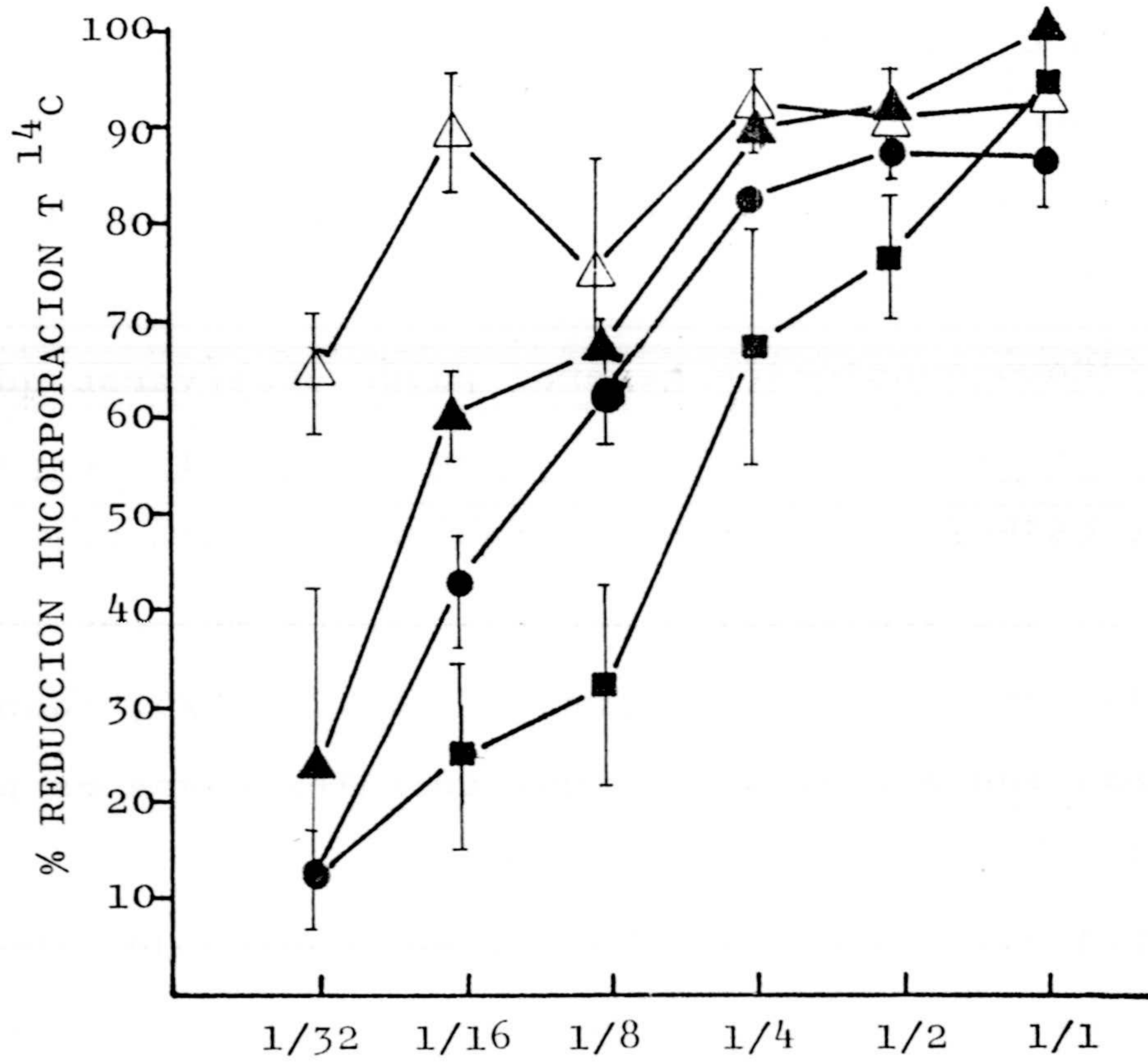


Fig. XI.b. Porcentajes de reducción en la incorporación de $T^{14}C$ por esplenocitos estimulados con PHA y tratados con Fluido Ascítico de EQK1 a distintas diluciones.

(●—●)B10; (■—■)B10A; (▲—▲)B10D2; y (△—△)B10HTT.

III.b.- Estudio de la Tabla XII,b.

Los comentarios del apartado III,a, son aplicables a este, con las siguientes variantes:

i) La C_{exp} , debe ser comparada con el valor 10,4 (puesto que ahora solo hay tres cepas).

ii) Ahora se designan por A, B y C las cepas B10, B10D2 y C57BL/6 respectivamente.

iii) Como conclusión general puede observarse que la cepa B10 es la peor de todas, mientras que las cepas B10D2 y C57BL/6, indistintamente son las mejores. Con todo, hay una tendencia a dar resultados mejores por parte de la cepa B10D2 con respecto a la C57BL/6, cuando las dosis son altas, por lo que en tales casos es preferible la cepa B10D2.

1) Del estudio de esta Tabla, se deducen dos observaciones mas, por una parte que para dosis bajas de F.A. hay descensos muy acentuados en la inhibición observada, existiendo también inhibiciones superiores a lo que se habían estimulado; y por otra que la inhibición máxima se alcanza para la dosis de F.A. designada por 1/1.

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	\bar{x}_1	\bar{x}_0	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$
B10	110.76	108.27	98.46	89.72	64.12	4.19	2664	753.6	1910.4
	112.12	105.42	92.96	83.23	60.03	34.13			
	110.45	116.21	101.44	74.54	55.01	-27.11			
	112.33	115.73	103.75	67.73	56.69	-55.59			
	109.45	107.10	102.12	87.26	61.30	-10.32			
B10D2	137.65	110.44	118.24	105.36	95.88	-61.25	1599.2	651	948.2
	131.74	112.97	92.09	109.36	116.77	-20.75			
	130.27	108.96	118.96	95.46	84.27	-21.18			
	126.68	121.41	104.53	104.11	85.55	- 1.88			
	121.20	116.98	110.23	99.79	86.50				
C57BL/6	111.49	107.58	108.98	108.06	89.22	- 6.70	6120	1110	5010
	110.81	109.22	105.30	104.03	98.12	5.58			
	117.44	108.06	108.24	104.61	95.00	7.92			
	109.58	106.72	104.73	102.73	96.12	- 1.21			
	113.13	108.44	107.88	104.37	92.85	4.05			

TABLA XII,a.- Porcentajes de inhibición inducidos por fluido ascítico, obtenido de ratones C57BL/6, inoculados con el tumor GIL IV, sobre esplenocitos de distintas cepas murinas estimuladas con el mitógeno PHA. (En la parte superior de la tabla, se indican las distintas diluciones de Fluido Ascítico utilizadas; la dosis de PHA empleada, es la óptima.)

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
B10	111.02 1.2024	110.55 5.0568	99.75 4.2497	80.50 9.1754	59.43 3.6365	-10.94 33.5994
B10D2	129.51 6.100	114.15 5.0697	108.71 10.9760	102.82 5.3441	93.79 13.6392	-8.5 45.2403
C57BL/6	112.49 3.0496	108.00 0.9354	107.03 1.8889	104.76 1.9823	94.26 3.4020	1.93 5.8743
C _{exp}	25.74	29.37	33.77	21.43	16.07	59.31
Varianzas.	≠	≠	≠	≠	≠	≠
Comparaciones.	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
A-B	<	=	=	<	<	=
A-C	=	=	<	<	<	=
B-C	>	=	=	=	=	=
Conclusiones parciales.	A=C B	A=B=C	A B=C	A B=C	A B=C	A=B=C

TABLA XII,b.- De medias, desviaciones y comparaciones entre cepas, referida a la Tabla XII,a. (A=B10; B=B10D2; C=C57BL/6; parte superior de la Tabla diluciones de FA GILIV; Las medias (\bar{x}) corresponden al valor superior de las casillas, siendo la desviación (s) , el valor en posición inferior).

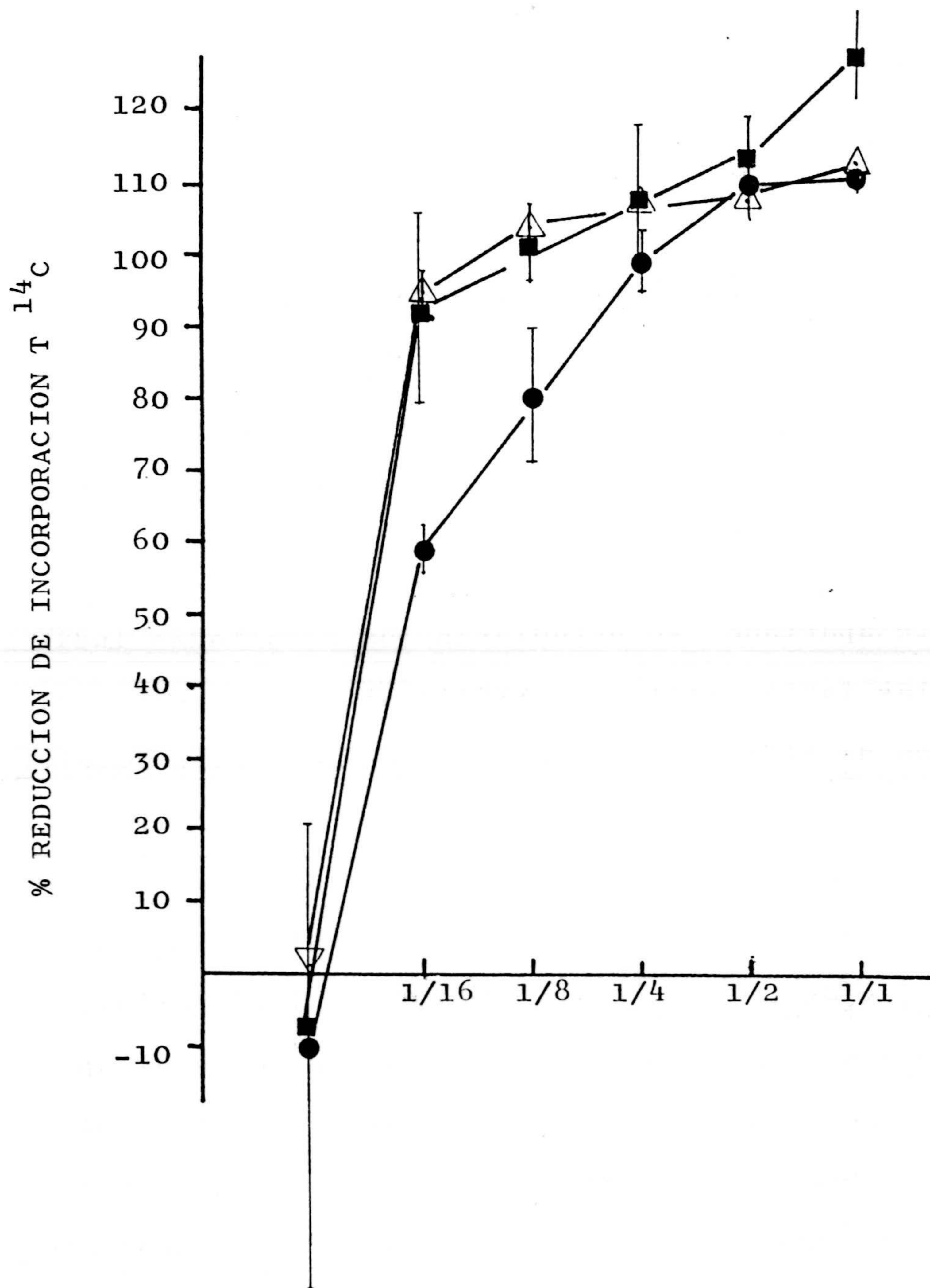


Fig.XII.b. Porcentaje de reducción de incorporación de $T^{14}C$ en esplenocitos de B10A(●—●), B10D2(■—■) y C57BL/6 (△—△) estimulados con PHA y tratados con Fluido Ascítico de GIL IV.

APARTADO IV. Estudio del efecto de Fluidos Ascíticos (F.A.) y Sueros de ratones portadores de tumor sobre esplenocitos normales de ratón estimulados con mitógenos policlonales.

En este apartado, se estudiarán los resultados indicados en las Tablas XIII,a; a XXVIII,a; ambas inclusive. En cada una de ellas, se representa en la margen izquierda los distintos mitógenos utilizados (PHA, ConA, PWM y LPS) y en las casillas de las mismas, se indican las cpm obtenidas en cada caso; las columnas de valores x_0 , x_1 , \bar{x}_1 , \bar{x}_0 , $x_1 - x_0$, y $\frac{\bar{x}_1 - x_1}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0} \cdot 100$ (% de inhibición), tiene el mismo significado que el descrito en el apartado II; correspondiendo la mitad izquierda de la Tabla a los valores obtenidos en cpm, utilizando suero de ratones portadores de tumor, y la otra mitad a los distintos Fluidos Ascíticos. Las dieciseis tablas anteriores, se diferencian en el tumor utilizado.

Tomando como punto de partida los resultados de las Tablas XIII,a a XXVIII,a, se han utilizado para este estudio, exclusivamente, los porcentajes de inhibición

TABLA XIIIa.- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: EAKR (H-2^b)

	SUERO DE B10 (H-2 ^b)					FLUIDO ASCITICO						
	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$		
PHA	1134	1352	5718	4017.2	107.04	1134	4238	5718	4125.2	36.89		
	1186	1279	5830		$\bar{x}_1:$	108.85	1186	4188		5830	$\bar{x}_1:$	38.11
	1348	1387	5845		5652	106.17	1348	4273		5845	5760	36.05
	1876	1415	5723		$\bar{x}_0:$	105.47	1876	4211		5723	$\bar{x}_0:$	37.55
	2630	1343	5684		1634.8	107.26	2630	4310		5684	1634.8	35.15
ConA	3614	16640	19962	16411.6	19.90	2222	27828	24288	1978.4	-22.70		
	5796	15456	19676		$\bar{x}_1:$	27.11	4812	26576		22806	$\bar{x}_1:$	-15.94
	4314	16873	19884		19905.6	18.48	3364	27118		23275	2342.2	-18.68
	2150	16587	19993		$\bar{x}_0:$	20.22	2836	27345		22985	$\bar{x}_0:$	-19.83
	1596	16335	20013		3494	21.76	4956	26911		23756	363.8	-17.63
PWM	4962	14944	14260	9870	-3.71	4887	8412	16962	7587.6	62.16		
	4551	10972	13792		$\bar{x}_1:$	36.53	7131	9448		17215	$\bar{x}_1:$	48.50
	4327	13472	15016		14577.6	11.20	5643	8056		15578	13128.4	66.85
	4683	13191	16313		$\bar{x}_0:$	14.05	4910	8653		15550	$\bar{x}_0:$	58.98
	5015	14794	13507		4707.6	-2.20	5133	8144		14332	5540.8	65.69
LPS	3610	674	27489	24612.4	120.46	947	1412	12020	11320.2	95.40		
	6960	874	32751		$\bar{x}_1:$	119.64	873	982		12214	$\bar{x}_1:$	99.20
	7434	913	27374		30321.2	119.48	1015	1300		12318	12211.6	96.39
	5553	608	32518		$\bar{x}_0:$	120.72	989	1215		12034	$\bar{x}_0:$	97.14
	4987	710	31474		5708.8	120.31	633	1325		12472	891.4	96.17

TABLA XIV, a .- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: EQK1 (H-2^b)

		SUERO DE B10 (H-2 ^b)					FLUIDO ASCITICO				
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$
PHA	1134	1230	5718	\bar{x}_1 :		109,81	1134	5434	5718	\bar{x}_1 :	7.90
	1186	1211	5830	5760	4125,2	110.27	1186	5511	5830	5760	6.00
	1348	1249	5845			109.35	1348	5283	5845		11.58
	1876	1318	5723	\bar{x}_0 :		107.68	1876	5113	5723	\bar{x}_0 :	15.68
	2630	1187	5684	1634,8		110.85	2630	5508	5684	1634.8	6.10
ConA	3614	17432	19962	\bar{x}_1 :		15.07	2222	24269	24288	\bar{x}_1 :	-4.28
	5796	17115	19676	19905.6	16411.6	17.00	4812	23365	22806	23422	0.28
	4314	17543	19884			14.39	3364	24118	23275		19784
	2150	17187	19993	\bar{x}_0 :		16.56	2836	24334	22985	\bar{x}_0 :	-4.61
	1596	18176	20013	3494		10.54	4956	23986	23756	3638	-2.85
PWM	4962	7304	14260	\bar{x}_1 :		73.69	4877	14694	16962	\bar{x}_1 :	16.69
	4551	11343	13792	14577.6	9870	32.77	7131	15868	17215	16527.4	6.00
	4327	10112	15016			45.42	5643	13990	15578		10986.6
	4683	12668	16313	\bar{x}_0 :		19.35	4910	14393	15550	\bar{x}_0 :	19.43
	5015	10295	13507	4707.6		43.39	5133	15407	14332	5540.8	10.20
LPS	3610	1064	27489	\bar{x}_1 :		118.99	947	618	12020	\bar{x}_1 :	102.41
	6960	772	32751	30321.2	24612.4	120.06	873	604	12214	12211.6	102.54
	7434	984	27374			119.19	1015	678	12318		11320.2
	5553	478	32518	\bar{x}_0 :		121.25	989	625	12034	\bar{x}_0 :	102.35
	4987	356	31474	57088		121.75	633	644	12472	891.4	102.22

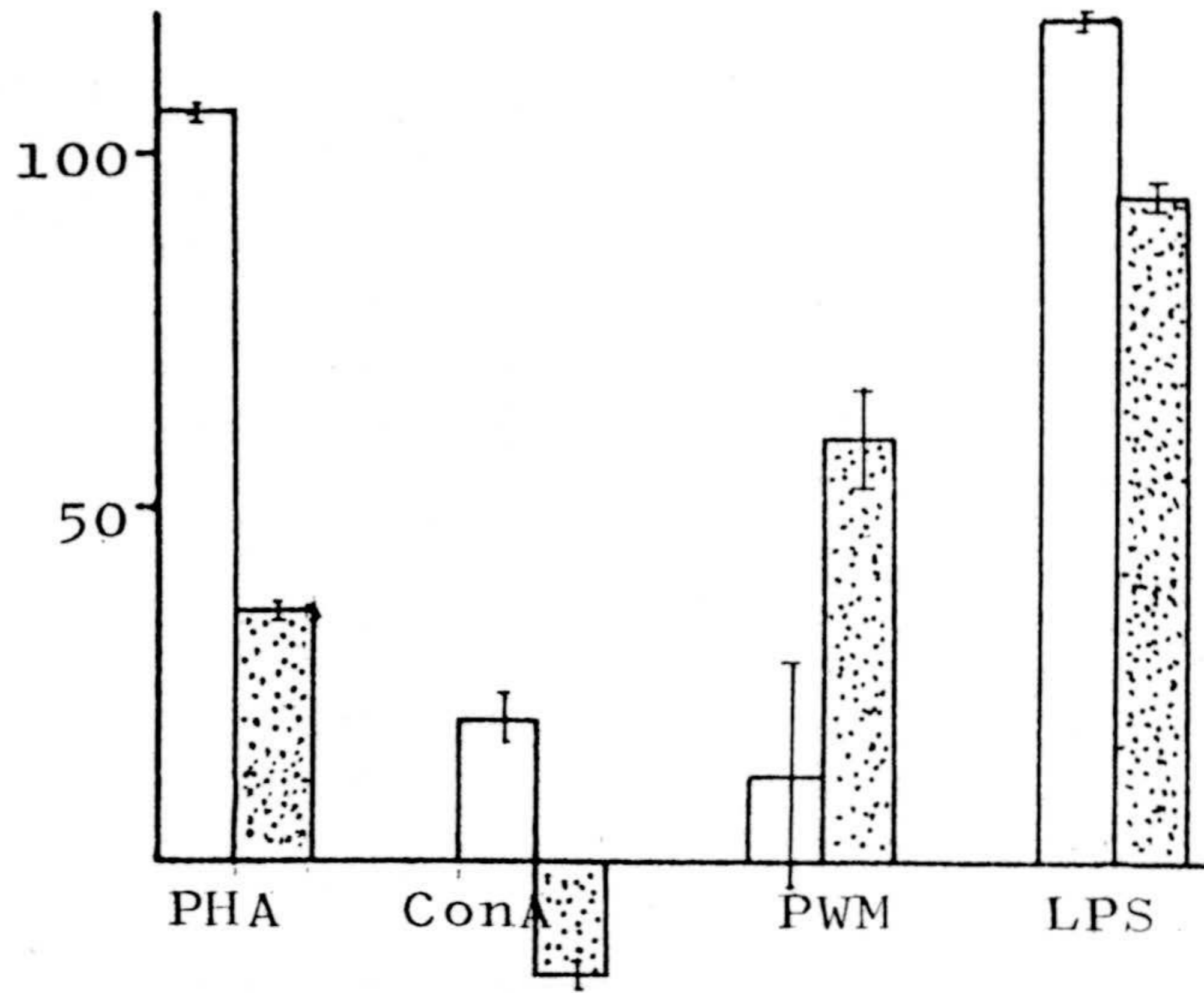
TABLA, XIII, b.

<u>n = 5</u>		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	106.96	21.49	11.17	120.12
	S	1.2759	3.3488	16.2141	0.5365
FLUIDO	\bar{x}	36.75	-18.96	60.44	96.86
	S	1.1788	2.5353	7.3536	1.4476

TABLA, XIV, b.

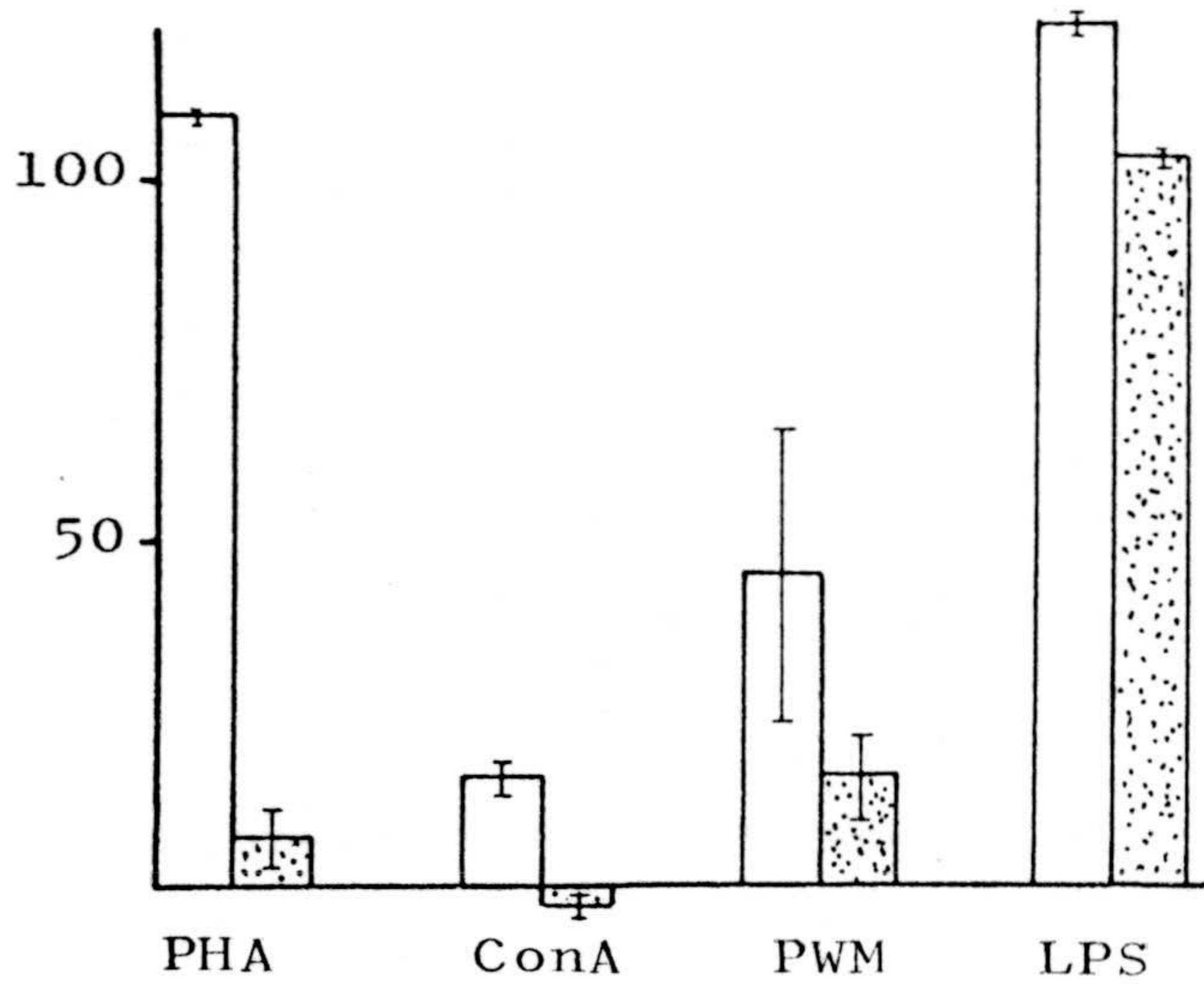
<u>n = 5</u>		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	109.59	14.71	42.92	120.25
	S	1.2045	2.5635	20.0738	1.2244
FLUIDO	\bar{x}	9.45	-2.99	15.08	102.28
	S	4.1496	1.9539	6.9270	0.2514

% REDUCCION INCORPORACION
TIMIDINA ¹⁴C.



Gráfica, XIII, b.
Porcentaje de reducción incorporación Timidina C¹⁴ por esplenocitos de CBA en presencia de: F.A. (▨) y Suero (□) de ratón portador del tumor ascítico EAKR, y de distintos mitógenos.

% REDUCCION INCORPORACION
TIMIDINA ¹⁴C.



Gráfica, XIV, b.
Porcentaje de reducción incorporación T-14C-en esplenocitos de CBA en presencia de F.A. (▨) y Suero (□) de ratón portador del tumor EQK1, y de distintos mitógenos.

TABLA XV, a .- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor:

		SUERO DE C57BL/6 (H-2 ^b)					GIL IV (H-2 ^b) FLUIDO ASCITICO				
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$
PHA		1134	1082	5718	\bar{x}_1 :	113.40	1134	3011	5718	\bar{x}_1 :	66.64
		1186	985	5830	5760	115.75	1186	3079	5830	5760	64.99
		1348	1218	5845	4125.2	110.10	1348	3086	5845	4125.2	64.82
		1876	1183	5723		\bar{x}_0 :	110.95	1876	3112		5723
		2630	1112	5684	1634.8	112.67	2630	2979	5684	1634.8	67.41
ConA		3614	22930	19962	\bar{x}_1 :	-18.43	2222	15407	24288	\bar{x}_1 :	94.32
		5796	23453	19676	19905.6	-21.61	4812	14445	22806	23422	105.65
		4314	21176	19884	16411.6	7.74	3364	15673	23275	8497.2	91.19
		2150	22645	19993		\bar{x}_0 :	-16.69	2836	14118		22985
		1596	23046	20013	3494	-19.13	4956	14981	23756	14924.8	99.34
PWM		3543	12684	12312	\bar{x}_1 :	5.69	4877	11966	16962	\bar{x}_1 :	38.12
		3729	13276	12792	13246.8	-0.29	7131	13914	17215	15923.4	19.35
		3613	11479	14260	9876.6	17.89	5643	13211	15578	10382.6	26.12
		2815	13155	13962		\bar{x}_0 :	0.93	4910	12673		15550
		3141	11206	12908	3368.2	20.66	5133	12464	14332	5540.8	33.32
LPS		3610	958	27489	\bar{x}_1 :	119.30	947	2432	12020	\bar{x}_1 :	86.39
		6960	734	32751	30321.2	120.21	873	2364	12214	12211.6	86.99
		7434	773	27374	24612.4	120.05	1015	2765	12318	11320.2	83.45
		5553	941	32518		\bar{x}_0 :	119.37	989	2294		12034
		4987	1130	31474	5708.8	118.60	633	2128	12472	891.4	89.08

TABLAXVI, a .- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: EL-4 (H-2^b)

		SUERO DE C57BL/6 (H-2 ^b)					FLUIDO ASCITICO					
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	
PHA	1134	2295	5718	\bar{x}_1 :		83.99	1134	1737	5718	\bar{x}_1 :		97.52
	1186	2218	5830	5760		85.86	1186	1866	5830	5760		94.39
	1348	2306	5845		4125.2	83.73	1348	1791	5845		4125.2	96.21
	1876	2273	5723	\bar{x}_0 :		84.53	1876	1815	5723	\bar{x}_0 :		95.63
	2630	2225	5684	1634.8		85.69	2630	1817	5684	1634.8		95.58
ConA	2894	8655	14405	\bar{x}_1 :		52.03	2222	11026	24288	\bar{x}_1 :		62.66
	2636	8543	14156	14247.4		53.07	4812	11115	22806	23422		62.21
	3358	8612	14233		10748.8	52.43	3364	10876	23275		19784	63.41
	5178	8156	13877	\bar{x}_0 :		56.67	2836	11098	22985	\bar{x}_0 :		62.29
	3427	8473	14566	3498.6		53.72	4956	10997	23756	3638		62.80
PWM	4962	12796	14260	\bar{x}_1 :		18.05	4887	9272	16962	\bar{x}_1 :		66.04
	4551	9560	13792	14577.6		50.84	7131	7212	17215	16527.4		84.78
	4327	11405	15016		9870	32.14	5643	7754	15578		10986.6	79.85
	4683	10731	16313	\bar{x}_0 :		38.97	4910	8456	15550	\bar{x}_0 :		73.46
	5015	11323	13507	4707.6		32.97	5133	8331	14332	5540.8		74.60
LPS	3610	2730	27489	\bar{x}_1 :		112.10	947	4442	12020	\bar{x}_1 :		68.63
	6960	4651	32751	30321.2		104.30	873	2286	12214	12211.6		87.68
	7434	6110	27374		24612.4	98.37	1015	3136	12318		11320.2	80.17
	5553	5327	32518	\bar{x}_0 :		101.55	989	3213	12034	\bar{x}_0 :		79.49
	4987	4343	31474	5708.8		105.55	633	2654	12472	891.4		84.43

TABLA, XV, b.

n=5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	112.57	-16.72	8.98	119.51
	S	2.2100	5.3217	9.7130	0.6467
FLUIDO	\bar{x}	65.61	100.00	29.64	86.70
	S	1.3533	7.6206	7.1853	2.0759

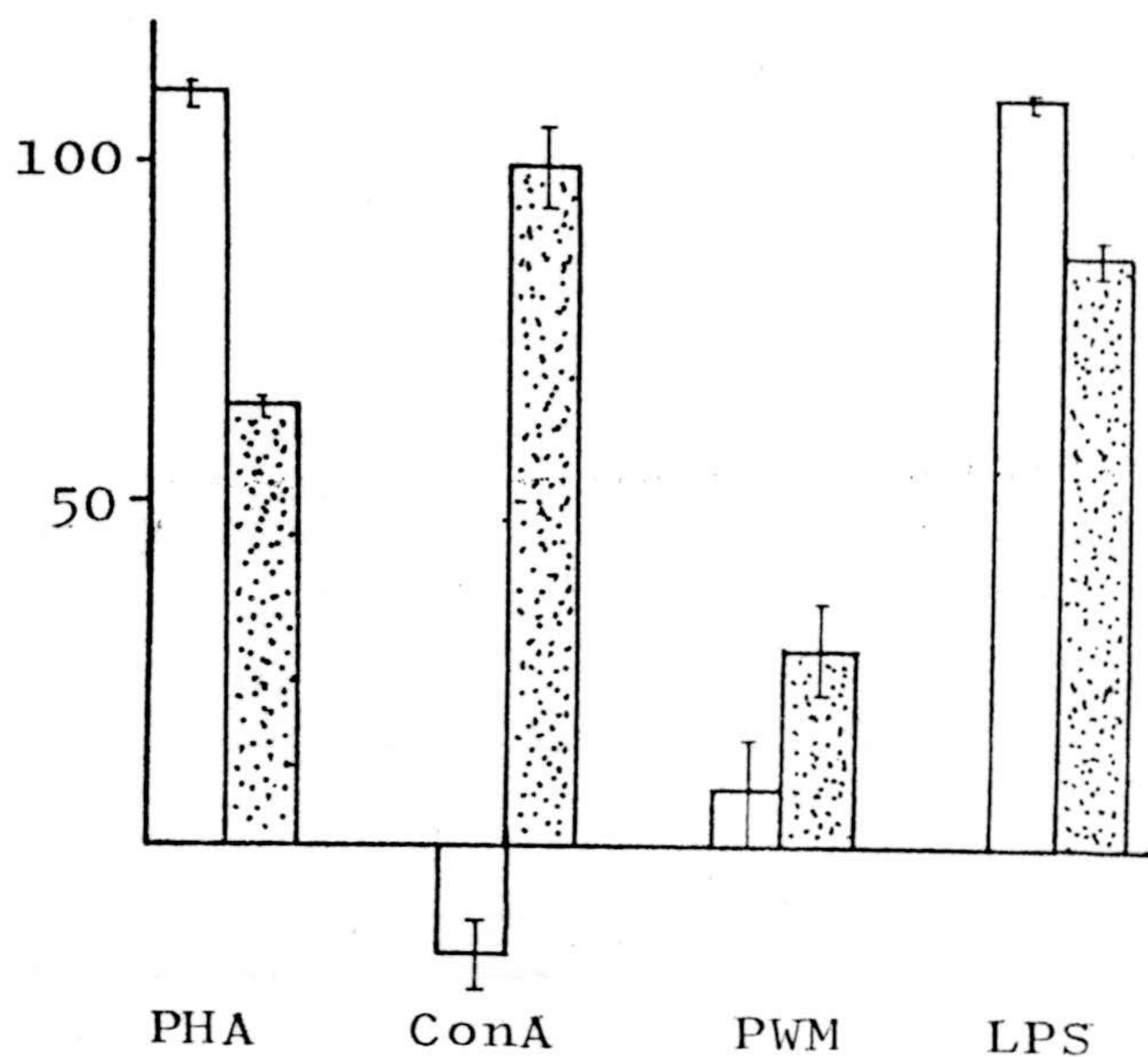
$C_{exp} = 225.6 === Var \neq$

TABLA, XVI, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	84.76	53.58	34.59	104.37
	S	0.9723	1.8407	11.8895	5.1259
FLUIDO	\bar{x}	95.87	62,67	75.75	80.08
	S	1.1368	0.4797	7.0569	7.2135

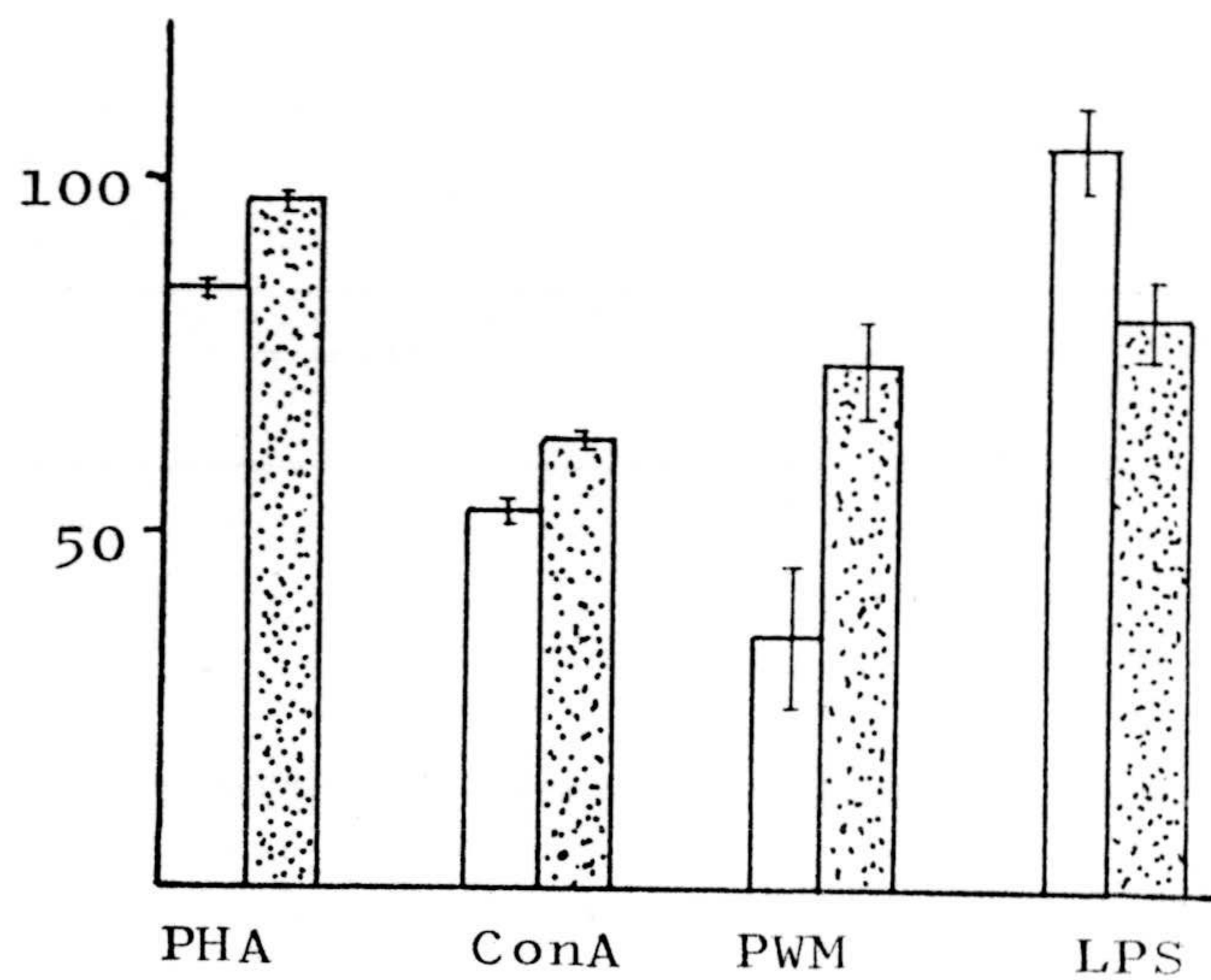
$C_{exp} = 614,3 === Var \neq$

% REDUCCION INCORPORACION
TIMIDINA ¹⁴C.



Gráfica, XV, b.
Porcentaje de reducción incorporación Timidina-¹⁴C-por esplenocitos de CBA, en presencia de F.A. (▨) y Sero (□) de ratón portador del tumor GIL-IV y de distintos mitógenos.

% REDUCCION INCORPORACION
TIMIDINA ¹⁴C.



Gráfica, XVI, b.
Porcentaje de reducción incorporación Timidina-¹⁴C-por esplenocitos de CBA, en presencia de F.A. (▨) y Sero (□) de ratón portador del tumor EL-4 y de distintos mitógenos.

TABLA XVII, a.- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: MCG3 (H-2^b)

	SUERO DE B10 (H-2 ^b)					FLUIDO ASCITICO					
	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	
PHA	1134	1415	5718	\bar{x}_1 :		10533	1134	6018	5718	\bar{x}_1 :	-6.25
	1186	1480	5830	5760		103.75	1186	5530	5830	5760	5.57
	1348	1355	5845	4125.2		106.78	1348	5618	5845	4125.2	3.44
	1876	1520	5723		\bar{x}_0 :		102.78	1876	5175		5723
	2630	1473	5684	1634.8		103.92	2630	5610	5684	1634.8	3.64
ConA	3614	15764	19962	\bar{x}_1 :		2523	2222	37490	24288	\bar{x}_1 :	-71.11
	5796	16547	19676	19905.6		20.46	4812	36545	22806	23422	-66.33
	4314	17352	19884	16411.6		15.56	3364	37869	23275	19784	-73.02
	2150	16664	19993		\bar{x}_0 :		19.75	2836	36171		22935
	1596	17019	20013	3494		17.59	4956	37132	23756	3638	-69.30
PWM	4962	13550	14260	\bar{x}_1 :		10.41	3112	18402	11387	\bar{x}_1 :	-51.88
	4551	13558	13792	14577.6		10.33	3517	16862	12675	13237.4	-36.41
	4327	14784	15016	9370		-2.09	3481	17367	14632	9954.8	-41.48
	4683	14233	16313		\bar{x}_0 :		3.49	3320	15763		13850
	5015	13179	13507	4707.6		14.17	2983	16950	13643	3282.6	-37.29
LPS	3610	7284	27489	\bar{x}_1 :		93.60	947	6709	12020	\bar{x}_1 :	48.61
	6960	6492	32751	30321.2		96.82	873	5876	12214	12211.6	55.97
	7434	4722	27374	24612.4		104.00	1015	6204	12318	11320.2	53.07
	5553	5538	32518		\bar{x}_0 :		100.69	989	6390		12034
	4987	5027	31474	5708.8		102.77	633	7219	12472	891.4	44.10

TABLA XVIIIa.- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: TLX9 (H-2^b)

		SUERO DE C57BL/6 (H-2 ^b)					FLUIDO ASCITICO				
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$
PHA		1134	1238	5718	\bar{x}_1 :	10962	1134	1533	5718	\bar{x}_1 :	102.47
		1186	1179	5830	5760	111.05	1186	1387	5830	5760	106.00
		1348	1276	5845	4125.2	108.70	1348	1576	5845	4125.2	101.42
		1876	1186	5723		\bar{x}_0 :	11088	1876	1544		5723
		2630	1274	5684	1634.8	108.75	2630	1595	5684	1634.8	106.96
ConA		2894	8802	14045	\bar{x}_1 :	50.66	2222	21069	24288	\bar{x}_1 :	11.89
		2636	8631	14771	14247.4	52.25	4812	22105	22806	23422	6.66
		3358	8456	13768	10748.8	53.88	3364	21189	23275	19784	11.29
		5178	8321	12120		\bar{x}_0 :	55.13	2836	21033		22985
		3427	7763	14398	5498.6	60.33	4956	19546	23756	3638	19.59
PWM		4962	19996	14260	\bar{x}_1 :	-54.90	3543	7422	12312	\bar{x}_1 :	58.96
		4551	12344	13792	14577.6	-89.83	3729	9500	12792	13246.8	37.93
		4327	18858	15016	9870	-43.37	3613	8306	14260	9878.6	50.01
		4683	21454	16313		\bar{x}_0 :	-69.67	2815	8753		13962
		5015	23900	13507	4707.6	-94.45	3141	8432	12908	3368.2	48.74
LPS		3610	5184	27489	\bar{x}_1 :	10213	947	1832	12020	\bar{x}_1 :	91.69
		6960	8064	32751	30321.2	90.43	873	1394	12214	12211.6	95.56
		7434	7771	27374	24612.4	91.62	1015	1482	12318	11320.2	94.78
		5553	7135	32518		\bar{x}_0 :	94.20	989	1846		12034
		4987	11213	31474	5708.8	77.64	633	1277	12472	891.4	96.59

TABLA, XVII, b.

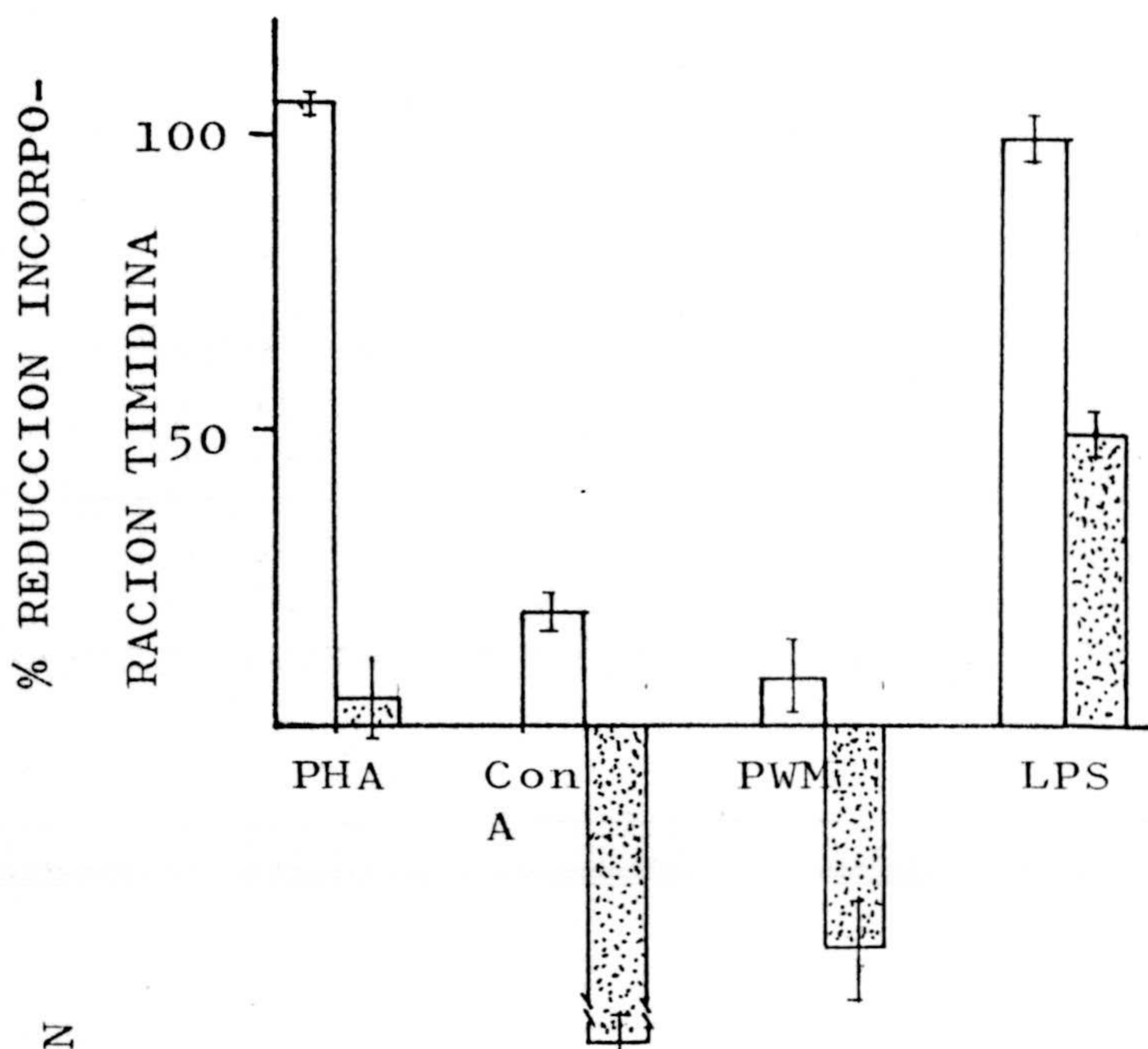
n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	104.51	19.72	7.26	99.58
	S	1.5607	3.6314	6.4948	4.3105
FLUIDO	\bar{x}	4.12	-68.84	-38.49	50.64
	S	7.2721	3.4819	9.5673	4.5230

$C_{exp} = 37,6 \quad === \quad Var. \neq$

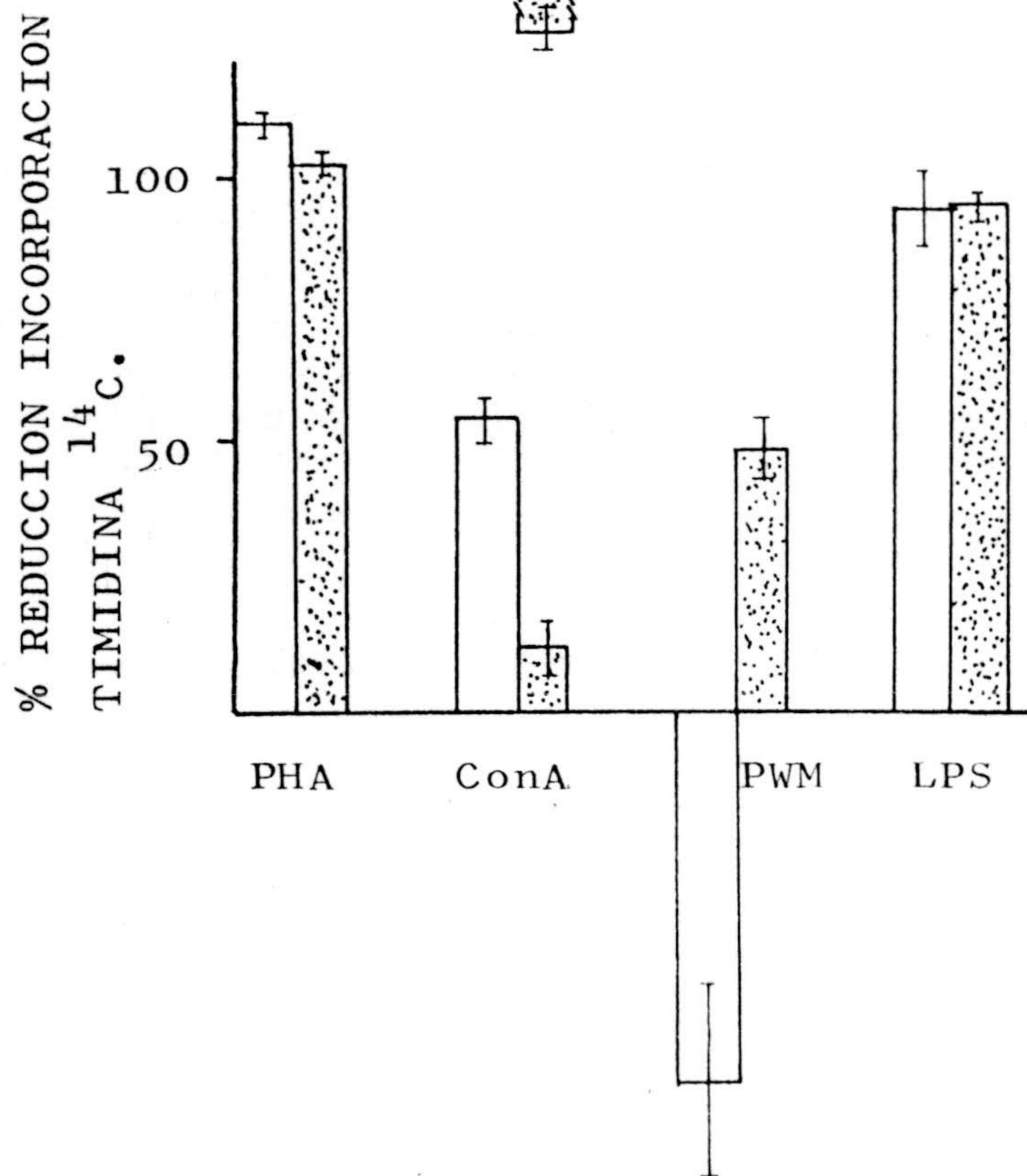
TABLA, XVII, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	109.80	54.45	-70.44	91.20
	S	1.1262	3.6934	21.9506	8.8474
FLUIDO	\bar{x}	102.61	12.30	48.23	94.04
	S	1.9886	4.6420	7.6183	2.2904

$C_{exp} = 379.9 \quad === \quad Var. \neq$



Gráfica, XVII, b.
Porcentaje de reducción incorporación Timidina- ^{14}C -por esplenocitos de CBA, en presencia de F.A. (▨) y Suero (□) de ratón portador del tumor MCG3 y de distintos mitógenos.



Gráfica, XVIII, b.
Porcentaje de reducción incorporación Timidina- ^{14}C -por esplenocitos de CBA, en presencia de F.A. (▨) y Suero (□) de ratón portador del tumor TLX9 y de distintos mitógenos.

TABLA XIX, a.- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: L1210 (H-2^d)

	SUERO DE DBA/2 (H-2 ^d)					FLUIDO ASCITICO				
	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$
PHA	1134	1318	5718	\bar{x}_1 :		1134	4579	5718	\bar{x}_1 :	
	1186	1523	5830	5760		1186	4486	5830	5760	
	1348	1435	5845			1348	4468	5845		
	1876	1408	5723	\bar{x}_0 :	4125.2	1876	4787	5723	\bar{x}_0 :	4125.2
	2630	1426	5684	1634.8		2630	4363	5684	1634.8	
ConA	2222	19953	24288	\bar{x}_1 :		2894	8931	14045	\bar{x}_1 :	
	4812	15632	22806	23422		2636	8777	14156	14175.4	
	3364	15854	23275			3358	8910	14233		
	2836	17846	22935	\bar{x}_0 :	19784	5178	8732	13877	\bar{x}_0 :	10676.8
	4956	17463	23756	3638		3427	8665	14566	3498.6	
PWM	4887	13250	16962	\bar{x}_1 :		4017	10431	17889	\bar{x}_1 :	
	7131	12980	17215	15927.4		4213	12684	22432	19960	
	5643	15920	15578			4119	10910	21645		
	4910	12870	15550	\bar{x}_0 :	10386.6	4617	15920	18221	\bar{x}_0 :	15664.8
	5133	15760	14332	5540.8		4510	15840	19013	4295.2	
LPS	947	2033	12020	\bar{x}_1 :		947	5110	12020	\bar{x}_1 :	
	873	2543	12214	12211.6		873	2614	12214	12211.6	
	1015	1511	12318			1015	2192	12318		
	989	2517	12034	\bar{x}_0 :	11320.2	989	2636	12034	\bar{x}_0 :	11320.2
	633	1891	12472	891.4		633	2494	12472	891.4	

TABLA XX,a .- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^a) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: LSTRA (H-2^d)

		SUERO DE BALB/C (H-2 ^d)					FLUIDO ASCITICO				
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$
PHA	1134	4038	5718	\bar{x}_1 :		41.74	1134	3017	5718	\bar{x}_1 :	66.49
	1186	3913	5830	5760		44.77	1186	2677	5830	5760	74.73
	1348	4110	5845	\bar{x}_0 :	4125.2	40.00	1348	2511	5845	4125.2	78.76
	1876	3933	5723			44.29	1876	2618	5723		76.17
	2630	3989	5684	1634.8		42.93	2630	2573	5684	1634.8	77.26
ConA	3614	25798	19962	\bar{x}_1 :		-35.00	2894	15309	14045	\bar{x}_1 :	-10.62
	5796	23432	19676	19905.4		-21.49	2636	14787	14156	14175.4	- 5.73
	4314	24567	19884	\bar{x}_0 :	16411.4	-28.40	3358	13876	14233	10676.8	2.80
	2150	25835	19992			-36.13	5178	15117	13877		- 8.82
	1596	25107	20013	3494		-31.69	3427	15098	14566	3498.6	- 8.64
PWM	3543	6762	12312	\bar{x}_1 :		65.64	4887	2436	16962	\bar{x}_1 :	129.90
	3729	6274	12792	13246.8		70.58	7131	4674	17215	15923.4	108.35
	3613	6428	14260	\bar{x}_0 :	9878.6	69.02	5643	3068	15558	10382.6	123.82
	2815	6654	13962			66.74	4910	2744	15550		126.94
	3141	7232	12908	3368.2		60.89	5133	4136	14332	5540.8	113.53
LPS	3610	2340	27489	\bar{x}_1 :		113.69	946	776	12020	\bar{x}_1 :	101.02
	6960	2288	32751	30321.2		113.90	873	812	12214	12211.6	100.70
	7434	4354	27374	\bar{x}_0 :	24612.4	105.50	1015	500	12318	11320.2	103.46
	5553	2671	32518			112.34	989	673	12034		101.93
	4987	2543	31474	5708.8		112.86	633	710	12472	891.4	101.60

TABLA, XIX, b.

n=5	PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x} 105.16	30.69	17.06	89.33
	S 1.7734	8.8360	14.8728	3.8647
FLUIDO	\bar{x} 29.66	50.32	43.43	81.29
	S 3.8661	1.0720	16.75	10.4925

$C_{exp} = 244.1 \quad === \quad Var. \neq$

TABLA, XX, b.

n=5	PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x} 42.75	-30.72	66.57	111.66
	S 1.9408	6.0748	3.7161	3.4995
FLUIDO	\bar{x} 74.68	-6.2020	120.51	101.74
	S 4.8114	5.3285	9.1795	1.0740

$C_{exp} = 73.10 \quad === \quad Var. \neq$

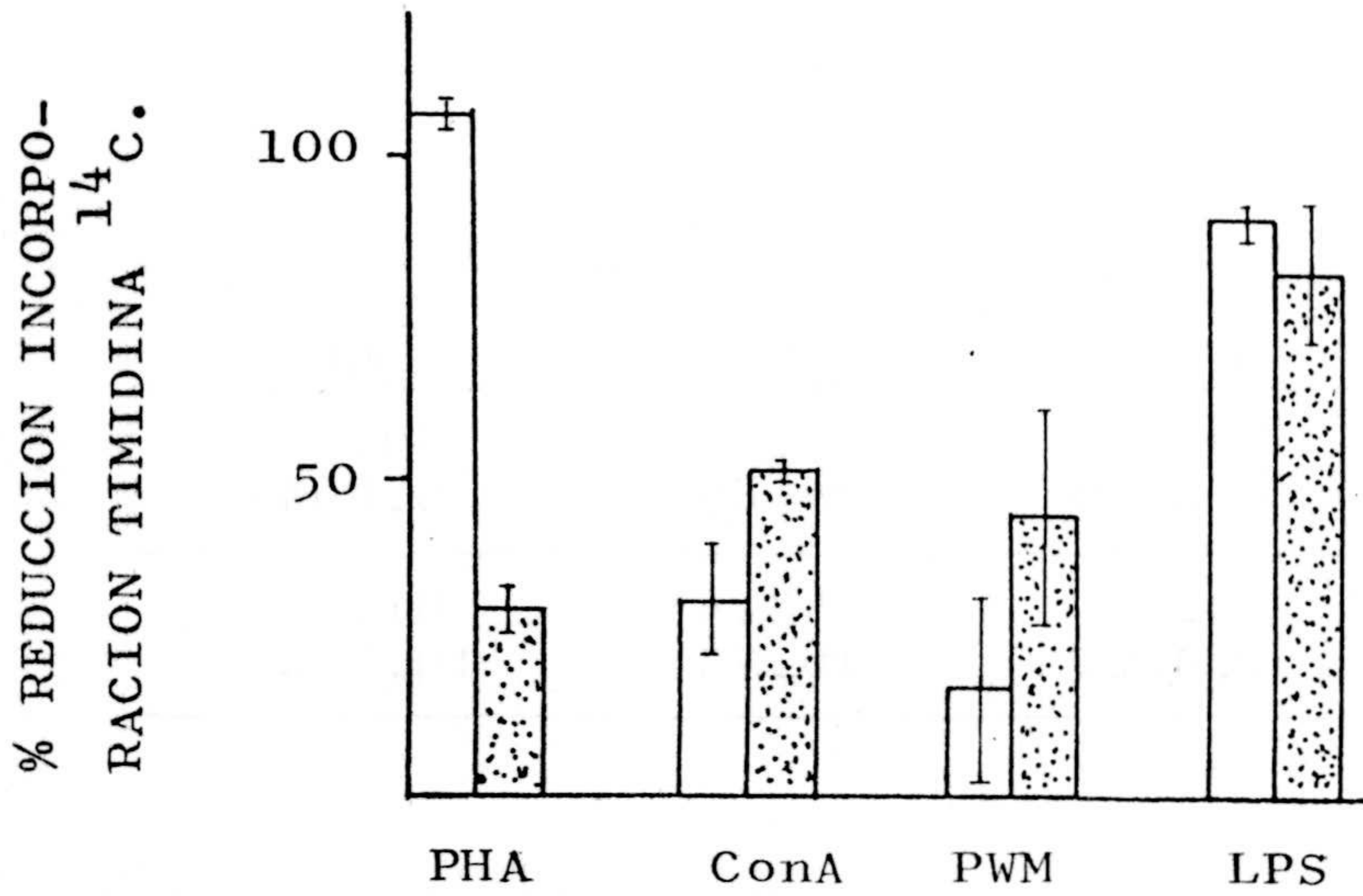


Fig.XIX,b.
Porcentaje de reducción incorporación Timidina-14C- por esplenocitos de CBA, en presencia de F.A. (▨) y Suero(□) de ratón portador del tumor L1210 y de distintos mitógenos.

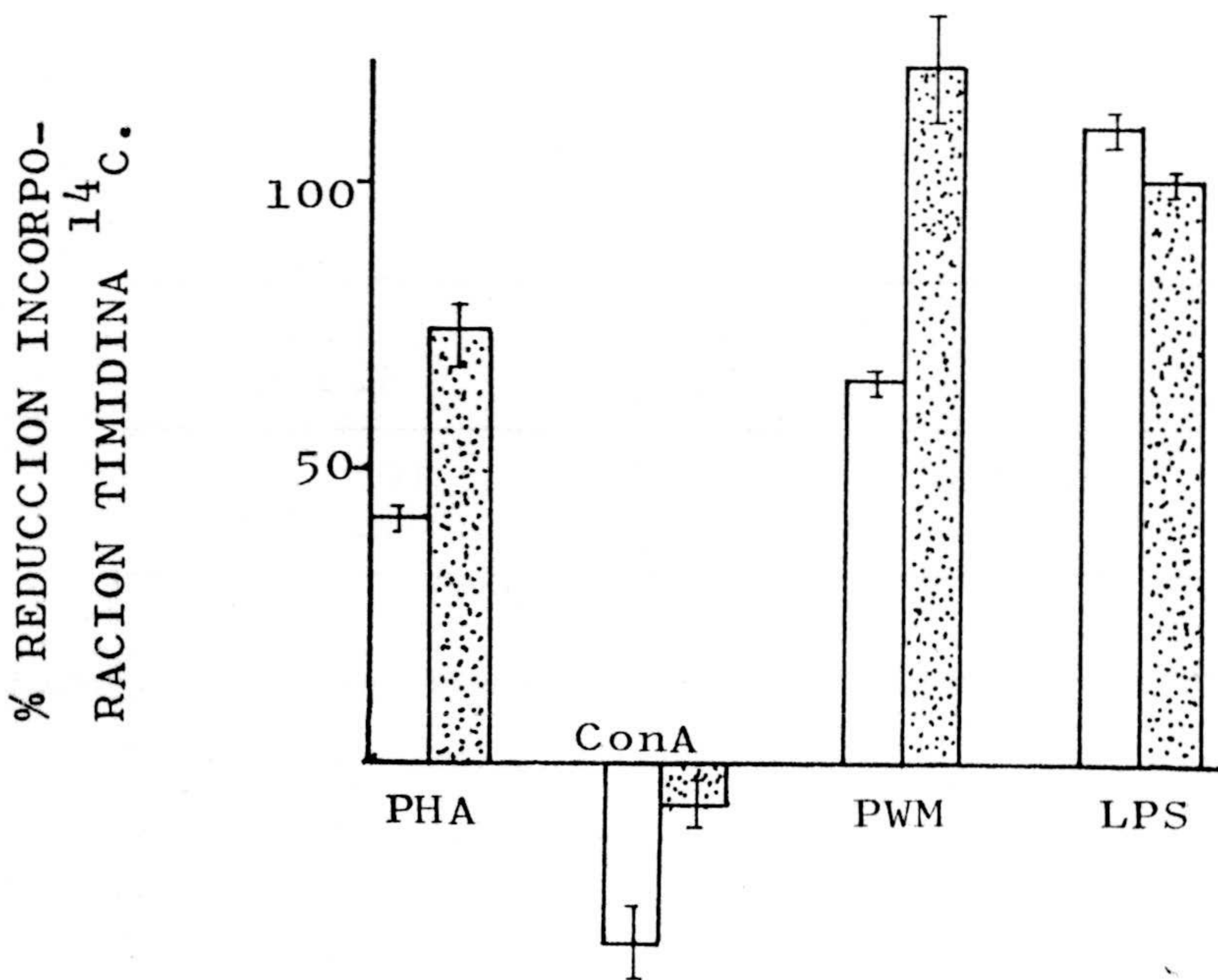


Fig.XX.b.
Porcentaje de reducción incorporación Timidina-14C- por esplenocitos de CBA en presencia de: F.A. (▨) y Suero(□) de ratón portador del tumor L1210 y de distintos mitógenos.

TABLA XXI, a .- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: L5178YE (H-2^d)

		SUERO DE DBA/2 (H-2 ^d)					FLUIDO ASCITICO					
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	
PHA	1134	3452	5718	\bar{x}_1 :		55.95	1134	2202	5718	\bar{x}_1 :		86.25
	1186	3222	5830	5760		61.52	1186	2162	5830	5760		87.22
	1348	3312	5845		4125.2	59.34	1348	2168	5845		4125.2	87.07
	1876	3473	5723	\bar{x}_0 :		55.44	1876	2211	5723	\bar{x}_0 :		86.03
	2630	3407	5684	1634.8		57.04	2630	2175	5684	1634.8		86.90
ConA	3614	16469	19962	\bar{x}_1 :		20.94	2894	10894	14045	\bar{x}_1 :		30.73
	5796	15171	19676	199056		28.85	2636	10656	14156	14175.4		32.96
	4314	16893	19884		16411.6	18.36	3358	10786	14233		10676.8	31.74
	2150	17211	19993	\bar{x}_0 :		16.42	5178	10177	13877	\bar{x}_0 :		37.45
	1596	16563	20013	3494		20.37	3427	11018	14566	3498.6		29.57
PWM	3543	10296	12312	\bar{x}_1 :		29.86	4887	10296	16962	\bar{x}_1 :		54.22
	3729	10896	12792	13246.8		23.80	7131	10896	17215	15927.4		48.44
	3613	8847	14260		9878.6	44.53	5643	10658	15578		10386.6	50.73
	2815	9352	13962	\bar{x}_0 :		39.43	4910	11206	15550	\bar{x}_0 :		45.46
	3141	9112	12908	3368.2		41.86	5133	10626	14332	5540.8		51.04
LPS	3610	4646	27489	\bar{x}_1 :		104.32	947	3182	12020	\bar{x}_1 :		79.76
	6960	2802	32751	30321.2		111.81	873	3054	12214	12211.6		80.90
	7434	2400	27374		24612.4	113.44	1015	3410	12318		113202	77.75
	5553	2773	32518	\bar{x}_0 :		111.93	989	3215	12034	\bar{x}_0 :		79.47
	4987	2415	31474	5708.8		113.38	633	3316	12472	891.4		78.58

TABLA XXII, a.- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor:

		SUERO DE BALB/c (H-2 ^d)					MCG4 (H-2 ^d) FLUIDO ASCITICO					
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	
PHA	1134	6570	5718	\bar{x}_1 :		-19.63	1134	2073	5718	\bar{x}_1 :	89.38	
	1186	6333	5830	5760		-13.89	1186	2108	5830	5760	88.53	
	1348	5835	5845			-1.82	1348	2016	5845		90.76	
	1876	6280	5723	\bar{x}_0 :	4125.2	-12.60	1876	2037	5723	\bar{x}_0 :	4125.2	90.25
	2630	6113	5684	1634.8		-8.56	2630	2083	5684	1634.8	89.13	
ConA	3614	20576	19962	\bar{x}_1 :		-4.08	2222	18873	24288	\bar{x}_1 :	22.99	
	5796	18572	19676	199056		8.12	4812	18675	22806	23422	23.99	
	4314	19431	19884			2.89	3364	18364	23275		19784	25.57
	2150	19882	19993	\bar{x}_0 :	16411.6	0.14	2836	18911	22985	\bar{x}_0 :		22.80
	1596	20323	20013	3494		-2.54	4956	16156	23756	3638		36.72
PWM	3543	4150	12312	\bar{x}_1 :		92.08	3543	8317	12312	\bar{x}_1 :	49.89	
	3729	4904	12792	13246.8		84.45	3729	11012	12792	13246.8	22.62	
	3613	6380	14260			69.51	3613	9512	14260		9878.6	37.81
	2815	5136	13962	\bar{x}_0 :	9878.6	82.10	2815	9632	13962	\bar{x}_0 :		36.59
	3141	4785	12908	3368.2		85.66	3141	8896	12908	3368.2		44.04
LPS	947	1850	12020	\bar{x}_1 :		91.53	947	1546	12020	\bar{x}_1 :	94.22	
	873	1152	12214	12211.6		97.70	873	1783	12214	12211.6	92.12	
	1015	710	12318			101.60	1015	1562	12318		11320.2	94.07
	989	1347	12034	\bar{x}_0 :	11320.2	95.97	989	1570	12034	\bar{x}_0 :		94.00
	633	1883	12472	891.4		102.28	633	1936	12472	891.4		90.77

TABLA, XXI, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	57.86	20.99	35.90	110.98
	S	2.5378	4.7425	8.7371	3.8000
FLUIDO	\bar{x}	86.69	32.49	49.98	79.29
	S	0.5240	3.0417	3.2582	1.1959

$C_{exp} = 278 \quad \text{====} \quad \text{Var. } \neq$

TABLA, XXII, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	-11.3	0.91	82.76	97.82
	S	6.6174	4.8295	8.2783	4.3926
FLUIDO	\bar{x}	89.61	26.41	38.19	93.04
	S	0.8918	5.8648	10.2010	1.5308

$C_{exp} = 130.8 \quad \text{====} \quad \text{Var. } \neq$

% REDUCCION INCORPORACION
TIMIDINA ¹⁴C

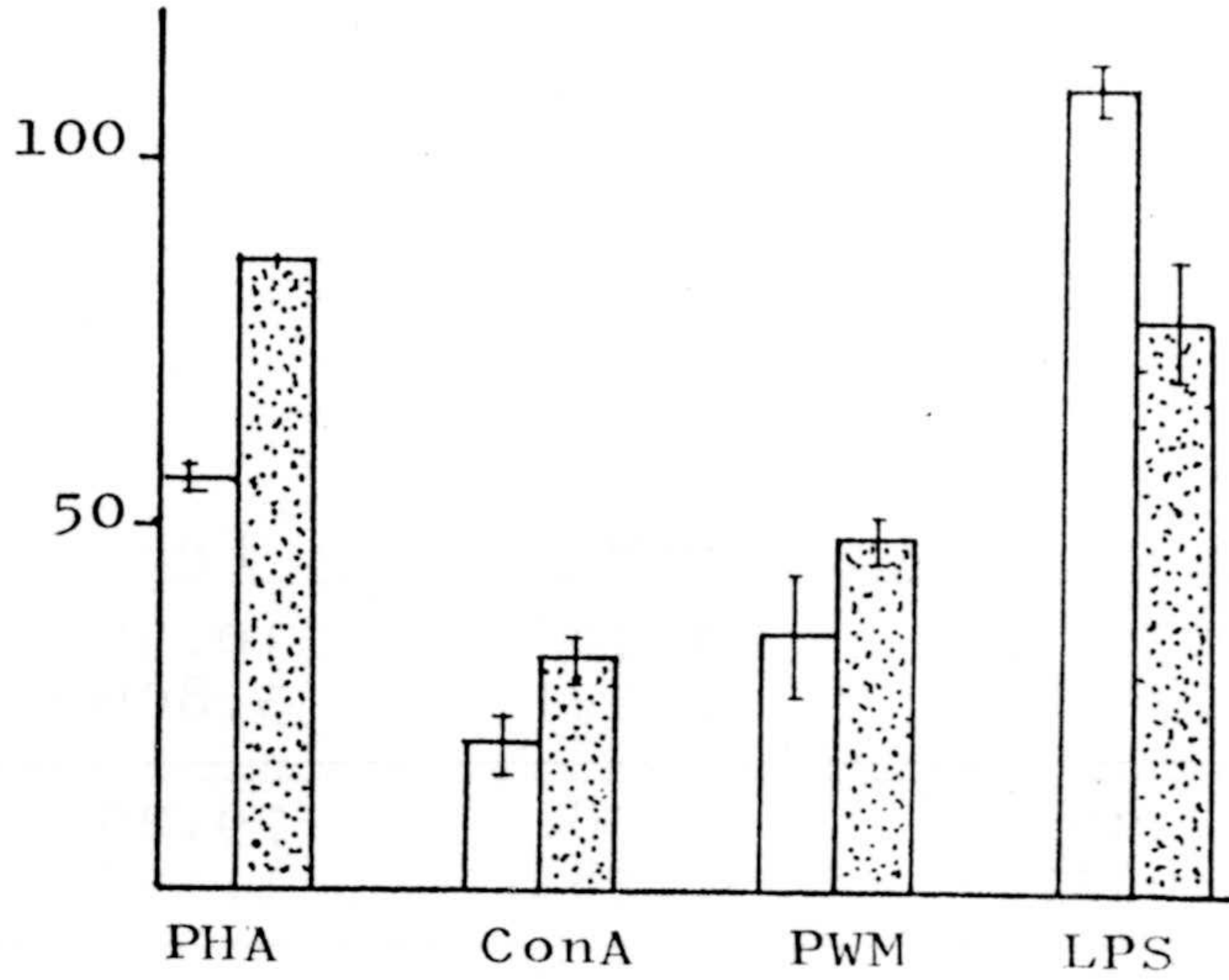


Fig. XXI.b.
Porcentaje de reducción
incorporación-¹⁴T-por
esplenocitos de CBA
estimulados por diver-
sos mitógenos en pre-
sencia de F.A. (▨))
y Suero (□) de ra-
tón portador del tumor
L5178YE.

% REDUCCION INCORPO-
RACION TIMIDINA ¹⁴C.

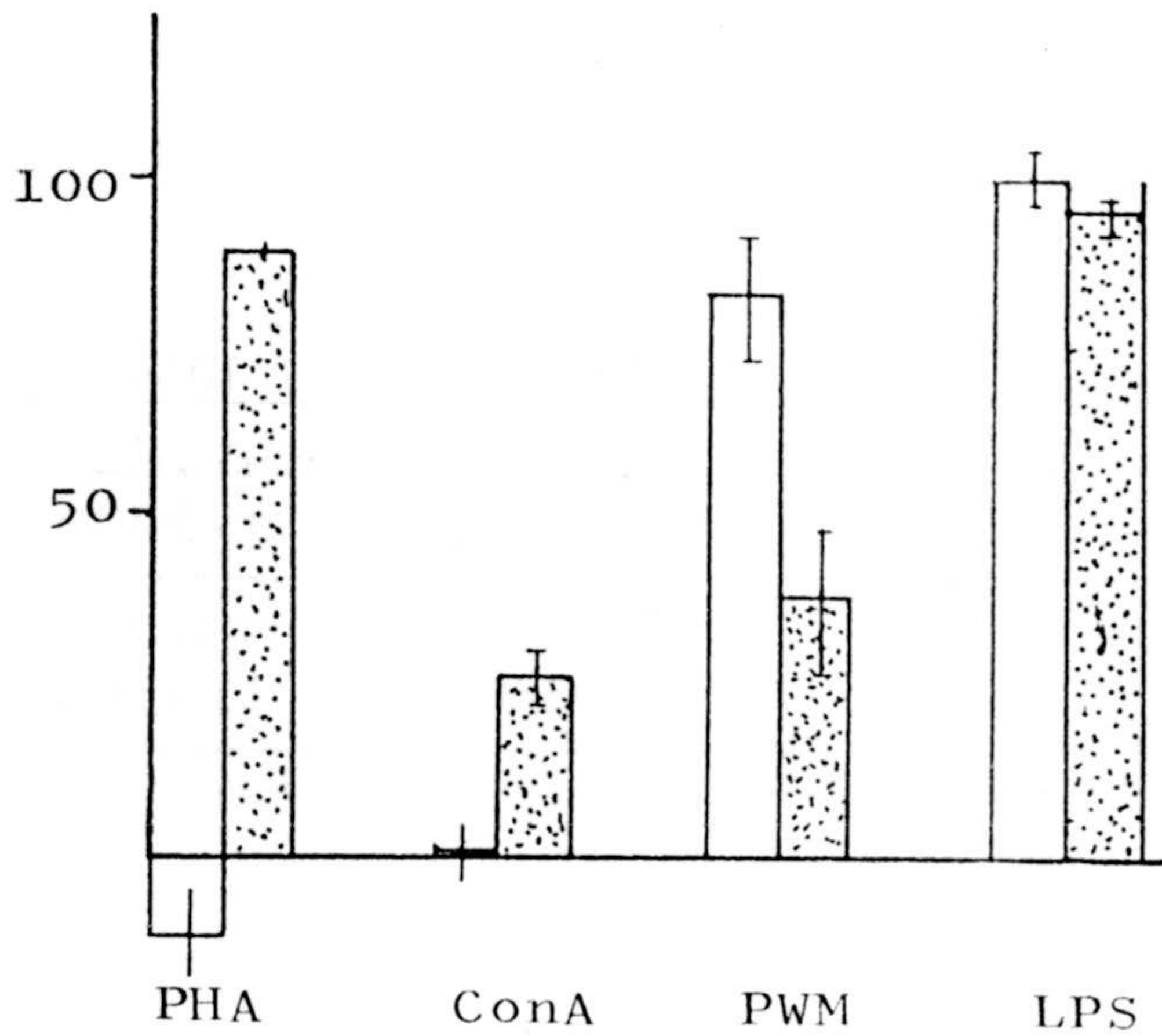


Fig. XXII.b.
Porcentaje de reducción
incorporación-¹⁴CT-por
esplenocitos de CBA es-
timulados por distintos
mitógenos en presencia
de F.A. (▨)) y Suero
(□) de ratón porta-
dor del tumor MCG4.

TABLAXXIII,a.- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: METHA (H-2^d)

		SUERO DE BALB/c (H-2 ^d)					FLUIDO ASCITICO				
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$
PHA		1134	3006	5718	\bar{x}_1 :	66.76	1134	3801	5718	\bar{x}_1 :	47.49
		1186	2978	5830	5760	67.44	1186	3784	5830	5760	47.90
		1348	2971	5845	4125.2	67.61	1348	3773	5845	4125.2	48.17
		1876	3083	5723		\bar{x}_0 :	94.15	1876	3611		5723
		2630	2930	5684	1634.8	68.60	2630	3722	5684	1634.8	49.40
ConA		3614	17535	19962	\bar{x}_1 :	14.44	2222	28237	24288	\bar{x}_1 :	-24.34
		5796	16834	19676	19905.6	18.72	4812	27657	22806	23422	-21.41
		4314	17863	19884	16411.6	12.45	3364	27543	23275	19784	-20.83
		2150	17832	19993		\bar{x}_0 :	12.63	2836	27865		22985
		1596	19650	20013	3494	1.56	4956	27918	23756	3638	-22.72
PWM		4962	11764	14260	\bar{x}_1 :	28.51	3543	11764	12312	\bar{x}_1 :	15.01
		4551	12908	13792	14577.6	16.91	3729	12908	12792	13246.8	3.43
		4327	13962	15016	9870	6.24	3613	13952	14260	9878.6	-7.24
		4683	13737	16313		\bar{x}_0 :	8.52	2815	13568		13962
		5015	12481	13507	4707.6	21.24	3141	12684	12908	3368.2	5.70
LPS		3610	3102	27489	\bar{x}_1 :	110.59	947	3000	12020	\bar{x}_1 :	81.37
		6960	2644	32751	30321.2	112.45	873	4274	12214	12211.6	70.12
		7434	2315	27374	24612.4	113.79	1015	3254	12318	11320.2	79.13
		5553	3086	32518		\bar{x}_0 :	110.66	989	2432		12034
		4987	2631	31474	5708.8	112.50	633	4540	12472	891.4	67.77

TABLA XXIV, a. - Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: P815X2 (H-2^d)

		SUERO DE DBA/2 (H-2 ^d)					FLUIDO ASCITICO					
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	
PHA	1134	3002	5718	\bar{x}_1 :		66.86	1134	3589	5718	\bar{x}_1 :		52.63
	1186	3017	5830	5760	4125.2	66.49	1186	3488	5830	5760	4125.2	55.08
	1348	3108	5845			64.29	1348	3519	5845			54.32
	1876	2888	5723	\bar{x}_0 :		69.62	1876	3607	5723	\bar{x}_0 :		52.19
	2630	2930	5684	1634.8		68.60	2630	3563	5684	1634.8		53.26
ConA	3614	13191	19962	\bar{x}_1 :			40.91	2894	11011	14045		\bar{x}_1 :
	5796	14830	19676	19905.6	16411.6	30.93	2636	10992	14156	14175.4	10676.8	29.82
	4314	13756	19884	37.47		3358	10879	14233	30.87			
	2150	11176	19993	\bar{x}_0 :		53.19	5178	10453	13877	\bar{x}_0 :		34.86
	1596	14376	20013	3494		33.69	3427	10786	14566	3498.6		31.74
PWM	4962	11602	14260	\bar{x}_1 :			30.15	3543	7762	12312		\bar{x}_1 :
	4551	9036	13792	14577.6	9870	56.14	3729	11242	12792	13246.8	9878.6	20.29
	4327	9341	15016	53.05		3613	8606	14260	46.98			
	4683	9304	16313	\bar{x}_0 :		53.43	2815	8642	13962	\bar{x}_0 :		46.61
	5015	10820	13507	4707.6		38.07	3141	9924	12908	3368.2		33.64
LPS	3610	9120	27489	\bar{x}_1 :			86.14	558	1410	10208		\bar{x}_1 :
	6960	9992	32751	30321.2	24612.4	82.60	599	1696	10320	10582.4	10065.8	88.28
	7434	11404	27374	76.86		375	1150	11661	93.71			
	5553	10354	32518	\bar{x}_0 :		81.13	615	1328	10990	\bar{x}_0 :		91.94
	4987	11152	31474	5708.8		77.88	436	1422	9733	516.6		91.00

TABLA, XXIII, b.

n=5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	72.91	11.96	16.28	112.00
	S	11.8906	6.3383	9.1595	1.3638
FLUIDO	\bar{x}	49.01	-22.35	2.73	76.96
	S	1.8632	1.3512	8.5917	7.8154
$C_{exp} =$		77.44	===	Var.	≠

TABLA, XXIV, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	67.17	39.24	46.17	80.92
	S	2.0554	8.6657	11.4203	3.7363
FLUIDO	\bar{x}	53.50	31.39	40.61	91.21
	S	1.1936	2.1190	13.7873	1.9634
$C_{exp} =$		133.4	====	Var.	≠

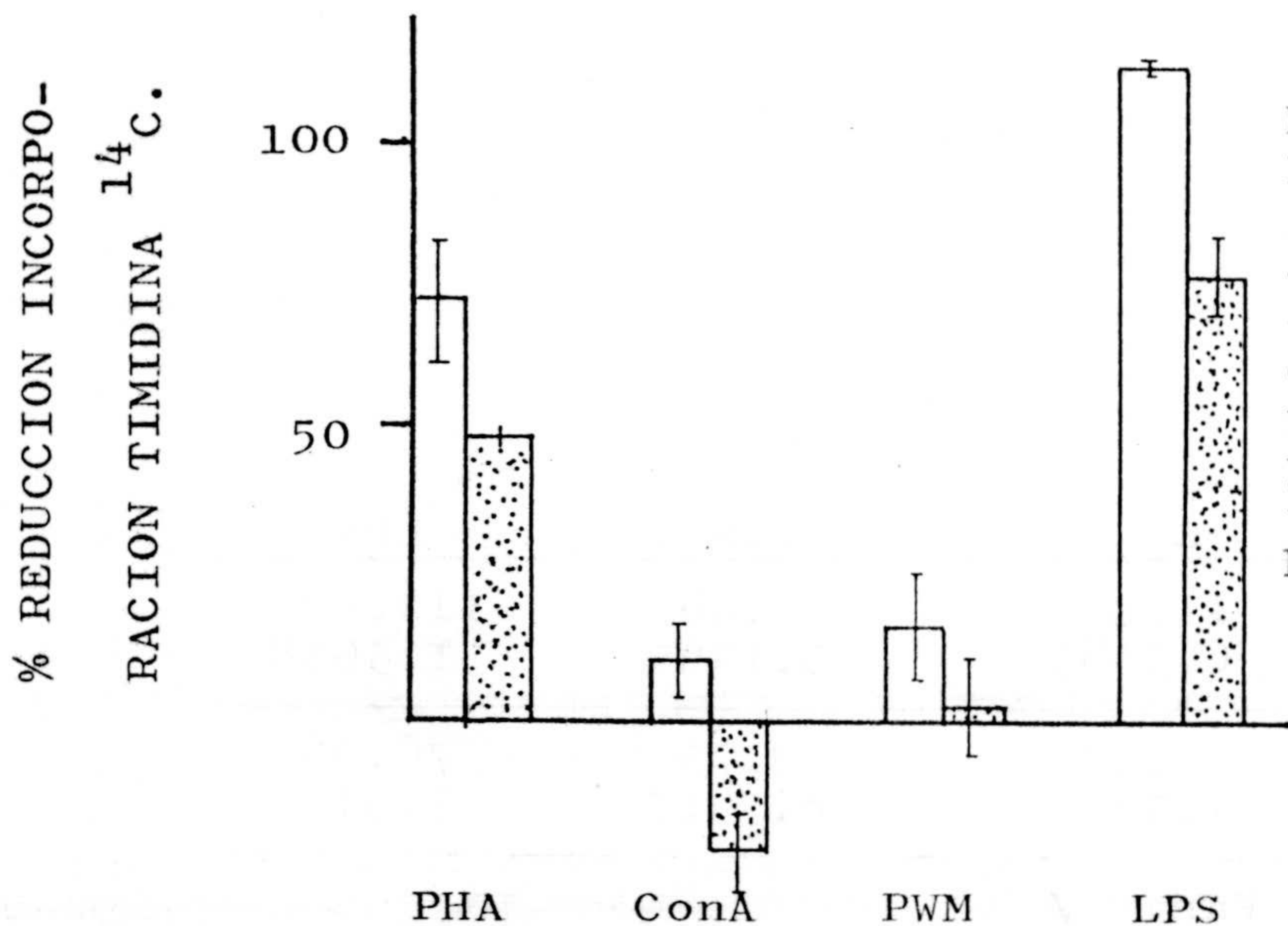


Fig. XXIII.b.
Porcentaje de reduccion incorporacion Timidina -¹⁴C- en esplenocitos de CBA, estimulados por distintos mitogenos en presencia de F.A. (▨) y Suero (□) de raton portador del Tumor METHA.

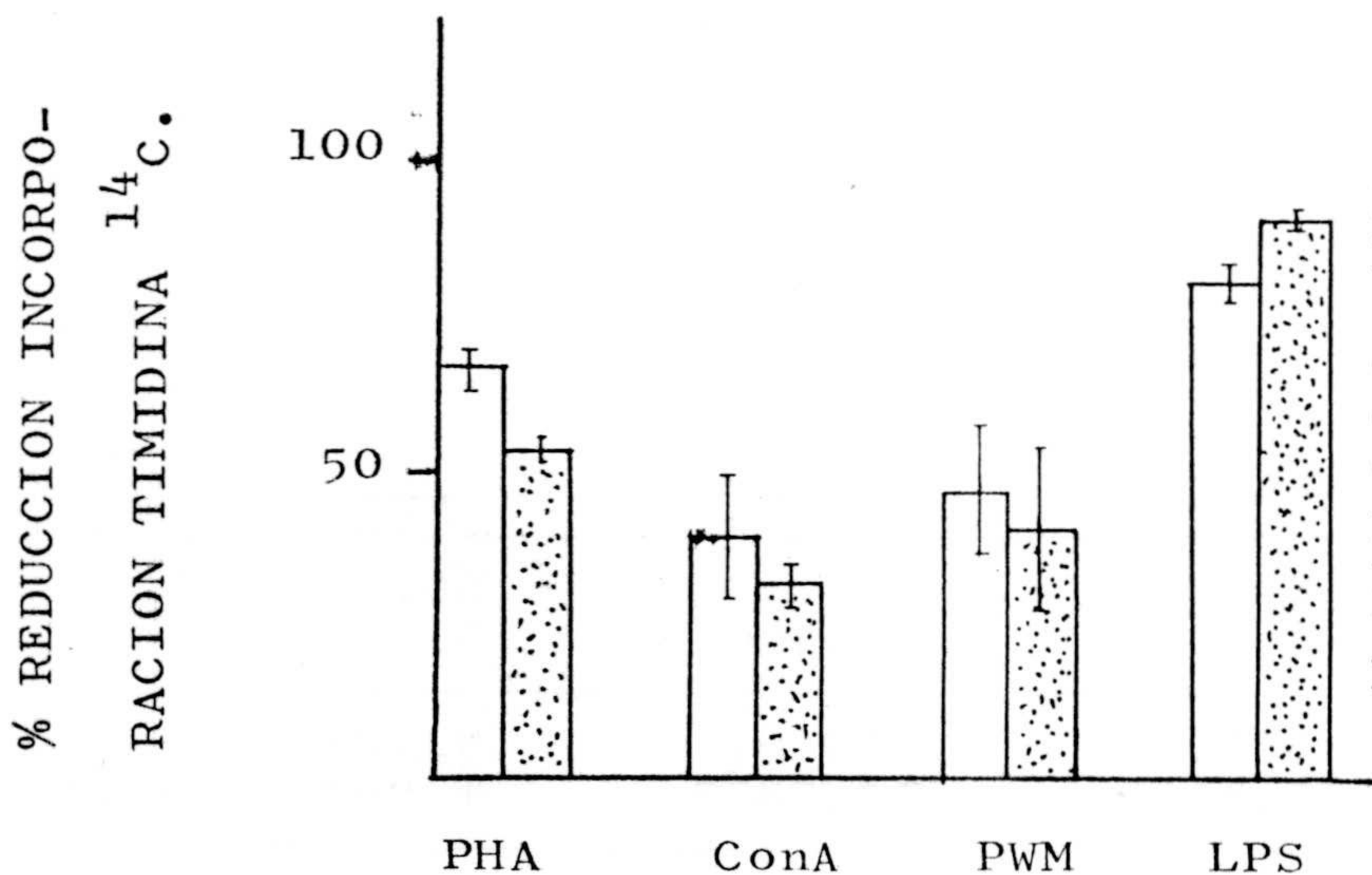


Fig. XXIV.b.
Porcentaje de reduccion incorporacion Timidina -¹⁴C- en esplenocitos de CBA, estimulados por distintos mitogenos en presencia de F.A. (▨) y Suero (□) de raton portador del Tumor P815X2.

TABLA XXV, b.- Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor: SL-2 (H-2^d)

	SUERO DE DBA/2 (H-2 ^d)					FLUIDO ASCITICO				
	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$
PHA	1134	2033	5718	\bar{x}_1 :		1134	1596	5718	\bar{x}_1 :	
	1186	2110	5830	5760		1186	1518	5830	5760	
	1348	2071	5845	4125.2		1348	1533	5845	4125.2	
	1876	1998	5723		\bar{x}_0 :		1876	1607		5723
	2630	2085	5684	1634.8		2630	1532	5684	1634.8	
ConA	2222	27260	24288	\bar{x}_1 :		2894	14456	14405	\bar{x}_1 :	
	4812	22354	22806	23422		2636	14353	14156	14247.4	
	3364	26543	23275	19784		3358	14236	14233	10748.8	
	2836	24375	22985		\bar{x}_0 :		5178	14736		13877
	4956	25016	23756	3638		3427	14977	14566	3498.6	
PWM	4962	10552	14260	\bar{x}_1 :		3543	6146	12312	\bar{x}_1 :	
	4551	12886	13792	14577.6		3729	6732	12792	13246.8	
	4327	10834	15016	9870		3613	7422	14260	9878.6	
	4683	11338	16313		\bar{x}_0 :		2815	6370		13962
	5015	10441	13507	4707.6		3141	7574	12908	3368.2	
LPS	3610	4540	27489	\bar{x}_1 :		558	824	12028	\bar{x}_1 :	
	6960	4152	32751	30321.2		599	808	10320	10582.4	
	7434	4231	27374	24612.4		375	744	11661	10065.8	
	5553	7612	32518		\bar{x}_0 :		615	913		10990
	4987	4556	31474	5708.8		436	837	9733	516.6	

TABLA XXVI, a - Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor:

		SUERO DE CBA (H-2 ^k)					GADNER (H-2 ^k) FLUIDO ASCITICO				
		x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$	x ₀	x	x ₁	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\frac{\bar{x}_1 - x}{\bar{x}_1 - \bar{x}_0}$
PHA		936	1012	4876	\bar{x}_1 :	94.79	936	1117	4876	\bar{x}_1 :	92.18
		692	1271	4488	4832.2	88.36	692	1580	4488	4832.2	80.69
		502	1642	5337	4030.2	79.16	502	1684	5337	4030.2	78.11
		994	1942	4873		\bar{x}_0 :	71.71	994	1483		4873
		886	1379	4587	802	85.68	886	1537	4587	802	81.76
ConA		2222	50386	24288	\bar{x}_1 :	-136.29	2222	10502	24288	\bar{x}_1 :	65.30
		4812	48723	22806	23422.	-127.88	4812	10345	22806	23422	66.10
		3364	49167	23275	19784	-130.13	3364	10448	23275	19784	65.58
		2836	51232	22985		\bar{x}_0 :	-140.57	2836	10777		22985
		4956	50615	23756	3638	-137.45	4956	10456	23756	3638	65.54
PWM		4962	16342	14260	\bar{x}_1 :	-17.88	4017	10232	17889	\bar{x}_1 :	62.10
		4551	13568	13792	14577.6	10.23	4213	14056	22432	19960	37.69
		4327	14663	15016	9870	-0.86	4119	11850	21645	15664.8	51.77
		4683	14745	16313		\bar{x}_0 :	-1.78	4617	11271		18821
		5015	13316	13507	4707.6	12.78	4510	12056	19013	4295.2	50.46
LPS		3610	5248	27489	\bar{x}_1 :	101.87	947	3006	12020	\bar{x}_1 :	81.32
		6960	3004	32751	30321.2	110.99	873	3872	12214	12211.6	73.67
		7434	2573	27374	24612.4	112.74	1015	2344	12318	11320.2	87.17
		5553	1636	32518		\bar{x}_0 :	116.55	989	2286		12034
		4987	2346	31474	5708.8	113.66	633	2364	12472	891.4	86.99

TABLA, XXV, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	89.71	-8.53	34.12	102.80
	S	1.0702	9.7288	10.1205	5.9339
FLUIDO	\bar{x}	101.88	-2.83	64.76	96.93
	S	0.9962	2.8046	6.3864	0.6029

$C_{exp} = 281,8 \quad ===== \quad Var. \neq$

TABLA, XXVI, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
SUERO	\bar{x}	83.94	-134.46	0.5139	111.16
	S	8.8417	5.2836	12.1447	5.5707
FLUIDO	\bar{x}	83.17	65.29	51.50	83.37
	S	5.3602	0.8226	8.9441	6.0085

$C_{exp} = 218 \quad ===== \quad Var. \neq$

% REDUCCION INCORPORACION
TIMIDINA ¹⁴C.

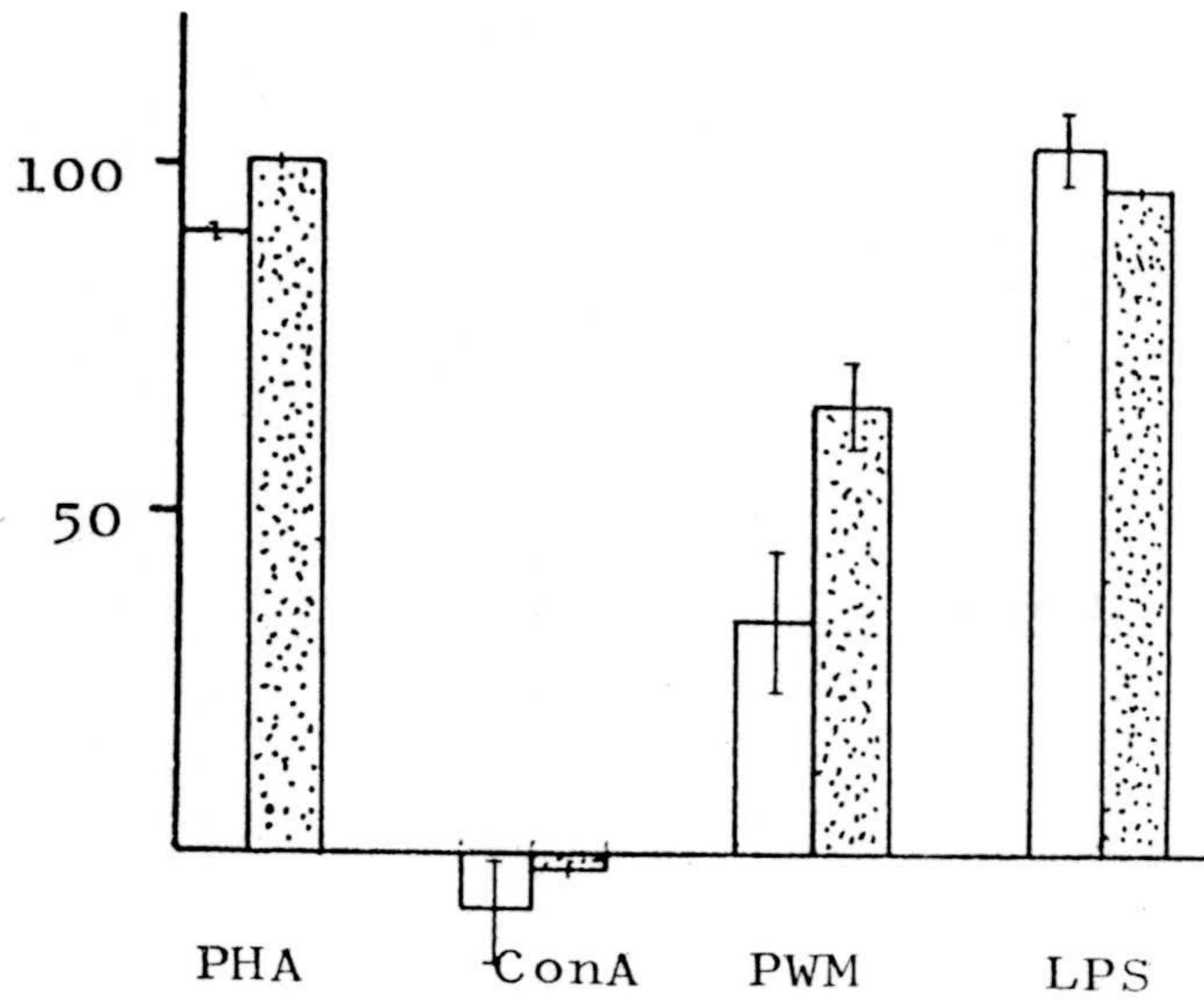


Fig. XXV.b.

Porciento de reducción
incorporación Timidina
-14C- en esplenocitos
de CBA, estimulados por
distintos mitógenos en
presencia de F.A. (▨))
y Suero (□) de ratón
portador del Tumor
SL-2.

% REDUCCION INCORPO-
RACION TIMIDINA ¹⁴C.

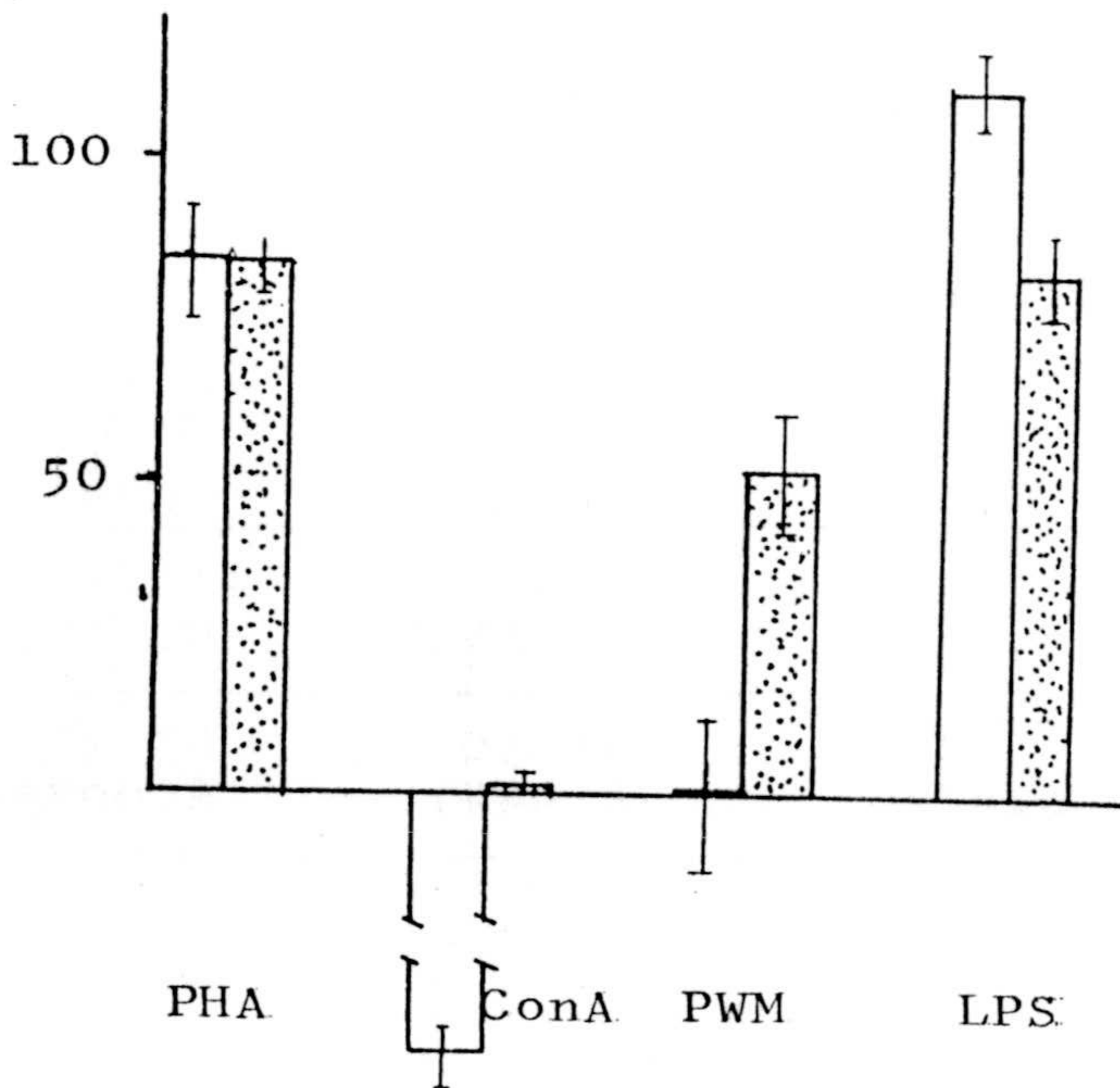


Fig. XXVI.b.

Porciento de reducción
incorporación Timidina
-14C- en esplenocitos
de CBA, estimulados por
distintos mitógenos en
presencia de F.A. (▨))
y Suero (□) de ratón
portador del Tumor
GADNER.

TABLAXXVII, a - Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor:

SUERO DE CBA						FLUIDO ASCITICO					
			$\bar{x}_1 - x$							$\bar{x}_1 - x$	
x_0	x	x_1	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	x_0	x	x_1	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	
PHA				$\bar{x}_1:$	1134	1152	5718	$\bar{x}_1:$		111.70	
					1186	1200	5830	5760		110.54	
					1348	1110	5845		4125.2	112.72	
				$\bar{x}_0:$	1876	1099	5723	$\bar{x}_0:$		112.99	
					2630	1118	5684	1634.8		112.53	
ConA				$\bar{x}_1:$	2894	7356	14405	$\bar{x}_1:$		64.11	
					2636	7771	14156	14247.4		60.25	
					3358	7264	14233		10748.8	64.97	
				$\bar{x}_0:$	5178	7363	13877	$\bar{x}_0:$		64.05	
					3427	6978	14566	3498.6		67.63	
PWM				$\bar{x}_1:$	4887	3422	16962	$\bar{x}_1:$		120.40	
					7131	2726	17215	15927.4		127.10	
					5643	3981	15578		10386.6	115.02	
				$\bar{x}_0:$	4910	4072	15550	$\bar{x}_0:$		114.14	
					5133	3133	14332	5540.8		123.18	
LPS				$\bar{x}_1:$	558	184	10208	$\bar{x}_1:$		103.30	
					599	286	10320	10582.4		102.29	
					375	444	11661		10065.8	100.72	
				$\bar{x}_0:$	615	279	10990	$\bar{x}_0:$		102.36	
					436	403	9733	516.6		101.13	

TABLAXXVIIIa - Respuesta de esplenocitos de CBA (H-2^k) estimulados con distintos mitógenos al tratamiento con suero de ratón portador y fluido ascítico del tumor:

MBL-2 (H-2^b)

		SUERO DE				<u>MBL-2</u> (H-2 ^b)				FLUIDO ASCITICO				
		x_0	x	x_1	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\bar{x}_1 - x$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	x_0	x	x_1	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	$\bar{x}_1 - x$	$\bar{x}_1 - \bar{x}_0$	
PHA	$\bar{x}_1 :$						1134	2217	5718	$\bar{x}_1 :$		85.89		
							1186	2343	5830	5760		82.83		
	$\bar{x}_0 :$						1348	2286	5845	4125.2		84.21		
							1876	2255	5723		$\bar{x}_0 :$		84.96	
							2630	2260	5684		1634.8		84.84	
ConA	$\bar{x}_1 :$						2222	20466	24288	$\bar{x}_1 :$		14.94		
							4812	19378	22806	23422		20.44		
	$\bar{x}_0 :$						3364	21767	23274	19784		8.36		
							2836	20189	22985		$\bar{x}_0 :$		16.34	
							4956	20080	23756		3638		16.89	
PWM	$\bar{x}_1 :$						2723	9820	11414	$\bar{x}_1 :$		14.04		
							2451	8758	10578	10996.4		26.72		
	$\bar{x}_0 :$						2987	9448	10550	8375.4		18.49		
							2426	9506	11820		$\bar{x}_0 :$		17.79	
							2518	8437	10620		2621		30.56	
LPS	$\bar{x}_1 :$						947	3324	12020	$\bar{x}_1 :$		78.51		
							873	1846	12214	122116		91.57		
	$\bar{x}_0 :$						1015	3268	12318	113202		79.00		
							989	3692	12034		$\bar{x}_0 :$		75.26	
							633	2842	12472		891.4		82.77	

TABLA, XXVII, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
FLUIDO	\bar{x}	112.096	64.20	119.968	101.96
	S	0.9943	2.6453	5.4730	1.0357

$C_{exp} = 30.3$ ===== Var. \neq

TABLA, XXVIII, b.

n = 5		PHA	ConA	PWM	LPS
FLUIDO	\bar{x}	84,55	15.39	21.52	81.42
	S	1.1315	4.4237	6.8521	6.2672

$C_{exp} = 36.7$ ===== Var. \neq

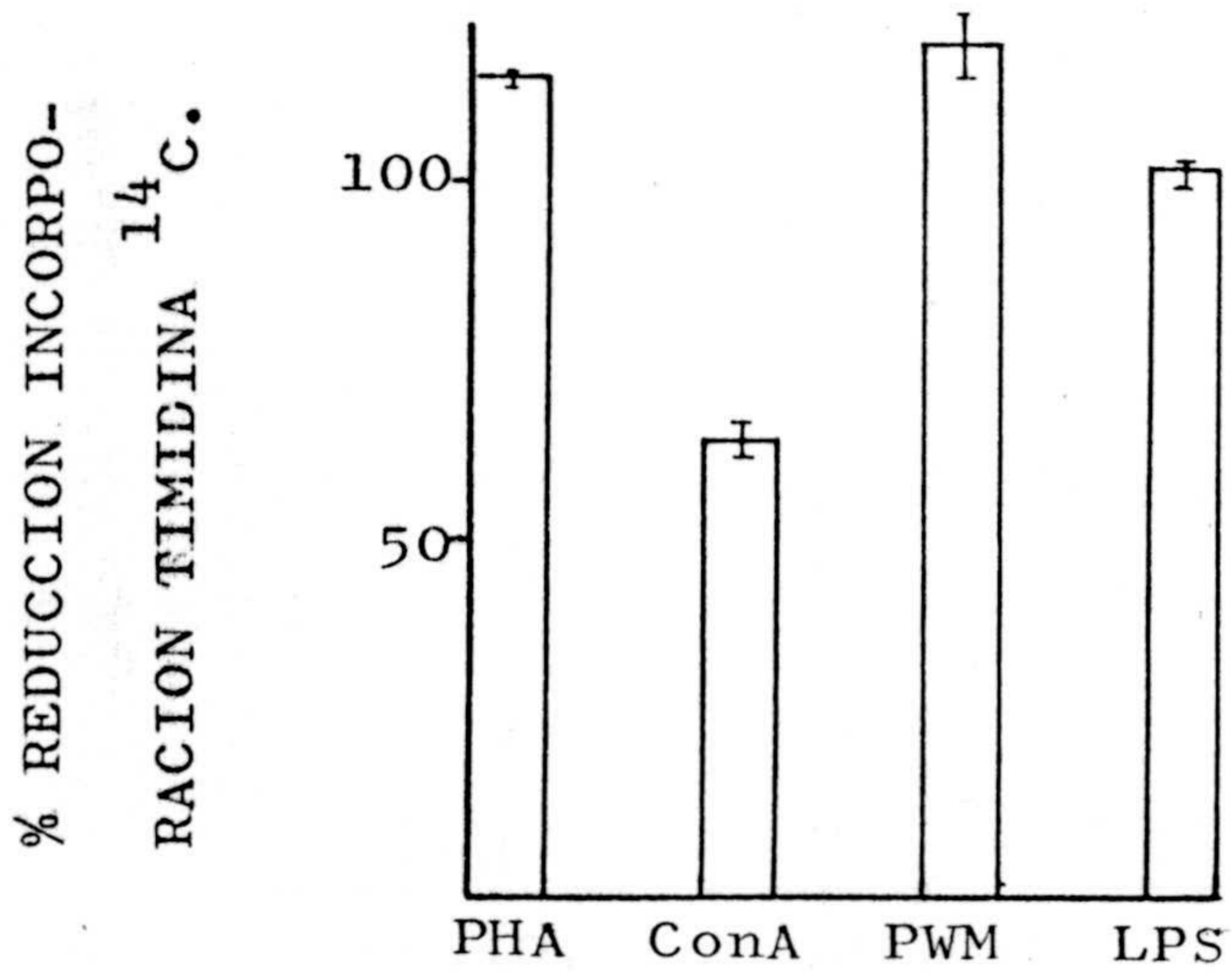


Fig. XXVII.b.

Porcentaje de reducción de incorporación Timidina -¹⁴C- en esplenocitos de CBA, estimulados por distintos mitógenos en presencia de F.A. de ratón portador del Tumor TLC5.

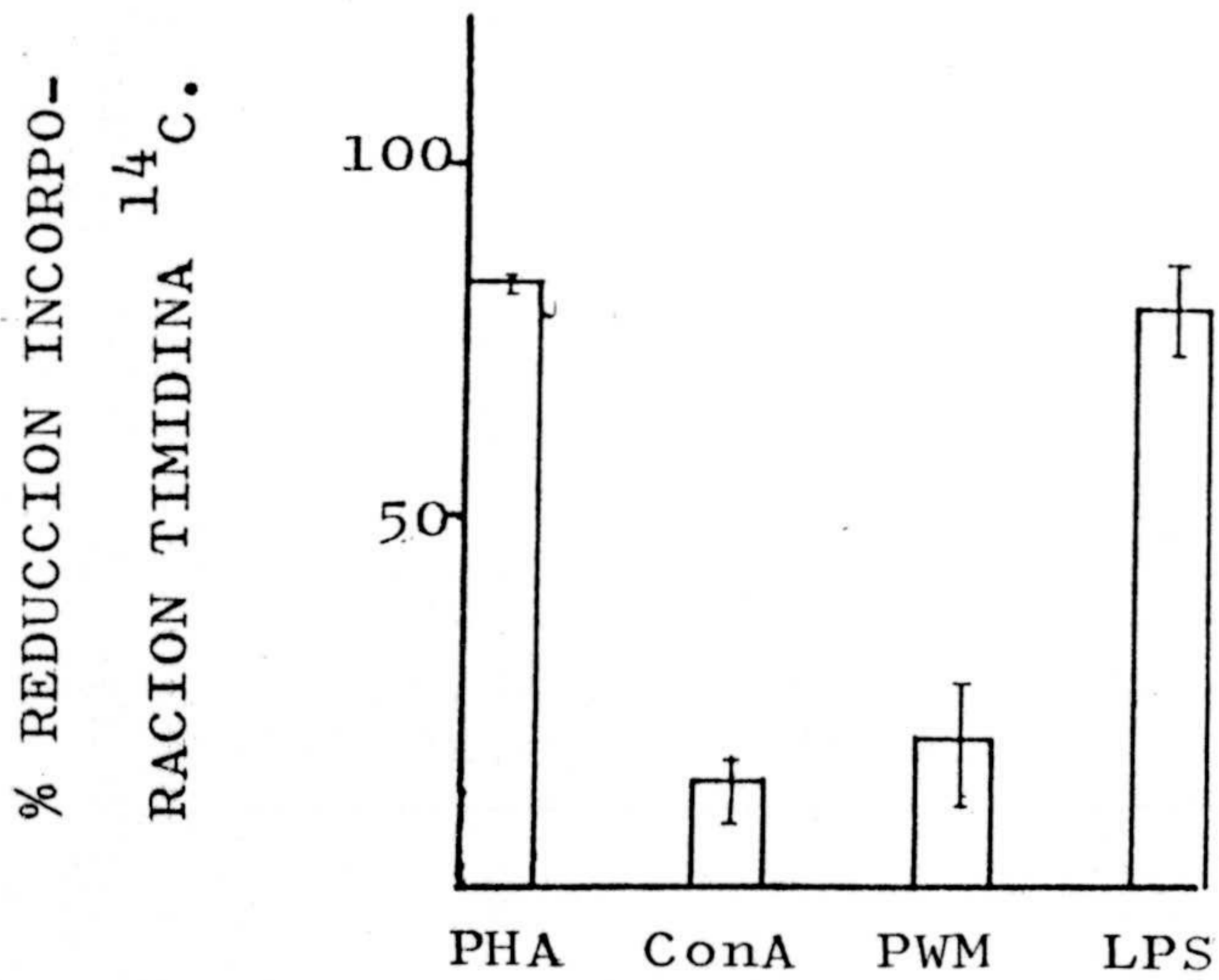


Fig. XXVIII.b.

Porcentaje de reducción de incorporación Timidina -¹⁴C- en esplenocitos de CBA, estimulados por distintos mitógenos en presencia de F.A. de ratón portador del Tumor MBL-2.

en cada combinación Mitógeno-Fluido o Suero; las medias y desviaciones típicas de cada una de las casillas, se indican en las Tablas XIII.b a XXVIII.b y gráficas con la misma numeración (XIII.b a XXVIII.b).

El primer paso conveniente a realizar, es la comprobación de la homogeneidad o heterogeneidad de las varianzas, con el fin de realizar el análisis mediante comparaciones de medias, si son heterogéneas, o mediante un análisis de la varianza doble en caso contrario. En las 14 primeras tablas, los grados de libertad son 4 y el número de varianzas comparadas 8, por lo que el nivel crítico, al 10% de error, sería $C_{0.10} = 25.6$. En las dos últimas, con 4 grados de libertad y con 4 varianzas comparadas, la $C_{0.10} = 13.9$. En este estudio, se observa la desigualdad de las varianzas, desigualdad no estabilizable por alguna de las transformaciones ya indicadas.

Utilizaremos por tanto los métodos de comparación de dos medias.

IV.a.- Comparación Fluido-Suero.

En la Tabla XXIX, se expresan los resultados obtenidos al comparar los porcentajes medios de inhibición en fluidos y sueros para cada mitógeno y para cada una de las Tablas XIIIb a XXVIb, puesto que en las XXVIIb y XXVIIIb no se presentan datos para el suero. En dicha Tabla XXIX, el signo \downarrow significa que el suero inhibe mas que el Fluido; el signo $-$ indica que el suero inhibe menos que el Fluido; el signo $=$ significa que ambos poseen un efecto semejante; la palabra NO, indica que ninguno de los dos inhibe significativamente; y el símbolo $(-)$ ó (\downarrow) ó $(=)$ alude al comportamiento relativo de ambos con respecto a los criterios arriba expuestos (se sobreentiende que la no inhibición significativa quiere decir que el % no es significativamente superior al 0%, lo cual se realiza por el test para una media indicado en los métodos Estadísticos).

TABLA	TUMOR	PHA	ConA	PWM	LPS
XIII, b.	EAKR	↓	↓	-	↓
XIV, b.	E ⁰ K1	↓	↓	↓	↓
XV, b.	GID-IV	↓	-	-	↓
XVI, b.	EL-4	-	-	-	↓
XVII, b.	MCG3	↓	↓	↓	↓
XVIII, b.	TLX9	↓	↓	-	↓
XIX, b.	L1210	↓	-	-	=
XX, b.	LSTRA	-	NO(-)	-	↓
XXI, b.	L5178YE	-	-	-	↓
XXII, b.	MCG4	-	-	↓	=
XXIII, b.	METHA	↓	↓	↓	↓
XXIV, b.	P815X2	↓	=	=	-
XXV, b.	SL-2	-	NO(=)	-	=
XXVI, b.	GADNER	=	-	-	↓

TABLA. XXIX. Estudio comparado del efecto inhibitorio, sobre esplenocitos de ratón estimulados con mitógenos policlonales, de Fluidos Ascíticos y Sueros de ratones portadores de Tumor.

(↓ : indica que el Suero inhibe mas que el Fluido.

- : indica que el Fluido inhibe mas que el Suero.

= : indica que ambos inhiben igual.

NO : indica no inhibición significativa. Y seguido de paréntesis, indica entre el Fluido y el suero cual se comporta menos mal como inhibidor).

IV.b. Comparación del efecto de cada uno de los Sueros de ratones portadores de tumor sobre esplenocitos de CBA estimulados por distintos mitógenos.

Los resultados de esta comparación vienen indicados en la Tabla XXX. En ella, los mitógenos se han ordenado de acuerdo con la mayor o menor inhibición producida, sobre esplenocitos de ratón estimulados con ellos, por cada uno de los sueros utilizados.

De acuerdo con esta comparación, podemos concluir:

a) El 100% de los sueros obtenidos inducen una inhibición superior al 45% sobre esplenocitos de CBA estimulados con LPS.

b) El 86% de los sueros obtenidos inducen una inhibición superior al 45% sobre esplenocitos de CBA estimulados con PHA.

c) El 86% de los sueros obtenidos inducen una inhibición inferior al 45% sobre esplenocitos de CBA estimulados con PWM.

d) El 86% de los sueros obtenidos inducen una inhibición inferior al 45% sobre esplenocitos de CBA estimulados con ConA.

TABLA	TUMOR	1º	2º	3º	4º
XIII.b.	EAKR	LPS ^{.....}	PHA ^{.....}	ConA [°]	PWM [*]
XIV.b	E ⁰ K1	LPS ^{.....}	PHA ^{.....}	PWM [°]	ConA [°]
XV.b	GIL IV	LPS ^{.....}	PHA ^{.....}	PWM [*]	ConA [*]
XVI.b	EL-4	LPS ^{.....}	PHA ^{.....}	ConA ^{°°}	PWM [°]
XVII.b	MCG3	LPS ^{.....} = PHA ^{.....}		ConA [°]	PWM [*]
XVIII.b	TLX9	PHA ^{.....}	LPS ^{.....}	ConA ^{°°}	PWM [*]
XIX.b	L1210	PHA ^{.....}	LPS ^{.....}	ConA [°] = PWM [*]	
XX.b	LSTRA	LPS ^{.....}	PWM ^{.....}	PHA [°]	ConA [*]
XXI.b	L5178YE	LPS ^{.....}	PHA ^{°°}	PWM [°]	ConA [°]
XXII.b	MCG4	LPS ^{.....}	PWM ^{.....}	ConA [*]	PHA [*]
XXIII.b	METHA	LPS ^{.....}	PHA ^{°°°}	PWM [°] = ConA [°]	
XXIV.b	P815X2	LPS ^{°°°}	PHA ^{°°°}	PWM [°] = ConA [°]	
XXV.b	SL-2	LPS ^{.....}	PHA ^{.....}	PWM [°]	ConA [*]
XXVI.b	GADNER	LPS ^{.....}	PHA ^{.....}	PWM [*]	ConA [*]

TABLA XXX. Para cada tumor, comparación del efecto inhibitorio producido por el suero de ratones portadores del mismo sobre linfocitos de CBA estimulados con distintos mitógenos. Los números (1º, 2º, 3º y 4º) de la parte superior de la Tabla sirven para ordenar los mitógenos.

X^{*}: inhibición no significativamente > 0

X[°]: inhibición inferior al 45%

X^{°°}: inhibición entre un 46% y 60%

X^{°°°}: inhibición entre 61% y 80%.

X^{°°°°}: inhibición superior al 81%.

C IV.d. Comparación global del efecto de sueros y fluidos de ratones portadores de tumor sobre células estimuladas con distintos mitógenos.

Los resultados obtenidos, se han comparado globalmente. De acuerdo con este estudio comparativo, se ha construido la Tabla XXXI, en la que se han ordenado los mitógenos de acuerdo con la inhibición observada al adicionar los distintos fluidos ascíticos (F) ó sueros (S) de ratones portadores de tumores ascíticos, a células linfoides de ratones CBA y tratadas con ellos a las dosis óptimas.

En cada casilla, se ha indicado el mitógeno utilizado (LPS, PWM, ConA, PHA), y la inhibición observada (X^{****}: inhibición superior al 81%; X^{***}: inhibición comprendida entre 61% y 80%.) al adicionar suero (S) ó Fluido Ascítico (F).

Se deduce de esta comparación, que las inhibiciones superiores al 61%, se observan, al adicionar a células linfoides de ratones CBA en presencia de LPS ó PHA, suero o fluido ascítico de ratones portadores de tumores ascíticos.

TABLA	TUMOR	1º	2º	3º
XIII.b	EAKR	LPS(S)***	PHA(S)****	LPS(F)****
XIV.b	E ^Q K1	LPS(S)***	PHA(S)****	LPS(F)****
XV.b	GIL IV	LPS(S)***	PHA(S)****	ConA(F)***
XVI.b	EL-4	LPS(S)***	PHA(F)****	PHA(S)****
XVII.b	MCG3	PHA(S)***=LPS(S)****		LPS(F)**
XVIII.b	TLX9	PHA(S)***	PHA(F)****	LPS(F)=LPS(S)
XIX.b	L1210	PHA(S)***	LPS(S)****	LPS(F)****
XX.b	LSTRA	PWM(F)***	LPS(S)****	LPS(F)****
XXI.b	L5178YE	LPS(S)***	PHA(F)****	LPS(F)***
XXII.b	MCG4	LPS(S)***=LPS(F)****		PHA(F)****
XXIII.b	METHA	LPS(S)***	LPS(F)*** = PHA(S)***	
XXIV.b	P815X2	LPS(F)***	LPS(S)****	PHA(S)***
XXV.b	SL-2	LPS(S)***	PHA(F)****	LPS(F)****
XXVI.b	GADNER	LPS(S)***	PHA(S)****	PHA(F)****

TABLA XXXI. Comparación global del efecto de sueros y fluidos ascíticos de ratones portadores de tumor sobre células linfoides de CBA, estimuladas con distintos mitógenos.

(S): suero de ratón portador del tumor indicado en la misma fila.

(F): Fluido ascítico de ratón portador del tumor indicado en la misma fila.

(X****): inhibición del TTL superior al 81%.

(X***): inhibición del TTL comprendida entre el 61 y el 80%.

DISCUSSION

DISCUSION

Los cultivos de células en el laboratorio, representan un método adecuado para el estudio y valoración de numerosas funciones celulares. Dichas técnicas, se encuentran muy desarrolladas actualmente, por los grandes avances experimentados en otros campos y aplicados en estas técnicas. Entre esos avances, hay que citar, la producción industrial de medios de cultivo con unas características muy similares al medio en el que se desarrollan las células "in vivo", el uso de soluciones tampón para mantener los cultivos a un pH fisiológico, la existencia en el mercado de estufas de cultivo en las que se puede regular la mezcla gaseosa utilizada por las células, y sobre todo la existencia de antibióticos de amplio espectro para mantener el cultivo en condiciones de esterilidad durante semanas.

Tal como se indicaba en el Objeto de esta tesis, se pretendía estudiar la existencia o no de factores tanto locales (fluidos ascíticos de tumores) como sistémicos (sueros ascíticos de ratones portadores de tumor), que tuviesen una determinada influencia sobre la respuesta celular de un organismo frente a un estímulo antigénicos.

Como índice de la respuesta inmunológica celular, se estudió la capacidad de transformarse que poseen las células linfoides de ratón, cuando se cultivan con dosis óptimas de diversos mitógenos, y durante un periodo adecuado (STOUT y HERZENBERG., 1975). La respuesta a un determinado mitógeno, depende de la cepa de ratón empleada (LIACOPOULOS y col., 1979).

De acuerdo con esto, en primer lugar se buscó cual era la dosis óptima de cada mitógeno de los utilizados (PHA, ConA, PWM y LPS), así como la cepa que manifestaba una mayor respuesta a estos mitógenos.

Para el mitógeno ConA, las concentraciones encontradas, que inducen máxima transformación blástica son 6,25 $\mu\text{g/ml}$ para células linfoides de las cepas CBA y B10A, y 12,5 $\mu\text{g/ml}$ para células linfoides de la cepa BALB/c (Tablas V,a y V,b). Los porcentajes de estimulación obtenidos para estas dosis son: 1322 ± 192.39 para CBA, 1309 ± 10.47 para B10A y 456.89 ± 21.24 para BALB/c. Resultados similares a estos han sido descritos por otros autores (PRIMI y col., 1979; GUPTA.,1979; WILSON y LITTLE.1979).

La utilización de distintas concentraciones del mitógeno PWM, nos ha permitido definir las concentraciones del mismo que inducen una máxima transformación blástica en las células linfoides de las cepas de ratón empleadas: 6,25 $\mu\text{g/ml}$ para las células linfoides de las cepas CBA y BALB/c y 25 $\mu\text{g/ml}$ para las células linfoides de la cepa B10A. Estas concentraciones son similares a las utilizadas por otros autores (COOPER y col.,1979). Para estas dosis, los índices de transformación observados fueron:

556 \pm 30.09 para CBA, 277.38 \pm 17.78 para B10A y 517.62 \pm 15.45 para BALB/c (Tablas VI,a y VI,b).

Con el mitógeno LPS, se encontró que las concentraciones que inducen una máxima transformación blástica de las células linfoides eran: 31,2 μ g/ml para las células linfoides de la cepa CBA, 15,6 μ g/ml para las células linfoides de la cepa B10A y 7,8 μ g/ml para las células linfoides de la cepa BALB/c. Concentraciones similares a las nuestras, han sido previamente descritas (SITIA y col.,1979) (SENKER y GRAY.,1979). Los porcentajes de estimulación encontrados para estas dosis son: 517.03 \pm 35.14 para CBA, 1060.68 \pm 80.98 para B10A y 7.89 \pm 11.08 para BALB/c. (Tablas VII,a y VII,b).

Por último, utilizando diversas diluciones del mitógeno PHA, se ha comprobado que la concentración del mismo que inducía máxima transformación blástica en las células linfoides de las cepas CBA, B10D2, B10 y B10A era

en todos los casos, de 28,12 ug/ml. Valores similares han sido descritos por YACHNIN y LESTER.,1976; AMLOT y UNGER., 1976; LEE y LUCAS.,1979. (Tablas VIII,a yVIII,b). Con esta dosis se han obtenido unos porcentajes de estimulación de 314.92 66.38 para la cepa CBA, 155.79 33.47 para la cepa B10A y 380.87 47.55 para la cepa B10.

Posteriormente con objeto de elegir la cepa que presentase una máxima transformación blástica al tratamiento con mitógenos, se realizó una comparación de medias entre los resultados obtenidos para las dosis óptimas de mitógenos en cada una de las cepas. En todos los casos se utilizó el criterio de un error igual o inferior al 10%, para decidir si dos mitógenos o dos cepas son distintos.

De esta forma encontramos, que con el mitógeno ConA, las cepas que tienen mejor respuesta son la CBA y B10A, sin que existan diferencias significativas entre ellas ($t_{exp}=0.14$) (Tabla X.b). Asimismo, el mitógeno

PWM, indujo una mejor transformación en las cepas CBA y BALB/c (Tabla X,b). Con el mitógeno LPS, también fue la cepa CBA la que mejor respuesta blastogénica tenía.

Por último, para el mitógeno PHA, las cepas que mejor responden al mismo, son CBA y B10A, sin que existan diferencias significativas entre ellas ($t_{exp} = 1.80$), (Tabla X,b).

De acuerdo con el análisis estadístico de todos estos datos, se ha seleccionado la cepa CBA, como la que globalmente responde transformándose blásticamente de una forma óptima frente a los cuatro mitógenos utilizados.

En el presente trabajo, tal como se ha descrito en material y métodos, no se ha trabajado con poblaciones purificadas de células, ya que en la respuesta a uno u otro de los mitógenos, van a estar implicadas distintas subpoblaciones celulares. Subpoblaciones, que en un esquema para explicar las respuestas celulares a mitógenos, aloantíge-

nos, antígenos tumorales o los mismos antígenos alterados, (SMITH y col., 1979) serían básicamente cuatro. En principio cualquiera de los estímulos citados, activaría tres subpoblaciones de linfocitos T (células T maduras, células T precursoras de las células productoras de interleuquina-2 y células T precursoras de las células que responden a Interleuquina-2), las células T "maduras", en presencia del estímulo, darían lugar a células T "activadas", que interaccionarían con los macrófagos, produciendo estos Interleuquina-1, factor soluble que actuaría sobre las células T productoras de Interleuquina-2 (posiblemente células T_H), la interleuquina producida por esas células T, actuaría sobre la tercera población celular citada, transformándose en las células T efectoras de la respuesta ante el estímulo inicial. Otras cooperaciones de diverso tipo entre distintas subpoblaciones celulares han sido citadas en los últimos años (BACH y col., 1979; BENACERRAF y UNANUE., 1979; RESCH., 1979; EARDLEY y col., 1978; WETTSTEIN y col., 1978; SWAIN y PANFILLI., 1979;).

En estas células linfoides no purificadas, se analizó, utilizando distintas diluciones de fluido ascítico, la capacidad inhibidora del mismo tras el estímulo con el mitógeno PHA. Empleando para ello inicialmente fluidos ascíticos de dos lotes de ratones portadores de los tumores EOK1 y GIL IV.

El posible efecto inhibidor del fluido ascítico obtenido de ratones portadores del tumor ascítico EOK1, fue analizado, de acuerdo con su efecto sobre células linfoides de ratones de las cepas B10, B10A, B10D2 y B10HTT. De acuerdo con los porcentajes de inhibición obtenidos (Tabla XI) y tras su análisis estadístico, se aprecia una inhibición de la transformación superior al 85%, independientemente de las cepas utilizadas como células diana. Esta inhibición se consigue cuando se utiliza la dilución de Fluido ascítico designada como 1/1, no apreciándose por tanto, ninguna influencia del haplotipo de las células diana en el efecto inhibitorio de este fluido.

De forma similar, se analizó el posible efecto inhibidor del fluido ascítico de ratones C57BL/6 portadores del tumor GIL-IV sobre células linfoides de ratón de las cepas B10, B10D2 y C57BL/6. El análisis estadístico de los porcentajes de inhibición observados (Tabla XIIa), nos permite afirmar, que en todos los casos, e independientemente de la cepa de ratón utilizada como diana, el porcentaje de inhibición obtenido para la dilución de fluido ascítico designada por 1/1, es superior al 85%.

El posterior estudio sistemático del efecto de fluidos ascíticos y sueros de ratones portadores de tumor sobre células linfoides de CBA, estimuladas por distintos mitógenos, apartado IV, ha permitido determinar, el distinto efecto de aquellos sobre la acción mitogénica.

De esta forma, cuando se empleó la ConA, comprobamos que tanto el suero como los fluidos ascíticos de los ratones portadores de los distintos tumores utilizados, no

ejercían efecto inhibitor sobre la transformación blástica inducida por ella. Hay que pensar que en este caso, la unión ConA-Receptor de ConA en la superficie celular y la posterior elaboración de la señal inducida por esta unión tienen efecto sin que exista modificación de ambos sucesos por la presencia de factores solubles. Es evidente que el conocimiento de las estructuras de la superficie celular receptoras de la ConA, nos sería de gran utilidad en el presente estudio, pero de estas estructuras solo conocemos que, son glicoproteínas de membrana con restos de alfa-metilmanopiranosido (O'BRIEN y col., 1979) de distinta estructura que las moléculas glicoproteicas receptoras de la PHA, siendo además posibles que distintas dianas estimuladas con el mismo mitógeno, posean receptores diferentes para éste. Siendo necesaria la presencia de antígenos Ia para que la respuesta a ConA sea normal. Por ello, y considerando que los antígenos codificados por el MHC y los antígenos Ia poseen naturaleza glicoproteica, las estructuras que reconocen éste o los otros mitógenos serán

similares a las que reconocen cualquier otro tipo de antígeno(THOMAS y col., 1977).

Aunque el aislamiento e identificación total del receptor de membrana para la ConA, no se ha realizado, sí parece que en la respuesta a este mitógeno por parte de las células linfoides de ratón, están implicadas dos subpoblaciones celulares: células T de fenotipo $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$ (McKENZIE y PORTER.,1979; JANDINSKI y col., 1976) y células T de fenotipo $Ly-1^{+}2^{-}3^{-}5^{+}6^{+}$ (NIEDERHUBER y col., 1976), siendo ambas poblaciones Fc^{+} (STOUT y HERZENBERG.,1975a) e Ia^{-} , aunque para su transformación por mitógenos necesitan una población de células Ia^{+} (macrófagos)(HABU y col.,1979).

La aparente ausencia de efecto de los sueros y fluidos ascíticos de ratones, sobre células linfoides murinas estimuladas por Concanavalina A, se debería, bien a que en fluidos y sueros no exista ningún tipo de factor soluble con actividad sobre las células linfoides con receptores para la ConA, o que en fluidos y sueros exista (n)

algún factor o factores solubles con un efecto activador de la misma población celular susceptible al tratamiento con ConA, o con un efecto inhibitor sobre subpoblaciones celulares diferentes. Ambas posibilidades, producirían el mismo efecto observado, la no inhibición de las células linfoides de ratón estimuladas por ConA.

Una ausencia de efecto similar, ha sido descrita para la alfa-fetoproteína sobre células linfoides estimuladas por ConA (MURGITA y col., 1978).

El empleo de otro mitógeno, PHA, nos mostró resultados diferentes. En este caso, fluidos y sueros ascíticos de ratones portadores de tumor, manifestaron un potente efecto inhibitor de la transformación blástica de células linfoides de ratón CBA virgen, tratadas con el mitógeno citado. Es evidente, que en esta ocasión, la unión PHA-Receptor de membrana, y la posterior elaboración de la señal mitogénica inducida por esta unión, son interferidas por la presencia de factor o factores solubles presentes tanto en los sueros como en los fluidos ascíticos.

Un efecto inhibitor de la transformación de células linfoides tratadas con PHA, ha sido descrito, en el suero de pacientes con hepatitis aguda y/o crónica (BARTTIG y BERG., 1976), para la alfa-fetoproteína aislada de hepatomas (MURGITA y col., 1978), en el suero de mujeres embarazadas (FIGUEREDO y col., 1979), en el suero de pacientes con enfermedad de Hodgkin (AMLLOT y UNGER., 1976) y en otros sistemas.

Se sabe, por otra parte, que las moléculas receptoras de la PHA, son glicoproteínas de superficie con numerosos restos de N-acetil-galactosamina, aunque tampoco han sido aisladas e identificadas. Sí se conoce que son estructuras diferentes a las que se unen a ConA, no siendo necesaria la presencia de los antígenos Ia para que la respuesta a PHA se realice normalmente. Lo que sí parece claro, es que las células diana de la PHA, son células de fenotipo $Ly-1^+ 2^+ 3^+ 5^+ 6^+$ (NIEDERHUBER y col., 1976) tanto las Fc^+ como las Fc^- (STOUT y HERZENBERG., 1975),

y que básicamente corresponden a las células T precursoras de los otros tipos, aunque se han descrito otras funciones desempeñadas por estas células: colaboradoras de la síntesis de anticuerpos (Swain y Panfilli.,1979), células proliferativas(WETTSTEIN y col.,1978) y amplificadoras de la citotoxicidad(CANTOR y BOYSE.,1976). Lo que permite su poner un importante papel en el desencadenamiento de la activación celular en respuesta a antígenos timodependientes para esta subpoblación celular.

El efecto inhibidor, detectado en los sueros y fluidos ascíticos de ratones portadores de tumor, se explicaría, bien por la unión de factores solubles presentes en el mismo a las mismas células diana de la PHA, impidiendo su transformación directamente o por activación de las células T "feedback" que impedirían la diferenciación de las células T y su proliferación. Por último, esta ausencia de proliferación en respuesta a PHA, podría ser ocasionada por una subpoblación de células T (T_S) activada por el factor o factores solubles presentes en los fluidos

estudiados.

El empleo de otros dos mitógenos policlonales, confirman estas posibilidades indicadas. Concretamente, las células linfoides de ratones CBA normales, no proliferaron en presencia de LPS, cuando en el medio existía suero o fluido ascítico de ratones portadores de tumor; y aunque no se conocen los receptores de este mitógeno en las células B, sí se sabe que en su presencia las células B se diferencian en células plasmáticas produciendo anticuerpos activamente. La falta de proliferación se debería a que las células con receptores para LPS fuesen inactivadas por factores solubles presentes en los sueros y fluidos ascíticos directamente, o que esos factores solubles activaran la población celular de fenotipo igual a la que responde a ConA, dando lugar a células T supresoras de la síntesis de anticuerpos bloqueando la diferenciación de las células B en células plasmáticas. El efecto final observado sería el mismo, ausencia de proliferación en res



puesta a LPS. No existiendo inhibiciones similares cuando las células linfoides de ratones CBA vírgenes, en presencia de sueros o fluidos ascíticos de ratones portadores de tumor son estimulados con el mitógeno PWM. Dado que las células que responden a PWM, pertenecen a subpoblaciones de las series T y B, las inhibiciones observadas en algunos casos, podrían explicarse pensando que estos factores solubles, actuarían sobre una población de células B, impidiendo su transformación, mientras que la población de células T que responden a PWM (al parecer la misma que responde a Con'A, se transformaría sin ser afectada por la presencia de sueros o fluidos ascíticos de ratones portadores de tumor considerados.

- 3 7 0 -

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La cepa de ratones CBA (H-2^k), es la que presenta una mejor respuesta global a los mitógenos PHA, ConA, PWM y LPS.
- 2.- Se han detectado funciones inhibitoras diferenciales del TTL, en sueros y fluidos ascíticos de ratones portadores de tumor.
 - 2.1.- La inhibición es similar en sueros y fluidos ascíticos.
- 3.- No existe correlación entre el fenotipo y origen del tumor con la inhibición observada en los sueros y fluidos ascíticos sobre células linfoides de ratones normales.

4.- Las dosis óptimas de los mitógenos empleados son:

4.1.- Para PHA: 28.12 $\mu\text{g/ml}$

4.2.- Para ConA: 6.25 $\mu\text{g/ml}$

4.3.- Para PWM: 6.25 $\mu\text{g/ml}$

4.4.- Para LPS: 31.2 $\mu\text{g/ml}$

5.- Existen una serie de factores en los fluidos ascíticos y sueros de ratones portadores de tumor que inhiben la transformación linfoblástica inducida por PHA.

Este hecho, induce a pensar que existe un fracaso inmunológico frente al tumor debido a que dichos factores podrían:

5.1.- Inhibir la diferenciación de células precursoras en células citotóxicas directamente.

5.2.- Que activasen una población de células T feedback.

5.3.- Activación de otras subpoblaciones de células T supresoras.

5.4.- Que estos efectos fuesen simultáneos.

- 6.- No se observa inhibición de la estimulación inducida por ConA, por los fluidos y sueros de ratones portadores de tumores.
- 7.- No se observa inhibición por parte de los fluidos ascíticos y sueros, de la estimulación linfoblástica inducida por PWM.
- 8.- Cuando se induce la transformación linfoblástica con el mitógeno LPS, sí existe inhibición por parte de los fluidos ascíticos y sueros.

Esta inhibición se debería a:

- 8.1.- Un efecto directo sobre las células dianas del mitógeno LPS, inhibiendo su diferenciación a células plasmáticas.
- 8.2.- La activación de una subpoblación de células T supresoras de la síntesis de anticuerpos que inhibiría a su vez, la diferenciación a células plasmáticas.

BIBLIOGRAFIA

AHMANN, G.B., BIRNKRANT, A., PETTINELLI, C.B., NADLER, P., SACHS, D.H., and HODES, R.J. (1979). The role of Ia-Bearing accessory cells in T cell-mediated and T cell-dependent responses. *The Molecular Basis of Immune cell function* (J.G.Kaplan, ed.) Biomedical Press, Elsevier NorthHolland Publishers. Amsterdam. p.538-541.

ALEMAN, P (1978). Determinación de los parámetros que influyen en el cultivo de linfocitos periféricos humanos es estimulados con PHA, aplicación en individuos normales y cancerosos. Labor. 65, 15-45.

ALPER, C.A., JOHNSON, A.M., BIRTCH, A.G., and MOORE, F.D. (1969). Human C'3: Evidence for the liver as the primary site of synthesis. Science. 163, 286-288.

ALLEN, S.L. (1955). H-2^f, tenth allele at histocompatibility-2 locus of the mouse determined by tumour transplantation. Cancer Res. 15, 315-323.

ALLEN, F.H, Jr. (1974) Linkage of HLA and GBG. Vox Sang, 27, 382-384.

AMLOT, P.L., and UNGER, A. (1976). Binding of phytohemagglutinin to serum substances and inhibition of lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. Clin. Exp. Immunol. 26, 520-527.

AMOS, D.B., GORER, P.A., and MIKULSKA, Z.B. (1955) Analysis of antigenic system in mouse (H-2 system). Proc. Roy. Soc. London, Ser B, 144, 369-373.

ANDERSON, C.L. and GREY, H.M. (1974). Receptors for aggregated IgG on mouse lymphocytes; their presence on thymocytes, thymus-derived, and bone-marrow derived lymphocytes. J.Exp.Med. 139, 1175-1188.

ANDERSON, J.K. and METZGAR, R.S. (1979). Further characterization of a human T lymphocyte associated antigen. Clin. exp. Immunol. 37, 339-347.

ANWAR, A.R. and KAY, A.B. (1978). Enhancement of human eosinophil complement receptors by pharmacologic mediators. J. Immunol. 121, 1245-1250.

ANWAR, A.R. and KAY, A.B. (1977). The ICF-A tetrapeptides and histamine selectively enhance human eosinophil complement receptors. Nature. 269, 522-524.

AOKI, I., BOYSE, E.A. and OLD, L.J. (1968). Wild-type Gross leukemia virus. II. Influence of immunogenetic factors on natural transmission and on the consequences of infection. J. Natl. Cancer Inst. 41, 97-101.

APPELLA, E., TANIGAKI, N., HENRIKSEN, O., PRESSMAN, D., SMITH, D.F. and FAINWELLIN, T. (1976). Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 341.

ARCHER, J.R. (1975). Inheritance of the macrophage alloantigenic marker (Mph-1) in inbred mice. Genet. Res. 26, 213-219.

ARNAIZ-VILLENNA, A., PLAYFAIR, J.H.L. and ROITT, I.M. (1975) C3 receptor. A marker of a thymus-dependent B-cell subpopulation. Clin. Exp. Immunol. 20, 375-378.

BACH, F.H. and ALTER, B.J. (1978). Alternative pathways of T lymphocyte activation. J. Exp. Med. 148, 829-834.

ARTZT, K., and BENNETT, D. (1977). Immunogenetics. 5, 97.

ARTZT, K., HAMBURGER, L. and FLAHERTY, L. (1977). Immunogenetics. 5, 97.

BADGER, A.M. and COOPERBAND, S.R. (1979). An Immunostimulatory substance in the Ascites of Patients with Cancer Metastatic to the Peritoneum. Cell. Immunol. 45, 15-25.

BADGER, A.M., COOPERBAND, S.R., MERLUZZI, V.J. and GLASGOW, A.H. (1977). Immunosuppressive activity of ascitic fluid from patients with cancer metastatic to the peritoneum. Cancer Res. 37, 1220-1226.

BACH, F.H. and ALTER, B.J. (1978). Alternative pathways of T lymphocyte activation. J. Exp. Med. 148, 829-834.

BACH, F.H., ALTER, B.J. and SOPORI, M.L. (1979). Complexity within T Lymphocytes responding in primary and secondary in vitro reactions. The Molecular Basis of Immune Cell function. (J.G. Kaplan ed,) Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 209-221.

BAKACS, T., GERGELY, P., and KLEIN, E. (1977). Characterization of cytotoxic human lymphocyte subpopulations: the role of Fc receptor carrying cells. Cell. Immunol. 32, 317-328.

BARBER, B.H. and ALLORE, R.J. (1979). Lymphocyte actin and the nature of its interaction with the plasma membrane. The molecular Basis of Immune cell function. (J. G. Kaplan ed.) Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 127-137.

BARBER, B.H. and DELOVITCH, T.L. (1979). Evidence for two homologous, but non identical Ia molecules determined by the I-EC subregion. J. Exp. Med. 150, 100-107.

BENACERRAF, B and UNANUE, E.R. (1979). Textbook of Immunology. (The Willians and Wilkins Company, Baltimore).

BENNER, R. and Van OUDENAREN, A. (1979). Corticosteroids and the humoral Immune Response of Mice. II. Enhancement of Bone Marrow Antibody formation to lypopolysaccharide by High Doses of Corticosteroids. Cell. Immunol. 48, 266-275.

BENNET, D. (1975) Cell, 6, 441.

BENNET, B., OLD, L.J. and BOYSE, E.A. (1964). The phagocytosis of tumour cells in vitro. Transplantation. 12, 183-185.

- BERGGARD, I. and BEARN, A.G. (1968). Isolation and properties of a low molecular weight beta-2-globulin occurring in human biological fluids. J. Biol. Chem. 243, 4095-4103.
- BERNARD, A., BOUNSELL, L. and GOOD, R.A. (1976). Complement inhibitors released from leukocytes. II. Evidence that lymphocytes release and produce an inhibitor of C2 activation. Cell. Immunol. 22, 35-41.
- BEVERLEY, P.C.L., WOODY, J., DUNKLEY, M., FELDMANN, M. and MCKENZIE, I. (1976). Separation of suppressor and killer T cells by surface phenotype. Nature. 262, 495-497.
- BRANCO, C., PATRICK, R. and NUSSENZWEIG, V. (1970). A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen antibody complement-complexes. I. Separation and characterisation. J. Exp. Med. 132, 702-710.
- BIGUZZI, S. (1979) Interaction of anti-staphylococcal protein A antisera with Fc receptor-bearing human normal lymphocytes. Eur. J. Immunol. 9, 52-60.
- BIRNBAUM, G., SISKIND, G.W. and WEKSLER, M.E. (1972). Autologous and allogeneic stimulation of peripheral human leukocytes. Cell. Immunol. 3, 44-49.

BIRCH, R.E., BERNIER, G.M. and FANGER, M.W. (1979). Rabbit lymphocytes with receptor for IgM. I. The development of receptor on lymphocytes following intravenous injection of antigen. Cell. Immunol.

BOKISCH, V.A., and SOBEL, A.T. (1974). Receptor for the fourth component of complement on human B lymphocytes and cultured human lymphoblastoid cells. J. Exp. Med. 140, 1336-1347.

BOLHUIS, R.L.H., and SCHUIT, H.R.E. (1979). Identification of lymphocyte subpopulations in E-RFC-enriched and E-RFC-depleted cell fractions of fresh and cryopreserved lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 35, 317-323.

BOURNE, H.R., LICHTENSTEIN, L.M., MELMON, K.L., HENNEY, C. S., WEINSTEIN, L.M. and SHEARER, G.M. (1974). Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. Science. 184 247-249.

BOYNTON, A.L. and WHITFIELD, J.F. (1979). The calcium induced cyclic AMP-dependent initiation of DNA synthesis in thymic lymphoblast and T51B liver cells. The molecular basis of the immune cell function (J.G.Kaplan ed.) Elsevier/Nort-Holland Biomedical Press, Amsterdam. p.75-86.

BOYSE, E.A., FLAHERTY, L., STOCKERT, E. and OLD, L.J. (1972). Histoincompatibility attributable to genes near H-2, that are not revealed by hemagglutination or cytotoxicity test. Transplantation, 13, 431-432.

BOYSE, E.A., ITAKURA, K., STOCKERT, E., IRITANI, C.A., and MIURA, M. (1971). Ly-C: a third locus specifying alloantigens expressed only on thymocytes and lymphocytes. Transplantation, 11, 351-353.

BOYSE, E.A., MIYAZAWA, M.M., AOIKI, T. and OLD, L.J. (1968). Ly-A and Ly-B of lymphocyte isoantigens in the mouse. Proc. roy. Soc. B. 178, 175-181.

BOYSE, E.A., STOCKERT, E. and OLD, L.J. (1967). Modification of the antigenic structure of the cell membrane by thymus-leukemia (TL) antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58, 954-957.

BRATTIG, N. and BERG, P.A. (1976). Serum inhibitory factors (SIF) in patients with acute and chronic hepatitis and their clinical significance. Clin. Exp. Immunol. 25, 40-49.

BUCHHOLZ, D.M., CHANG, J.L., DRAY, S. and TEODORESCU, M (1979). T-independent but not T-Dependent Antigens Maintain Surface Ig of Lymphocytes. Cell. Immunol. 44, 209-218.

CANTOR, H. and BOYSE, E.A. (1976). Regulation of cellular and humoral immune responses by T-cell subclasses. Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 23-32.

CANTOR, H., HUGENBERGER, J., McVAY-BOUDREAU, L., EARDLEY, D.D., KEMP, J., Shen, F.W. and GERSHON, R.K. (1978) Immunoregulatory circuits among T-cell sets. Identification of a subpopulation of a T-helper cells that induces feed-back inhibition. J. Exp. Med. 148, 871-877.

CANTOR, H. and BOYSE, E.A. (1975a) Functional subclasses of T-Lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T cell subclasses, was a differentiative process independent of antigen. J. Exp. Med. 141, 1376-1389.

CANTOR, H. and BOYSE, E.A. (1975 b). Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly-1⁺ cells in the generation of killer activity. J. Exp. Med. 141, 1390-1399.

CANTOR, H. and BOYSE, E.A. (1975c). J. Reticuloendoth. Soc. 17, 115- .

CAPRA, J.D. and EDMUNSON, A.B. (1977). El lado de unión de los anticuerpos. I. y Ciencia. Marzo. p. 34-43.

CATOVSKY, D., CHERCHI, M., OKOS, A., HEDGE, U. and GALTON, D.A.G. (1976). Mouse red cell rosettes in B-lymphoproliferative disorders. Brit. J. Haemat. 33, 173-177.

CLARK, R.A., and KLEBANOFF, S.J. (1977). Studies on the mechanism of antibody-dependent polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity. J. Immunol. 119, 1413-1418.

CLARK, W. R. (1975). An antigen specific component of lectin mediated cytotoxicity. Cell. Immunol. 17, 505-516.

CLARKE, F.M., MORTON, H. and CLUNIG, G.I.A. (1978). Detection and separation of two serum factors responsible for depression of lymphocyte activity in pregnancy. Clin. Exp. Immunol. 32, 318-323.

- CLEMENT, C.S., WU MU-YEH, B., RIVERA, A.J. (1979) Inhibition of lymphocyte Reactivity in vitro by Autologous polymorphonuclear cells. Cell. Immunol. 48, 288-295.
- COCHRANE, C.G., MULLER-EBERHARD, H.J. and HASKIN, B.S. (1970). Depletion of plasma complement in vivo by a protein of cobra venom: its effect on various immunologic reactions. J. Immunol. 105, 55-57.
- COHEN, I.R. and LIVNAT, S. (1976). The cell-mediated Immune Response: Interactions of Initiator and Recruited T Lymphocytes. Transp. Rew. 29, 24-58.
- COLTEN, H.R. and EINSTEIN, L.P. (1976). Complement Metabolism: Cellular and Humoral Regulation. Transplant. Rew. 32, 3-11.
- CONE, R.E., HUBER, B., CANTOR, H. and GERSHON, R.K. (1978) Molecular identification of a surface structure on B cells (Lyb-3) and its relationship to B cell triggering. J. Immunol. 1733-1740.
- CONRADIE, J.D. and BUBB, M.O. (1977). C μ 4 domain of IgM has cytophilic activity for human lymphocytes. Nature, 265, 160-161.
- COOKE, A., HEPPEL, L., HUTCHING, P. and ROITT, I.M. (1979) Con-A-Induced suppressor activity of Lymphocytes, distinguished by the presence or Absence of the Fc-Receptor. Cell. Immunol. 47, 90-99.

COOPER, D.A., DUCKETT, M., PETTS, V. and PENNY, R. (1978) Corticosteroid enhancement of immunoglobulin synthesis by PWM-stimulated human lymphocytes. Clin. exp. Immunol. 37, 145-151.

COWING, C., SCHWARTZ, B.D. and DICKLER, H.B. (1978). Macrophages Ia antigens. I. Macrophage populations differ in their expression of Ia antigens. J. Immunol. 120, 378-384.

CRESWELL, P., TURNER, M.J. and STROMINGER, J.L. (1973). Papain solubilized HLA antigen from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1603-1607.

CULLEN, S.E., SCHWARTZ, B.D., NATHESON, S.G. and CHERRY, M. (1972). The molecular basis of codominant expression of the histocompatibility-2 genetic region. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 1394-1397.

CHAN, F.P.H. and OSMOND, D.G. (1979). Maturation of bone marrow lymphocytes. III. Genesis of Fc Receptor-Bearing "Null" cells and B lymphocytes subtype defined by concomitant expression of surface Ig-M, Fc, and Complement receptors. Cell. Immunol. 47, 366-377.

CHEN, T. and LEEVY, C.M. (1976). Lymphocyte proliferation inhibitory factor (PIF) in alcoholic liver disease. Clin. Exp. Immunol. 26, 42-45.

- CHESS, L. and SCHLOSSMAN, S.F. (1979). Human Lymphocyte subpopulations. Advan. in Immunol. 28, 213-245.
- CHISARI, F.V., GEALY, W.J. and EDGINTON, T.S. (1977). Recovery of soluble sheep erythrocyte receptor from the T lymphocyte surface by proteolytic cleavage. J. Immunol. 118, 1138-1142.
- CHOI, Y.S. and GOOD, R.A. (1977). Differentiation of human peripheral blood B lymphocytes. Immunology, 33, 887-894.
- DATTA, S.K. and SCHWARTZ, R.S. (1976). Autoimmunization and Graft Versus Host Reaction. Transplant. Rev. 31, 44-78.
- DELESPESE, G., DUCHATEAU, J., GAUSSET, Ph. and GOVAERTS, A. (1976). In vitro response of subpopulations of human tonsil lymphocytes. I. Cellular collaboration in the proliferative response to PHA and ConA. J. Immunol. 116, 437-445.
- DICKLER, H.B. (1976). Lymphocyte Receptors for Immunoglobulin. Advan. Immunol. 24, 167-214.
- DOHERTY, P.C., BLANDEM, R.V. and ZINKERNAGEL, R.M. (1976). Specificity of virus-Immune effector T cells for H-2K or H-2D compatible interactions: Implications for H-Antigen diversity. Transplant. Rev. 29, 89-124.

- DONNER, M., RAFFOUR, C. and STREIFF, F. (1979). Characterization of the human peripheral effector cells mediating antibody dependent cellular cytotoxicity against allogenic cells. Clin exp. Immunol. 38, 549-560.
- DORNAND, J., BONNAFOUS, J.C. and MANI, J.C. (1978). Purification and properties of 5'-nucleotidase from lymphocyte plasma membranes. Eur. J. Biochem. 87, 459-465.
- DORVAL, G., BOURKAS, A.E. and MENEZES, J. (1979). Comparative studies on the expression of Fc-receptors, Ia antigens, and β -2-microglobulin following in vitro herpes simplex virus infection of human lymphoid cells. Clin. exp. Immunol. 38, 477-485.
- DOUGLAS, T.C. (1972). Occurrence of a theta-like antigen in rat. J. Exp. Med. 136, 1054-1062.
- DURDA, P.J. and GOTTHIEB, P.D. (1979). Sequential precipitation of Mouse thymocyte extracts with anti-Lyt-2 and anti-Lyt-3 sera. I. Lyt-2.1 and Lyt-3.1 antigenic determinant reside on separable molecular species. J. Immunol. 121, 983-989.
- DUTTON, R.W. (1975). Suppressor T cells. Transplant. Rev. 26, 39-55.
- DUTTON, R.W. (1966). Symposium on in vitro studies of the immune response. II. Significance of the reaction of lymphoid cells to homologous tissue. Bacteriol. Rev. 30, 397-419.

- DUTTON, R.W. (1967). In vitro studies of immunological responses of lymphoid cells. Adv. Immunol. 6, 253-281.
- DWYER, Ch. J. and DESAULES, M. (1979). Behaviour of human immunoregulatory cells in culture. I. Variables requiring consideration for clinical studies. Clin. Exp. Immunol. 38, 499-513.
- EARDLEY, D.D., HUGENBERGER, J., McVAY-BOUDREAU, L., SHEN, F.W., GERSHON, R.K., and CANTOR, H. (1978). Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-Helper cells induce other T-cell sets to exert feed-back inhibition. J. Exp. Med. 147, 1106-1115.
- EICHWALD, E.J. and SILMSER, C.R. (1955). Transplant. Bull. 2, 148
- EIFE, G.W., EIFE, R.F. and BRENDDEL, W. (1979) The effect of antilymphocyte globulin(ALG) on Human lymphocytes in vitro. Inhibition of lymphotoxin production as a sensitive indicator for ALG activity. Cell. Immunol. 46, 35-47.
- EDIDIN, M. (1972). The tissue distribution and cellular localization of transplantation antigens. Transplantation antigens, eds. Kahan, B.D. and Reisfeld, R. Academic Press New York.
- EDIDIN, M. (1974). Rotational and translational diffusion in membranes. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 3, 179-201.

- EKSTROM, B., PETERSON, P.A. and BERGGARD, I. (1975).
A urinary and plasma α_1 -glycoprotein of low molecular
weight: Isolation and some properties. Biochem. biophys.
Res. Commun. 65, 1427-1430.
- EVANS, R. (1971). Phagocytosis of murine lymphoma cells
by macrophages. I. Factors affecting in vitro phagocyto-
sis. Immunology. 20, 67-73.
- EWENSTEIN, B.M., FREED, J.H., MOLE, L.E. and NATHENSON,
S.G. (1976). Localization of the papain cleavage site of
the H-2 glycoproteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 73,
915-918.
- FANGER, M.W. and LYDYARD, P.M. (1979). Receptors for
IgM on human lymphocytes. III. Specificity of receptors.
Clin. exp. Immunol. 37, 495-501.
- FEENEY, A.J. and HAMMERLING, U. (1976). ALA-1: A murine
alloantigen of activated lymphocytes. I. Serological ana-
lysis of mitogen stimulated T and B cells. Immunogenetics
3, 369-379.
- FEENEY, A.J. and HAMMERLING, LL. (1977). ALA-1: A murine
alloantigen of activated lymphocytes. III. T and B effec-
tor cells Express ALA-1. J. Immunol. 118, 1488-1494.
- FELLOCES, M., HORS, J., BOUE, J., DAUSSET, J. and JACOB, F.
(1977). Congress International Neurology, 5th, Amsterdam.

FERRARINI, M., HOFFMAN, T., FU, S.M., WINCHESTER, R.J. and KUNKEL, M.G. (1977). Receptors for IgM on certain human B lymphocytes. J. Immunol. 119, 1525-1529.

FERRONE, S. PELLEGRINO, M.A. and COOPER, M. (1976). Expression of C4 on human lymphoid cells and possible involvement in immune recognition phenomena. Science. 193, 53-55.

FIGUEREDO, M.A., PALOMINO, P., and ORTIZ, F. (1979). Lymphocyte response to phytohaemagglutinin in the presence of serum from pregnant women: correlation with serum levels of alpha-foetoprotein. Clin. Exp. Immunol. 37, 140-144.

FLAHERTY, L. (1976). The T1a region of the mouse: identification of a new serologically defined locus, Qa-2. Immunogenetics. 3, 533-539.

FLAHERTY, L. and BENNET, D. (1973). Histoincompatibilities found between congenic strains which differ at loci determining differentiation antigens. Transplantation, 16, 505-514.

FLAHERTY, L., ZIMMERMAN, D., and SULLIVAN, K.A. (1978). Qa-2 and Qa-3 antigens on lymphocyte subpopulations. I. Mitogen responsiveness. J. Immunol. 121, 1640-1643.

FLEER, A. (1978). Destruction of sensitized erythrocytes by human monocytes in vitro. Ph. D. thesis. University of Amsterdam.

FOKER, J.E., MALKINSON, A.M., SHEPPARD, J.R. and WANG, T. (1979). Studies of cyclic AMP metabolism in proliferating lymphocytes. The molecular basis of immune cell function (J.G. Kaplan ed.) Elsevier/Nort-Holland Biomedical Press, Amsterdam. p.75-86.

FORBES, I.J. and ZALEWSKI, P.D. (1976). A subpopulation of human B lymphocytes that rosette with mouse erythrocytes. Clin. Exp. Immunol. 26, 99-107.

FORBES, I.J., ZALEWSKI, P.D., LEONG, A.S.Y., SAGE, R.E., DALE, B. and COWLED, P.A. (1978). B cell leukemia distinguished from chronic lymphocytic leukaemia by surface marker studies. Aust. N.Z.J. Med. 8, 532.

FORMAN, J. (1975). On the role of the H-2 histocompatibility complex in determining the specificity of cytotoxic effector cells sensitized against syngeneic trinitrophenyl modified targets. J. Exp. Med. 142, 403-418.

FORMAN, J. and FLAHERTY, L. (1978). Immunogenetics, 6, 227.

FORNI, L. and COUTINHO, A. (1978). An antiserum which recognizes lipopolysaccharide-reactive B cells in the mouse. Eur. J. Immunol. 8, 56-62.

FORSDYKE, D.R. (1979). Colchicine inhibits the early enhancement of ³H Uridine incorporation in lymphocytes activated by high concentrations of Con-A. The Molecular Basis of Immune cell function (J.G. Kaplan ed.) Elsevier /North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. p. 355-360.

- FOX,R.A. and RAJARAMAN,K. (1979). Macrophage migration stimulation factor, migration inhibition factor and the role of suppressor cells in their production. Cell. Immunol. 47, 69-78.
- FREEDMAN,M.H.(1979). Early biochemical events in lymphocyte activation. Cell. Immunol. 44, 290-313.
- FRYE,L.O. and EDIDEN,M.(1970). The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. J. Cell. Sci. 7, 319-335.
- FUDENBERG,H.H. (1978). Manual de Immunologia clínica. Edit. El Manual Moderno,S.A.
- GALAMA,J.M.D.,VOS,A. and LUCAS,C.J.(1979). Lymphocyte mediated cytotoxicity to autologous cells infected with measles virus. II. Specificity of the cytotoxic reaction and characterization of the effector cells involved. Cell. Immunol. 48, 296-307.
- GASSER,D.L. (1976). Genetic studies on the H-3 region of mice and implications for polymorphism of histocompatibility loci. Immunogenetics, 3, 271-276.
- GEHRZ,R.C.and KNORR,S.O. (1979). Characterization of the role of mononuclear cell subpopulations in the in vitro lymphocyte proliferation assay. Clin. Exp. Immunol. 37, 551-557.
- GELFAND,M.C., FRANK,M.M. and GREEN,I.(1975). A receptor for the third component of complement in the human renal glomerulus. J. Exp. Med. 142, 1029-1034.

GERBLICH, A.A. and STAVITSKY, A.B. (1979). Regulation of the in vitro Anamnestic antibody response by cyclic AMP. IV. Evidence for participation of prostaglandins of the E series in the early events. Cell. Immunol. 48, 318-328.

GERY, I. and WAKSMAN, B.H. (1972) Potentiation of T lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediators. J. Exp. Med. 136, 143-147.

GILL, P.G., WALLER, C.A. and MacLENNAN, I.C.M. (1977). Relationships between different functional properties of human monocytes. Immunology. 33, 873-880.

GLASER, M. (1979). Concanavalin-A Mediated in vitro activation of lymphocytes primed against syngeneic SV-40-induced tumour associated antigens in mice into secondary effector cells capable of specifically preventing tumour growth. Cell. Immunol. 46, 201-207.

GORER, P.A. (1936). Brit. J. Exp. Path. 17, 42.

GORER, P.A. (1937) The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. J. Pathol. Bacteriol. 44, 691.

GORER, P.A. and KALISS, N. (1959). The effect of isoantibodies in vivo on three different transplantable neoplasms in mice. Cancer Res. 19, 824-829.

GORER, P.A., LYMAN, S. and SNELL, G.D. (1948). Proc. Roy. Soc. Ser. B., 135, 499.

- GREAVES, M.F. (1975). Cellular Recognition. London. Chapman and Hall. p.11.
- GREEN, S.S. and SELL, K.W. (1970). Mixed leukocyte stimulation of normal peripheral leukocytes by autologous lymphoblastoid cells. Science. 170, 989-990.
- GREENE, M.I., DORF, M.E., PIERRES, M. and BENACERRAF, B. (1977). Reduction of syngeneic tumour growth by an anti-I-J-alloantiserum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5118-5121.
- GREGORY, C.J., McCULLOUGH, E.A. and TILL, J.E. (1972) Repressed growth of C57BL marrow in hybrid host reversed by antisera directed against non-H-2 alloantigens. Transplantation, 13 138-141.
- GROSS, L. (1970). Oncogenic viruses. Pergamon, New York.
- GRUNSPAN-SWIRSKY, A and PICK, E. (1979). Facilitation of Adenylate cyclase stimulation in macrophages by Lectins. Cell. Immunol. 45, 415-427.
- GUPTA, S., SCHWARTZ, S.A. and GOOD, R.A. (1979). Subpopulations of human T lymphocytes. VII. Cellular Basis of Con-A Induced T-cell. Mediated suppression of Immunoglobulin production by B lymphocytes from normal Humans. Cell. Immunol. 44, 242-251.
- HABU, S., HAYAKAWA, K., and OKUMURA, K. (1979). Characterization of Ia-positive Peritoneal exudate cells which augment Con-A response of T cells. Cell. Immunol. 47, 416-423.

HABU, S. and RAFF, M.C. (1977). Accessory cell dependence of Lectin-induced proliferation of mouse T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 7, 451-457.

HAEGER, D.G. (1979). Phagocytic peripheral blood monocytes from rabbits and human express membrane receptors specific for IgM molecules: evidence that incubation with neuraminidase exposes cryptic IgM (Fc) receptors. Clin. Exp. Immunol. 35, 484-490.

HALLORAN, P.F. and STUBBS, M. (1979). Macrophage alloantibody target cell interactions. III. Stripping of antibody coated cell by human macrophages. Clin. Exp. Immunol. 38, 568-577.

HALLORAN, P.F. and STYLIANOS, S.K. (1978). Macrophage alloantibody target cell interaction. I. Assessment of macrophage effector function. Transplantation. 25, 296-301.

HALLORAN, P.F. and STYLIANOS, S.K. (1979) Macrophage alloantibody target-cell interactions. II. Non-phagocyte effect. Transplantation. 27, 180-182.

HAMMER, C., JERRY, L.M. and LEWIS, M.G. (1979). Tone of Concanavalin-A activated suppressor cells in patients with malignancies. The Molecular Basis Of Immune cell function. p. 591-593.

HARRIS, N.S., JAGARLAMOODY, S.M., MCKHANN, C.F. and NAJARIAN, J.S. (1972). The effect of antiplasma cell sera on the primary immune response. J. Immunol. 108, 958-964.

- HART, D.A. (1979). Modulation of Concanavalin A stimulation of Hamster lymphocyte cells by lithium chloride. Cell. Immunol. 43, 113-122.
- HASKILL, J.S. and FETT, J.W. (1976). Possible evidence for antibody-dependent macrophage-mediated cytotoxicity directed against murine adenocarcinoma cells in vivo. J. Immunol. 117, 1992-1998.
- HENNEY, C.S., BOURNE, H.R. and LICHTENSTEIN, L.M. (1972). The role of cyclic 3'5' adenosine monophosphate in the specific cytotoxic activity of lymphocytes. J. Immunol. 108, 1526-1534.
- HERSEY, P. and McLENNAN, I.C.M. (1973). Macrophage dependent protection of tumour cells. Immunology. 24, 385-388.
- HERZENBERG, L.A., OKUMURA, K., CANTOR, H., SATO, V.L., SHEN, F.W., BOYSE, E.A. and HERZENBERG, L.A. (1976). T-cell regulation of antibody response: Demonstration of allotype-specific helper T-cells and their specific removal by suppressor T cells. J. Exp. Med. 144, 330-344.
- HESKETH, R. (1979). Cation fluxes and lymphocyte transformation. The molecular basis of Immune Cell function (J.G. Kaplan ed.). p.39-56.
- HIRST, J.A., BEVERLEY, P.C.L., KISIELOW, P., HOFFMANN, M.K. and OETTGEN, H.F. (1975). Ly Antigens: Markers of T cell function on mouse spleen cells. J. Immunol. 115, 1555-1557.

HOECKER,G., COUNCE,S., and SMITH,P.(1954). The antigens determined by the H-2 locus: a rhesus-like system in the mouse. Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 40, 1040-1047.

HOFFMAN,T., WANG, C.Y., WINCHESTER,R.J., FERRARINI,M. and KUNKEL,H.G. (1977). Human lymphocytes bearing "Ia-like" antigen; absence in patients with infantile agammaglobulinemia. J. Immunol. 119, 1520-1524.

HOLM,G.(1973). Mechanism of antibody induced haemolytic activity of human blood monocytes. Activation of macrophages. (Edit. W.H. WAGNER, H.MAHN and S.R. EVANS) p.63. American Elsevier publishing Co. New York.

HOLM, G., ENGWALL,E., HAMMASTROM,S. and NATVIG,S.B. (1974) Antibody induced haemolytic activity of human blood monocytes. The role of antibody class and subclass. Scand. J. Immunol. 3, 173-180.

HOLM, G. and HAMMASTROM,S. (1973). Haemolytic activity of human blood lymphocytes. Lysis of human erythrocytes treated with anti-A serum. Clin. exp. Immunol. 13, 29-34.

HORWITZ,D.A. and GARRETT,M.A.(1977). Distinctive functional properties of human blood lymphocytes: a comparison with T lymphocytes B lymphocytes and monocytes. J. Immunol. 118, 1712-1721.

HUBER,B., DEVINSKY,O., GERSHON,R.K. and CANTOR,H.(1976). Cell mediated immunity; delayed-type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T-cell subclasses. J.Exp.Med. 143, 1534-1539.

HUBER, B., GERSHON, R.K. and CANTOR, H. (1977). Identification of a B-cell surface structure involved in antigen-dependent triggering: absence of this structure on B cells from CBA/N mutant mice. J. Exp. Med. 145, 10-20.

HUBER, B., and CANTOR, H. (1976). In "Transplantation Abstracts" (M. Stephenson and A. Bryzytwa, eds.) p.133.

HURME, M., HETHERINGTON, C.M., CHANDLER, P.R. and SIMPSON, E. (1978). Cytotoxic T-cell responses to H-Y: mapping of the Ir genes. J. Exp. Med. 147, 758-767.

INTERNATIONAL WORKSHOP OF LYMPHOQUINES (2th) (1979).
J. Of. Immunol. 123, 2928-2929.

ISRAEL, E., BEISS, B., and WAINBERG, M.A. (1979) Viral activation of suppressor lymphocytes following membrane-membrane interaction. Induction of a lymphocyte-directed Inhibitor (LDI) of mitogenesis. The Molecular Basis of Immune Cell function (J.G. Kaplan ed.) p. 507-510.

ITOH, Y., KIN, K., TASHARA, T., SAKURABAYASHI, I., KAWAI, T., SHIORI, K. and TAKAGI (1979). Synthesis and secretion of α_1 -microglobulin by human lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 37, 134-139.

JANDINSKI, J., CANTOR, H., TADAKUMA, T., PEAVY, D.L. and PIERCE, C.W. (1976). Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: suppressor and Helper activities are inherent properties of distinct T-cell subclasses. J. Exp. Med. 143, 1382-1390.

JENSEN, P.J. and KOREN, H.S. (1979). The relationship between NK and K cells. The molecular basis of the immune cell function (J.G.Kaplan ed.). p. 576-579.

JOHN, M., CARSWELL, E., BOYSE, E.A., and ALEXANDER, G. (1972) Nature. 238, 57.

JOLLEY, G.M., BOYLE, M.D.P. and ORMEROD, M.G. (1976). The destruction of allogeneic tumour cells by antibody and adherent cells from peritoneal cavities of mice. Cell. Immunol. 22, 262-270.

JULIUS, M.H., SIMPSON, E. and HERZENBERG, L.A. (1973). A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol. 3, 645-649.

KAUFMAN, D.B., CARNAUD, C., STACH, J.L. and BACH, J.F. (1979) The suppressive effect of a supernate from Concanavalin-A human lymphocytes: Effects of Concanavalin-A-activated lymphocytes and their supernates on cytotoxic and mixed lymphocyte reactions. Cell. Immunol. 47, 153-162.

KAY, A.B., GLASS, J.E. and SALTER, D.McG. (1979) Leucoattractants enhance complement receptors on human phagocytic cells. Clin. Exp. Immunol. 38, 294-299.

KAZURA, J.W., NEGENDANK, W., GUERRY, D. and SCHREIBER, A.D. (1979). Humna monocyte lymphocyte interaction and its enhancement by Levamisole. Clin. Exp. Immunol. 35, 258-268.

KEIGHTLEY, R.G., COOPER, M.D. and LAWTON, A.R. (1976). The T cell dependence of B cell differentiation induced by PWM. J. Immunol. 117, 1538-1544.

- KIN, K., KASAHARA, T., ITOH, Y., SAKURABAYASHI, I., KAWAI, T. and MORITA, K. (1979). Cellular cooperation in lymphocyte activation. II. Cooperative response of human peripheral T and B lymphocytes to rabbit anti human β_2 -microglobulin. Clin. Exp. Immunol. 32, 292-298.
- KLEIN, J. (1971a). Private and public antigens of the mouse H-2 system. Nature. 229, 635-637.
- KLEIN, J. (1971b). Cytological identification of the chromosome carrying the IXth linkage group (including H-2) in the mouse. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1594-1601.
- KLEIN, J. (1972). Is the H-2K locus stronger than the H-2D locus?. Tissues Antigens, 2, 262-265.
- KLEIN, J. (1975). Biology of the Mouse Histocompatibility-2 complex. Springer Verlag, Berlin and New York.
- KLEIN, J. (1978). Genetic of cell-mediated lymphocytotoxicity in the mouse. Springer Semin. Immunopathol. 1, 31-49.
- KLEIN, J. and HAMMERBERG, C. (1977). The Control of differentiation by the T complex. Immunolog. Rev. 33, 70-104.
- KLEINMAN, R. and TEODORESCU, M. (1979). Human lymphocyte subpopulations identified by Bacterial Adherence are functionally different. Cell. Immunol. 48, 43-51.
- KOMURO, K., GOLDSTEIN, G. and BOYSE, E.A. (1975a) Thymus repopulating capacity of cells that can be induced to differentiate to T-cells in vitro. J. Immunol. 115, 195-198.

- KOMURO, K., IKATURA, K., BOYSE, E.A. and JOHN, M. (1975b). Immunogenetics, 1, 452.
- KRICO, C.J., STEINMULLER, D. and DAVID, C.S. (1979). Expression of I-Region gene products on Mouse tail epidermal cells. Cell. Immunol. 46, 239-246.
- KUNTZ, M.M., INNES, J.B. and WEKSLER, M.E. (1976). Lymphocyte transformation induced by autologous cells. IV. Human T-lymphocyte proliferation induced by autologous or an allogeneic Non-T-lymphocytes. J. Exp. Med. 143, 1042-1054.
- KURIBAYASHI, K., TAKABAYASHI, A., HIYAMA, M., YAMADA, J. and MASUDA, T. (1979). Immunological properties of Fc receptor on lymphocytes. 7. Suppression of mixed lymphocyte reaction by Fc receptor-bearing splenic lymphocytes. Cell Immunol. 46, 373-383.
- LAMNU, M.E., BOYSE, E.A., OLD, J.L., LISOWSKA-BERNSTEIN, B., and STOCKERT, E. (1968). Modulation of TL (Thymus-leukemia) antigens by Fab-fragments of TL antibodies. J. Immunol. 101, 99-103.
- LANE, D.P. and SILVER, D.M. (1976). Inhibition of Normal mouse lymphocyte mitogen responses by xenogeneic or allogeneic antibodies. J. Immunol. 117, 1033.
- LAPP, W.S., KIRCHER, H., and GEMSA, D. (1979). Stimulation of prostaglandin production and its effect on lymphoid cell function during the graft-versus-host reaction. The Molecular Basis of Immune Cell function. (J.G. Kaplan ed.) p. 376-378.

- LARSSON, E.L., MANNERVIK, B. and BLOMGREN, H. (1979). Characterization of a Human mitogenic factor (MF) released by phytohemagglutinin-activated lymphocytes. Cell. Immunol. 44, 424-432.
- LEE, S-C, and LUCAS, Z.J. (1979). Cytotoxic activity of lymphocytes. VIII. lymphotoxin activity in cell-free extracts of activated lymphocytes. Cell. Immunol. 48, 166-181.
- LEE, S.T. and PARASKEVAS, F. (1976). Soluble factors in immune sera of mice. I. Specific and non-specific suppressive activity. Clin. Exp. Immunol. 24, 177-184.
- LEE, S.T. and PARASKEVAS, F. (1979). Macrophage T-cell interactions. II. The uptake by T cells of fragments bearing Ia determinants released from macrophages. Cell. Immunol. 48, 1-14.
- LERMAN, S.P., CHAPMAN-ALEXANDER, J., UMETSU, D., and THORBECKE, G.I. (1979). Properties of reticulum cell sarcomas in SJL/J mice. VII. Mature of normal lymphoid cells proliferating in response to tumour cells. Cell. Immunol. 43, 209-213.
- LIACOPOULOS-BRIOT, M., STIFFEL, C., LAMBERT, F. and DECREU-SEFOND, C. (1979). Mixed lymphocyte reaction in mice genetically selected for high (Hi/PHA) or Low (Lo/PHA) responsiveness to Phytohemagglutinin. Cell. Immunol. 44, 29-38.
- LING, N.R. (1968). Lymphocyte stimulation. Wiley, New York.

LOBLAY, R.E., PRITCHARD-BRISCOE, H. and BASTEN, A. (1978) Suppressor T-cell memory. Nature. 272, 620-622.

LO BUGLIO, A.F., COTRAN, R.S. and JANDI, J.H. (1967) Red cells coated with immunoglobulin G: binding and sphering by mononuclear cells in man. Science. 158, 1582-1585.

LYDMARD, P.M. and FANGER, M.W. (1979) Receptors for IgM on human lymphocytes. II. Mitogen-induced modulations of receptor expression. Clin. Exp. Immunol. 37, 486-494.

MAIZEL, A.L., MEHTA, S. and FORD, R.J. (1979). T-lymphocyte/monocyte interaction in response to phytohemagglutinin. Cell. Immunol. 48, 383-397.

MANN, D.L., ABELSON, L., HARRIS, S.D. and AMOS, D.B. (1975) Detection of antigens specific for B lymphoid cultured cell lines with human alloantisera. J. Exp. Med. 142, 84-89.

MANTOVANI, A., CAPRIOLI, B., GRITTE, P. and SPREAFICO, F. (1977) Human mature macrophages mediate antibody dependent cellular cytotoxicity on tumour cells. Transplantation. 24, 291-297.

MARGNI, R.A., HAJOS, S.E., PERDIGON, G., MANGHI, M. and BOREL, I.M. (1979). Ontogenic evolution of chicken red cell Fc. receptor. Cell. Immunol. 48, 235-237.

MARCHESE, V.T., TILLACK, T.W., JACKSON, R.L., SEGREST, J.P. and SCOTT, R.E. (1972). Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 1445-1449.

- McCONNELL, I. and HOBART, M.J. (1976) The Immune system. Blackwell scientific publications. p. 98.
- McCONNELL, I. and HURD, C.M. (1976). Lymphocyte receptors. II. Receptors for rabbit IgM on human T lymphocytes. Immunology. 30, 835-839.
- McCONNELL, I. and LACHMAN, P.J. (1976). Complement and cell membranes. Transplant. Rev. 32, 72-79.
- McCORKLE, F.M. Jr., STINSON, R. and CLICK, B. (1979). A biphasic Graft vs Host Response in Aging chickens. Cell. Immunol. 46, 208-212.
- McKENZIE, I.F.C., ELIOT, B.E. and HOSKILL, J.S. (1975). Isr. J. Med. Sci. 11, 1278.
- McKENZIE, I.F.C., and PARISH, C.R. (1976). Secretion of Ia antigens by a subpopulation of T cells which are Ly-1⁺ Ly-2⁻, and Ia⁻. J. Exp. Med. 144, 847-851.
- McKENZIE, I.F.C. and PLATE, J.D. (1974). Ly-4.2: a cell membrane alloantigen of murine B lymphocytes. III. In vitro studies. Cell. Immunol. 14, 376-385.
- McKENZIE, I.F.C. and POTTER, T. (1979). Murine lymphocyte surface antigens. Adv. in Immunol. 27, 180-338.
- MELIEF, C.J., VAN DER MENLEN, M.V., CHRISTIANA, B.J. and De GREEVE, P. (1979) Cooperation between subclasses of T lymphocytes in the in vitro generation of cytotoxicity against a mutant H-2K difference. An analysis with anti-Lyt antisera. Eur. J. Immunol. 9, 7-12.

- MELMON, K.L., BOURNE, H.R., WEINSTEIN, Y., SHEARER, G.M., KRAUS, J. and BAUMINGER, S. (1974). Haemolytic plaque formation by leukocytes; "in vitro" control by vasoactive hormones. J. Clin. Invest. 53, 13-18.
- MENDELSON, J., MULTER, M.M. and BERNHEIM, J.L. (1977). Inhibition of human lymphocyte stimulation by steroid hormones: cytokinetic mechanism. Clin. Exp. Immunol. 27, 127-134.
- MERIKANTO, J., SOPPI, E., and RUUSKANEN, O. (1979). Postnatal Development of mitogen Responsiveness of Guinea Pig Lymphocytes. Cell. Immunol. 47, 227-235.
- MESSNER, R.P. and JELINEK, J. (1970). Receptor for human G globulin on human neutrophils. J. clin. Invest. 49, 2165-2168.
- MIHAS, A.A., HIRSCHOWITZ, B.I. and SACCONI, G. (1976). Purification and characterization of a liver specific antigen. J. Immunol. 116, 1228-1235.
- MICHAELSON, J., FLAHERTY, L., VITETTA, E.S. and POULIK, M.D. (1977). Molecular similarities between the Qa-2 alloantigen and other gene products of the 17th chromosome of the mouse. J. Exp. Med. 145, 1066-1070.
- MILLER, G.A. and FELDMAN, J.D. (1977). Effect of macrophages and antibody on in vivo growth of Moloney Sarcoma in the rat. J. Immunol. 119, 1445-1451.

- MIYAMA, M., YAMADA, J. and MASUDA, T. (1979). Immunological properties of Fc receptor on lymphocytes. 6. Characterization of suppressive B cell factor (SBF) released from Fc Receptor-Bearing B cells. Cell. Immunol. 44, 51-63.
- MORAN, J., COLASANTI, G., AMOS, N. and PETERS, D.K. (1977). C3 receptors in glomerular disease. Clin. Exp. Immunol. 28, 212-217.
- MORETTA, L., FERRARINI, M., DURANTE, M.L. and MINGARI, M.C. (1975). Expression of a receptor for IgM by human T cells in vitro. Eur. J. Immunol. 5, 565-569.
- MORETTA, L., FERRARINI, M., MINGARI, M.C., MORETTA, A. and WEBB, S.R. (1976). Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. J. Immunol. 117, 2171-2174.
- MORETTA, L., WEBB, S.R., GROSSI, C.E., LYDIARD, P.M. and COOPER, M.D. (1977). Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM and IgG. J. Exp. Med. 146, 184-200.
- MOSIER, D.E., and JOHNSON, B.M. (1975). Ontogeny of mouse lymphocyte function. II. Development of the ability to produce antibody is modulated by T lymphocytes. J. Exp. Med. 141, 216-226.
- MOSIER, D.E., MATHIESON, B.J. and CAMPBELL, P.S. (1977). Lymphotype and mechanism of action of mouse neonatal suppressor T cells. J. Exp. Med. 146, 59-73.

MUNAN, I. and KELLY, A. (1979). Age-dependent changes in blood monocyte populations in man. Clin. exp. Immunol. 35, 161-162.

MURGITA, R.A., ANDERSSON, L.C., SHERMAN, M.S., BENNICH, H. and WIGZELL, H. (1978). Effects of human alpha fetoprotein on human B and T lymphocyte proliferation in vitro. Clin. Exp. Immunol. 33, 347-356.

MURPHY, D.B. (1978). Cellular basis of tolerance to serum albumin in adult mice. Springer. Sem. Immunopathol. 1, 111-115.

MURPHY, D.B., HERZENBERG, L.A., OKUMURA, K., HERZENBERG, L.A. and McDEVITT, H.O. (1976). A new I subregion (I-J) marked by a locus (Ia-4) controlling surface determinants on suppressor T lymphocytes. J. Exp. Med. 144, 699-712.

NAGY, Z., ELLIOT, B.E. and NABHOLZ, M. (1976). Specific-binding of K and I region products of the H-2 complex to activated thymus derived (T) cells belonging to different Ly subclasses. J. Exp. Med. 144, 1545-1553.

NAKASHIMA, I., NAGASE, F., YOKOCHI, T., OHTA, M. and KATO, N. (1979). Adjuvant Actions of polyclonal lymphocyte activators. I. Comparison and characterization of their actions in antibody response to deaggregated bovine serum albumine. Cell. Immunol. 46, 69-76.

NARIUCHI, H. and ADLER, W.H. (1979). Dissociation between proliferation and antibody formation by old mouse spleen cells in response to LPS stimulation. Cell. Immunol. 45, 295-302.

- NATHANSON, J.A. and GREENGARD, P. (1977). Segundos mensajeros en el cerebro. Invest. y Ciencia. Octubre, p.82-95.
- NATHANSON, S.G. and CULLEN, S.E. (1974). Biochemical properties and immunochemical genetic relationships of mouse H-2 alloantigens. Biochim. Biophys. Acta 344, 1-25.
- NEWMAN, W., GORDON, S., HAMMERLING, U., SENIK, A. and BLOOM, B. (1978). Production of migration inhibition factor (MIF) and an inducer of plasminogen activator (IPA) by subsets of T cells en MLC. J. Immunol. 120, 927-931.
- NIEDERHUBER, J.E., FRELINGER, J.A., DINE, M.S., SHOFFNER, P. DUMM, E. and SHREFFLER, D.C. (1976). Effects of anti-Ia sera on mitogenic responses. II. differential expression of the Ia marker on phytohemagglutinin and Concanavalin-A reactive T cells. J. Exp. Med. 143, 372-378.
- NUSSENWEIG, V. (1974). Receptors for immune complexes on lymphocyte. Adv. Immunol. 19, 217-248.
- NYHOLM, R.E. and CURRIE, G.A. (1978). Monocytes and macrophages in malignant melanoma. II. Lysis of antibody coated human erythrocytes as an assay of monocyte function. Brit. J. Cancer. 37, 337-344.
- O'BRIEN, R.L., PARKER, J.W., FRELINGER, J.A., DIXON, J.F.P., PHILLIPS, M.L. and GORDON, S.L. (1979). The role of cell surface glycoproteins in lymphocyte activation. The molecular Basis of immune cell function. (J.G.Kaplan ed.) p. 87-98.



OKUMURA, K., HERZENBERG, L.A., MURPHY, D.B., McDEVITT, H.O. and HERZENBERG, L.A. (1976). Selective expression of H-2 (i-region) loci controlling determinants on helper and suppressor T lymphocytes. J. Exp. Med. 144, 685-698.

OLD, L.J., BOYSE, E.A., and STOCKERT, E. (1963). Antigenic properties of experimental leukemias. I Serological studies "in vitro" with spontaneous and radiation induced leukemias. J. Nat. Cancer. Inst. 31, 977-983.

OPELZ, G., KIUCHI, M., TAKASUGI, M. and TERASAKI, P.I. (1975) Autologous stimulation of human lymphocyte subpopulations. J. Exp. Med. 142, 1327-1333.

ORTALDO, I.R., BONNARD, G.D. and HERBERMAN, R.B. (1977). Cytotoxic reactivity of human lymphocytes cultured in vitro. J. Immunol. 119, 1351-1357.

OTTERNES, I.G., TORCHIA, A.J. and BUVEN, M.L. (1979) Interaction of Levamisole and Mercaptans during thymocyte proliferation induced by Concanavalin-A. Cell. Immunol. 43, 62-69.

OWEN, F.L. and FANGER, M.W. (1976). Studies on the human T lymphocytes population. IV. The isolation of T lymphocyte antigen from peripheral lymphocytes. Immunochemistry. 13, 121-127.

OWEN, J.J.T., and RITTER, M.A. (1969). Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. J. Exp. Med. 129, 431-442.

PAPIERNIK, M., and BACH, J.F. (1977). Thymocyte subpopulations in young and adult mice. II. Study of steroid-resistant populations by means of a specific heteroantiserum. Eur. J. Immunol. 7, 800-803.

PARASKEVAS, F., ORR, K.B. and LEE, S.T. (1979). Macrophage-T-cell interactions: III. Production from T cells, under the influence of macrophages of a factor which complexes Ig and antigen. Cell. Immunol. 48, 15-30.

PASTERNAK, G.R., JOHNSON, R.J. and SHIN, H.S. (1978) Tumour cell cytostasis by macrophages and antibody in vivo. I. Resolution into contact-dependent and contact-independent steps. J. Immunol. 120, 1560-1566.

PEPYS, M.B. (1976). Role of complement in the induction of Immunological responses. Transplant. Rev. 32, 93-120.

PETERSON, P.A., CUNNINGHAM, B.A., BEGGARD, I. and EDELMAN, G.M. (1972). 2-microglobulin, a free immunoglobulin domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 1697-1701.

PETERSON, P.A., OSTBERG, L., and RASK, L. (1976). In Progress in differentiation research. (N. Muller-Berat ed.) p. 529.

PHILLIPS, S.M., STEPHENSON, J.R., GREENBERGER, J.S., LAMBE, P. E., and AARONSON, S.A. (1976). Release of xenotropic type c RNA virus in response to lipopolysaccharide: activity of lipid-A portion upon B lymphocytes. J. Immunol. 116, 1123-1128.

- PICKEL, K., HAMMERLING, U., and HOFFMAN, M.K. (1976). Lymphotype of T cells releasing T-cell replacing factor. Nature. 264, 72.
- PICHLER, W.J. and KNAPP, W. (1977). Receptors for IgM coated erythrocytes on chronic lymphocytic leukemia cells. J. Immunol. 118, 1010-1015.
- PICHLER, W.J. and KNAPP, W. (1978). Receptors for IgM on human B lymphocytes. Scand. J. Immunol. 7, 105-109.
- PICHLER, W.J., GENDELMAN, F.W. and NELSON, D.L. (1979). Fc receptors on Human T lymphocytes. III. Cytotoxic capabilities of human T γ , T μ , B and L cells. Cell. Immunol. 42, 410-417.
- POCHET, R., DELESPESE, G., GAUSSET, P.W. and COLLET, H. (1979). Distribution of β -Adrenergic receptors on human lymphocyte subpopulations. Clin. Exp. Immunol. 38, 578-584.
- PONZIO, N.M., DAVID, C.S., SHREFFLER, D.C. and THORBECKE, G.H. (1977). Properties of reticulum cell sarcomas in SJL/J mice. V. Nature of reticulum cell sarcoma surface antigen which induces proliferation of normal SJL/J T cells. J. Exp. Med. 146, 132-145.
- POPLACK, D.G., BONNARD, G.D., HOLIMAN, B.J. and LAISE, R.M. (1976). Monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity: a clinical test of monocyte function. Blood. 48, 809-816.

- PREUD'HOMME, J.L. (1977). Loss of surface IgD by human B lymphocytes during polyclonal activation. Eur. J. Immunol. 7, 191-193.
- PRIMI, D., HAMMARSTROM, L., MOLLER, E. and SMITH, C.I.E. (1979) Genetic control of effector cell. Characteristics: Con-A induced suppressor cells carry H-2 I region encoded determinants. Cell. Immunol. 47, 143-152.
- PTAK, W., NAIDORF, K.F., STRZYZEWSKA, J. AND GERSHON, R.K. (1979). Ontogeny of cells involved in the suppressor circuit of the immune response. Eur. J. Immunol. 9, 495-500.
- PYKE, K.W., RAWLINGS, G.A. and GELFAND, E.W. (1975). Isolation and characterization of the sheep erythrocyte receptor in man. J. Immunol. 115, 211-215.
- RABINOWITZ, T., LASKOC, R. and SCHLESINGER, M. (1978). Antigenic properties of lymph-node cells responding to allogeneic lymphocytes and to various concentration of lectins. Immunology. 34, 959-967.
- RAFF, M.C. and CANTOR, H. (1971). In "Progress in Immunology" (B. Amos ed.) Vol. 1. p. 83. Academic Press, New York.
- RAMSHAW, I.A., MCKENZIE, I.F.C., BRETSCHER, P.A. and PARISH, C.R. (1977). Discrimination of suppressor T cells of humoral and cell-mediated immunity by anti-Ly and anti-Ia sera. Cell. Immunol. 31, 364-369.

- RAO, K.M.K., SCHWARTZ, S.A. and GOOD, R.A. (1979). Modulation of the mitogenic response of lymphocytes from young and aged individuals by prostaglandins and Indomethacin. Cell. Immunol. 48, 155-165.
- RESCH, K. (1979). The role of the plasma membrane in the initiation of lymphocyte activation. In "The molecular Basis of Immune cell function" (J.G. Kaplan ed.) p. 109-125. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- RODBELL, M. (1972) In "Current topics in Biochemistry", Academic Press, New York, p. 187.
- ROLLINGHOFF, M., PFIZENMAIER, K., STARZINSKI-POWITZ, A. and WARGER, H. (1977). Generation of cytotoxic T lymphocytes against Ly alloantigen. Scand. J. Immunol. 6, 1121-1125.
- ROMAGNANI, S., MAGGI, E., LORENZINI, M., GINDIZI, G.M. and RICCI, M. (1979). Study of some properties of the receptor for IgM on human lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 36, 502-510.
- ROSS, G.D., POLLEY, M.I., ROBELLINO, E.M. and GREY, H.M. (1973). Two different complement receptors on human lymphocytes. One specific for C3b and one specific for C3b inactivator cleaved C3b. J. Exp. Med. 138, 798-783.
- SACHS, L. (1979). Control of cloning of normal human T lymphocytes by transferrin, albumin and different lectins. Clin. Exp. Immunol. 33, 495-498.

SACHS, D. and CONE, J. L. (1973). A mouse B-cell alloantigen determined by gene(s) linked to the major histocompatibility complex. J. Exp. Med. 138, 1289-1304.

SATO, H. and BOYSE, E. A. (1976). A new alloantigen expressed on B cells: the Lyb-2 system. Immunogenetics. 3, 565-572.

SATO, T., FUSE, A. and KUWATA, T. (1979) Enhancement by interferon of natural cytotoxic activities of lymphocytes from human cord blood and peripheral blood of aged persons. Cell. Immunol. 45, 458-463.

SAUSER, D., AUCKERS, C. and BRON, C. (1974). Isolation of mouse thymus-derived lymphocyte specific surface antigens. J. Immunol. 113, 617-624.

SCORNIK, J. C. and KLEIN, P. A. (1978a). Antibody dependent cell-mediated damage of target cells. Transplantation. 26, 356-357.

SCORNIK, J. C. and KLEIN, P. A. (1978b). Antibody-dependent lysis of tumor cells in vivo. I. Early lysis of tumor cells. J. Natl. Cancer Inst. 61, 1143-1147.

SCOTT, C. S. (1979). Maturation linked expression of the Fc(IgG) receptor on developing human bone marrow and peripheral blood granulocytes. Clin. Exp. Immunol. 38, 300-305.

SENOGLES, D. R., PAUL, P. S., JOHNSON, D. W. and MUSCOPLAT, C. C. (1979). Ontogeny of T cells, B cells, and monocytes in the bovine foetus. Clin. Exp. Immunol. 36, 299-303.

- SHAND, F.L. (1977). Ly and Ia phenotype of suppressor T cells induced by graft-vs-host reaction. Eur. J. Immunol. 7, 746-748.
- SHARON, N. (1977). Lectinas. I. y Ciencia. Agosto. p. 90-100.
- SHAW, G.M., LEVY, P.C. and LOBUGLIO, A.F. (1978). Human monocyte cytotoxicity to tumor cells. I. Antibody dependent cytotoxicity. J. Immunol. 121, 573-578.
- SHEARER, G.M., CUDKOWICZ, G., SCHMITT-VERHULST, A.M., REHN, T.G., WAKSAL, H. and EVANS, P.D. (1977). F₁ hybrid antiparental cell-mediated lympholysis: a comparison with bone marrow graft rejection and with all-mediated lympholysis to alloantigens. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 511-518.
- SHENKER, B.J. and GRAY, I. (1979). Cyclic nucleotide metabolism during lymphocyte transformation. I. Enzymatic mechanisms: Changes in cAMP and cGMP concentration in BALB/c mice. Cell Immunol. 43, 11-22.
- SHIELD, J.M. and EILKINSON, P.C. (1979). Relations between Fc receptor function and locomotion in human lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 38, 598-608.
- SHIGENO, N., HAMMERLING, U., APPELS, C., BOYSE, E.A. and OLD, L.J. (1968). Preparation of lymphocyte antibody from anti lymphocyte serum. Lancet. ii, 320-323.

SHIKU, H., KISIELOW, P., BEAN, M.A., TAKAHASHI, T., BOYSE, E.A., OETTGEN, H.F. and OLD, L.J. (1975). T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity "in vitro". Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. J.Exp.Med. 141, 227-241.

SHIMAMOTO, Y., NOMOTO, K., TANIGUCHI, K. and KUBO, C.H. (1979). Augmentation of antigen specific cytotoxicity by concanavalin-A at the peak of response to tumor allografts. Cell. Immunol. 47, 204-210.

SHREFFLER, D.C. and DAVID, C.S. (1975). The major histocompatibility complex and the I immune response region: Genetic variation, function and organization. Adv. Immunol. 20, 125-195.

SCHREFFLER, D.C., DAVID, C.S., PASSMORE, H.C. and KLEIN, J. (1971). Genetic organization and evolution of the mouse H-2 region: a duplication model. Transplant.Proc. 3, 176, 181.

SCHRIEBER, L. and PENNY, R. (1979) Tissue C3b receptors. Clin.Exp. Immunol. 38, 316-322.

SCHIRRMACHER, V. and HALLORAN, P. (1975) Independence of Fc receptors and Ia antigens on a variety of cells including cytotoxic K cells. Membrane receptors of lymphocytes (ed. by M.Seligmann, J.L. Preud'homme and Kurilsky, F.M.) p.267. Nort/Holland P.C., Amsterdam.

SILVER, D.M. and LANE, D.P. (1975). Dominant nonresponsiveness in the induction of autoimmunity to liver specific F antigen. J.Exp.Med. 142, 1455-1461.

SIMPSON, E., and BEVERLEY, P.C.L. (1977) In Progress in Immunology" (T.Mandel ed.) Vol.3.p.206. North/Holland P.C. Amsterdam.

SINGER, J. and NICOLSON, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 175, 720-731.

SINGH, J. and SINGH, A.K. (1979) Age related changes in human thymus. Clin.Exp.Immunol. 37, 507-511.

SINGH, U., MILLSON, D.S., SMITH, P.A., OWEN, J.J.T. (1979). Identification of β -Adrenoceptors during thymocyte ontogeny in mice. Eur.J.Immunol. 9, 31-35.

SITIA, R., ABBOTT, J. and HAMMERLING, U. (1979). The ontogeny of B lymphocytes. V. Lipopolysaccharide induced changes of IgD expression on murine B lymphocytes. Eur. J. Immunol. 9, 859-864.

SMITH, J.B. (1978). Stimulation of autologous and allogeneic human T-cells by B-cells occurs through separate B-cell antigen system. Cell. Immunol. 36, 203.

SMITH, J.W. and PARKER, C.W. (1970). The responsiveness of leukocyte cyclic adenosine monophosphate to adrenergic agents in patients with asthma. J.Lab.Clin.Med. 76, 993-1003.

SMITH, K.A., GILLIS, S. and BAKER, P.E. (1979). The role of soluble factors in the regulation of T-cell immune reactivity. The Molecular basis of immune cell function (J.G. Kaplan ed.) Elsevier North/Holland Biomedical Press, Amsterdam. p. 209-221.

SNARY, D., BARNSTABLE, D., BORMER, W.F., GOODFELLOW, P. and CRUMPTON, M.J. (1976). Isolation and N terminal amino acid sequence of membrane bound human HLA-A and HLA-B antigens. Cold Spring Harbor Symp. 41, 379-388.

SNELL, G.D., CHERRY, M., MCKENZIE, I.F.C. and BAYLEY, D.W. (1973). Ly-4 a new locus determining a lymphocyte cell surface alloantigen in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1108-1111.

SOBEL, A.T., GABAY, Y.E. and LAGRUE, G. (1976). Analysis of glomerular complement receptors in various types of glomerulonephritis. Clin. Immunol. Immunopath. 6, 94-101.

SPIEGELBERG, H.L. and DAINER, P.M. (1979) Fc receptor for IgG, IgM, and IgE on human leukaemic lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 35, 286-295.

STERLING, N. (1979) Lymphocyte transformation to PHA and delayed hypersensitivity related to age and previous cancer history. Clin. Exp. Immunol. 37, 352-358.

STOCKER, E., OLD, L.J. and BOYSE, E.A. (1971). The G-IX system. A cell surface alloantigen associated with murine leukemia virus; implications regarding chromosomal integration of the viral genome. J. Exp. Med. 133, 1334-1355.

STOUT, R.D. and HERZENBERG, L.A. (1975). The Fc receptor on thymus derived lymphocytes: II Mitogen responsiveness of T lymphocytes bearing the Fc receptor. J. Exp. Med. 142, 1041-1051.

STOUT, R.D. and HERZENBERG, L.A. (1975a). The Fc receptor on thymus derived lymphocytes. I. Detection of a subpopulation of murine T lymphocytes bearing the Fc receptor. J. Exp. Med. 142, 611-621.

STOUT, R.D., WAKSAL, S.D. and HERZENBERG, L.A. (1976). The Fc receptor on thymus derived lymphocytes. III Mixed lymphocyte reactivity and cell mediated lympholytic activity of Fc⁻ and Fc⁺ T lymphocytes. J. Exp. Med. 144, 54-68.

STUTMAN, O. and SHEN, F.W. (1978). H-2 restriction and non restriction of T-cell mediated cytotoxicity against mouse mammary tumour targets. Nature. 276, 181-182.

SULICA, A., GHERMAN, M., MEDESAN, C., SJOQUIST, J. and GHETIE, V. (1979). Ig-G binding sites on macrophage cell membrane I. Identification of two distinct Fc receptors on mouse peritoneal macrophages. Eur. J. Immunol. 9, 979-984

SULICA, A., GHERMAN, M., MEDESAN, C., GHETIE, V. and SJOQUIST, J. (1979). IgG binding sites on macrophage cell membranes. II. Mobility of Fc receptors induced by the interactions with their corresponding IgG ligands. Eur. J. Immunol. 9, 985-990.

- SULLIVAN, K.A., BERKE, G., and AMOS, D.B. (1973). An antigenic determinant of cytotoxic lymphocytes. Transplantation. 16, 388-391.
- SWAIN, S.L. and PANFILLI, P.R. (1979), Helper cells activated by allogeneic H-2K or H-2D differences have a Ly-phenotype distinct from those responsive to I differences. J. Immunol. 122, 383-391.
- TADA, T., TAKEMORI, T., OKUMURA, K., NONAKA, M. and TOKUHISA, T. (1978) Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia⁻ and Ia⁺ helper T cells. J. Exp. Med. 147, 446-458.
- TADA, T., TANIGAKI, N. and PRESSMAN, D. (1978). Human cell membrane components bound to β_2 -microglobulin in T cell type cell lines. J. Immunol. 120, 513-519.
- TADA, T., TANIGUCHI, M. and OKUMURA, K. (1977). In "Progress in Immunology" (T. Mandel ed.) Vol. 3, p. 369. North/Holland P.C. Amsterdam.
- TEODORESCU, M., MAYER, E.P. and DRAY, S. (1977). Identification of five human lymphocyte subpopulations by their differential binding of various strains of bacteria. Cell. Immunol. 29, 353-362.
- THOMAS, D.W., YANMASHITA, U., and SHEVACH, E.M. (1977). Nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes. IV. Inhibition of antigen-specific T-cell proliferation by antibodies stimulator Ia antigens. J. Immunol. 119, 223-226.

TREVES, A.J. BARAK, V. and FUKS, Z. (1979). In vitro proliferation of macrophage depleted human peripheral blood lymphocytes. Clin. exp. Immunol. 38, 531-538.

TREVES, A.J. HEIDELBERG, E., FELDMAN, M. and KAPLAN, H.S. (1978) In vitro sensitization of human lymphocytes against histiocytic lymphoma cell lines: II. Characterization of three different effector activities and suppressor cells. J. Immunol. 121, 86-90.

TUNG, J.S., MICHAELSON, J. SATO, H., VITETTA, E.S. and BOYSE, E. A. (1977). Immunogenetics, 5-485.

VADAS, M., MILLER, J.F.A.P., MCKENZIE, I.F.C., CHISM, S.E., SHEN, F.W., BOYSE, E.A., GAMBLE, J.R. and WHITELAW, A.M. (1976) Ly and Ia antigen phenotypes of T cells involved in delayed type hypersensitivity and in suppression. J. Exp. Med. 144, 10-19.

VITETTA, E.S. and CAPRA, J.D. (1978). The protein products of the murine 17th chromosome: genetics and structure. Adv. in Immunol. vol, 26, 147-191.

VITETTA, E.S., UHR, J.W., and BOYSE, E.A. (1975). Association of a β_2 -microglobulin like subunit with H-2 and TL alloantigens on murine thymocytes. J. Immunol. 114, 252-254.

WAGNER, H., FELDMAN, M., BOYLE, W and SCHRADER. (1979) Cell mediated immune responses in vitro. III. The requirement for macrophages in cytotoxic reactions against cell bound and subcellular alloantigens. J. Exp. Med. 136, 331-335.

- WANG, J.L. and EDELMAN, G.M. (1978). Binding and functional properties of Concanavalin-A and its derivatives. J. Biol Chem. 253, 3000-3007.
- WATANABE, N., KOJIMI, S., SHEN, F.W. and OVARY, Z. (1977). Suppression of IgE antibody production in SJL mice. II. Expression of Ly-1 antigen on Helper and nonspecific suppressor T cells. J. Immunol. 118, 485-488.
- WATCHEL, S.S., KOO, G.C. and BOYSE, E.A. (1975). Evolutionary conservation of H-Y ("male") antigen. Nature. 254, 270-272.
- WEITZMAN, S., SHEN, F.W. and CANTOR, H. (1976). Maintenance of hyporesponsiveness to antigen by a distinct subclass of T lymphocytes. J. Immunol. 117, 2209-2212.
- WEKSLER, M.E., KUNTZ, M.M., BIRNBAUM, G. and INNES, J.B. (1978) Lymphocyte transformation induced by autologous cells. Fed. Proc. 37, 2373.
- WETTSTEIN, P.J., BAILEY, D.W., MOBRAATEN, L.E., KLEIN, J. and FRELINGER, J.A. (1978). T lymphocyte response to H-2 mutants. I. Proliferation is dependent on Ly-1⁺2⁺ cells. J. Exp. Med. 147, 1395-1404.
- WILSON, C.B. and LITTLE, J.R. (1979). Inhibition of modulation of thymus leukemia antigen by concanavalin-A. Cell. Immunol. 44, 416-423.
- WILLIAMS, A.F., BARCLAY, A.N., LETARTE-MUIRHEAD, M. and MORRIS, R.J. (1976). Many cells in rat bone marrow have cell surface Thy-1 antigen. Cold. Spring Harbor Symp. 41, 51-59.

WILLIAMS, L.T., SNYDERMAN, R. and LEFKOWITZ, R. (1976). Identification of beta-adrenergic receptors in human lymphocytes by ^3H -alprenolol binding. J.Clin.Invest. 57, 149-155.

WINCHESTER, R.J., HOFFMAN, T., FERRARINI, M., ROSS, G.D. and KUNKEL, H.G. (1979). Comparaison of various test for Fc receptors on different human lymphocyte subpopulations. Clin.Exp.Immunol. 37, 126-133.

WINN, H.J., STEVENS, L.C. and SNELL, G.D. (1958). Transplant. Bull. 5, 18.

WOODY, J.N. (1977). Ly-6 is a T-cell differentiation antigen. Nature. 269, 61-63.

WOODY, J.N., FELDMANN, M., BEVERLY, P.C., and MCKENZIE, I.F.C. (1977). Expression of alloantigens Ly-5 and Ly-6 on cytotoxic effector cells. J.Immunol. 118, 1739-1743.

WRIGHT, R.K. and COOPER, E.L. (1979). Activation of Leopard Frog (*Rana pipiens*) spleen lymphocytes by Concanavalin-A and Phytohemagglutinin. Cell. Immunol. 48, 222-230.

YACHNIN, S. (1976). Demonstration of the inhibitory effect of human α -FP on in vitro transformation of human lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 73, 2857-2861.

YACHNIN, S. and LESTER, E. (1976). Inhibition of human lymphocyte transformation by human alphaphoetoprotein (HAFP); comparaison of foetal and hepatoma HAFP and kinetic studies of in vitro immunosuppression. Clin.Exp.Immunol. 26, 484-490.

- YOUDIM, S. (1979). Enhancing and suppressive effects of macrophages on T-lymphocyte stimulation in vitro. Cell. Immunol. 45, 377-388.
- YOSHIDA, T. O. and ANDERSON, B. (1972). Evidence for a recognizing antigen complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes. Scand. J. Immunol. 1, 401-407.
- YOUNG, C. R., DEACON, N. J., EBRINGER, A. and DAVIES, D. A. L. (1976). Genetic control of the immune response to ferritin in mice. Immunogenetics. 3, 199-205.
- YU, J., FISCHMAN, D. A. and STECK, T. L. (1973). J. Supramolec. Struc. 1, 233-248.
- YUTOKU, M., GROSSBERG, A. L., STOUT, R., HERZENBERG, L. A. and PRESSMAN, D. (1976). Further studies on Th-B, a cell surface antigenic determinant present on Mouse cells, Plasma cells and Immature thymocytes. Cell. Immunol. 23, 140-157.
- ZEILLER, K. and PASCHER, G. (1973). Detection of T and B cell-specific heteroantigens on electrophoretically separated lymphocytes of the mouse. Eur. J. Immunol. 3, 614-618
- ZIEGLER, J. B., ALPER, C. A. and BALNER, H. (1975). Properdin factor B and histocompatibility loci linked in the rhesus monkey. Nature. 254, 609-611.

ZIELSKE, J.V. and GOLUB, S.M. (1976). Fetal calf-serum induced blastogenic and cytotoxic responses of human lymphocytes. Cancer Res. 36, 3842-3846.

ZIGHELBOIM, J., BONAVIDA, B. and FAHEY, J.L. (1973). Evidence for several cell population active in antibody-dependent cellular cytotoxicity. J. Immunol. 111, 1737-1742.