

6
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



"INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR POR
FACTORES SOLUBLES LIBERADOS DE
TUMORES PULMONARES"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ISIDRO GABRIEL ANGELES PEREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

INTRODUCCION

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Vigilancia Inmunológica | 4 |
| 1.2 | Respuesta inmune en cáncer | 18 |
| 1.3 | Mecanismos de evasión a la respuesta inmune | 45 |

ANTECEDENTES

| | | |
|-----|--|----|
| 2.1 | Supresión de la respuesta inmune por células T | 54 |
| 2.2 | Supresión de la respuesta inmune por el macrófago. | 67 |
| 2.3 | Supresión de la respuesta inmune mediante la liberación de productos solubles por las células tumorales. | 73 |

OBJETIVO 80

MATERIAL Y METODOS

| | | |
|-----|---|----|
| 4.1 | Líneas celulares. | 82 |
| 4.2 | Obtención de células mononucleares sanguíneas | 84 |
| 4.3 | Co-cultivo de células mononucleares sanguíneas y células tumorales. | 85 |
| 4.4 | Estimulación mitogénica. | 89 |
| 4.5 | Cosecha celular y determinación de la incorporación radiactiva. | 90 |
| 4.6 | Determinación de la inhibición en la proliferación celular. | 90 |
| 4.7 | Análisis estadístico. | 91 |

RESULTADOS

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | Inhibición de la proliferación celular en función del tiempo. | 92 |
|-----|---|----|

| | | |
|-----|--|----|
| 5.2 | Inhibición de la proliferación celular como <u>con</u> secuencia de la densidad de células tumorales. | 93 |
| 5.3 | Estimulación mitogénica. | 94 |
| 5.4 | Inhibición de la proliferación celular. | 98 |

DISCUSION DE RESULTADOS

| | | |
|-----|--|-----|
| 6.1 | Selección del sistema de cultivo y estableci-- miento de condiciones experimentales. | 101 |
| 6.2 | Estimulación mitogénica. | 104 |
| 6.3 | Inhibición de la proliferación celular. | 106 |
| 6.4 | Características asociadas a los factores solu <u>u</u> bles liberados por los tumores pulmonares. | 109 |

| | |
|---------------|-----|
| CONCLUSIONES. | 112 |
|---------------|-----|

| | |
|---------------|-----|
| BIBLIOGRAFIA. | 114 |
|---------------|-----|

INTRODUCCION

Los mamíferos tienen la capacidad de reconocer y eliminar gran variedad de agentes patógenos, la cual está conferida a su sistema inmune, y solo en tal condición se puede definir a los individuos inmunocompetentes.

En el sistema inmune, los principales componentes celulares son los linfocitos, macrófagos y linfocitos granulares gigantes (LGL), por otra parte sus respectivos productos celulares constituyen a los componentes moleculares. La síntesis de esos productos celulares y la existencia de otras moléculas que le confieren funciones importantes a las células mencionadas, están restringidas por los componentes genéticos del sistema.

Al parecer el sistema inmune es la forma natural de resistencia a las enfermedades infecciosas y algunas otras patologías, las neoplasias por lo tanto no serían la excepción.

Por otro lado, debe considerarse que las neoplasias en un individuo son el producto de la transformación de las células normales, en la que se incluyen alteraciones morfológicas, funcionales y estructurales provocadas por diversos factores, los cuales pueden ser:

- Factores físicos: Radiactividad y luz ultravioleta principalmente.
- Factores químicos: Existe una larga lista de sustancias cancerígenas que consideran a los hidrocarburos cíclicos y ami-

nas aromáticas cuyos efectos se relacionan con la dosis y tiempo_ de exposición.

- Factores biológicos: Integrados por virus (ADN y ARN virus) y parásitos intratisulares (Esquistosomas y Cisticercos).

Una vez que se ha manifestado el desarrollo neoplásico en un organismo, se generan una serie de complejas interacciones entre -- los componentes inmunes del hospedero y las células tumorales, que se pueden englobar en tres procesos importantes:

A) El reconocimiento precoz por parte del hospedero, de la transformación maligna in situ es una de las formas que ayuda a eliminar las células transformadas, proceso al que se le conoce como Vigilancia Inmunológica.

B) Posteriormente al establecimiento de una célula neoplásica, se presentan algunos eventos celulares que condicionan al sistema - inmune para iniciar una respuesta específica y eficiente cuyo objetivo es eliminar el desarrollo tumoral. Lo anterior equivale a la - activación y establecimiento de una respuesta inmune específica.

C) En ocasiones los mecanismos inmunes del hospedero, no resul-- tan del todo eficientes para finalizar con el desarrollo tumoral y_ por otro lado, cada célula tumoral o su conjunto logran eludir a la respuesta inmune, proliferando exageradamente con la alternativa de iniciar su desarrollo en sitios diferentes al original (Metásta--sis) (1).

A continuación en una forma un poco más amplia se tratará de -
describir estos tres tipos de procesos.

1.1 VIGILANCIA INMUNOLOGICA

Este concepto pretende explicar como algunos componentes del sistema inmune impiden el desarrollo de las células transformadas.

Las ideas originales y precursoras de este concepto enuncian:

"Los mecanismos del hospedero que controlan el desarrollo maligno, están a cargo de las células que constituyen la inmunidad natural". Sugiriendo que la inmunidad celular, es la primera línea de defensa en contra del desarrollo transformado (Paul Ehrlich 1909).

Al tratar de justificar la eficiencia de la inmunidad celular en el rechazo a tumores, que a la par se investigan con el rechazo a tejidos transplantados, Lewis Thomas en 1959 sugirió que los organismos multicelulares requieren de la preservación de un tipo celular homogéneo, eliminándose aquellas células que se consideren diferentes o simplemente modificadas (2,3).

Finalmente se logró obtener una definición amplia del concepto de vigilancia inmunológica, enunciando que, para rechazar algo que es extraño o diferente debe reconocerse previamente lo propio, con la condición de eliminar posteriormente las clonas autoreactivas y evitar problemas de autoinmunidad.

Lo propio, son componentes estructurales o marcadores presentes en todas las células del organismo, para establecerse en todo momento o cuando se requiera ese reconocimiento. La naturaleza química -

de los marcadores puede ser común, pero cada uno manifestar configuración molecular diferente. Por lo tanto, el control de la proliferación celular está relacionado al reconocimiento de los marcadores sobre los diferentes tipos celulares.

"Cuando células aberrantes, con diferente potencial proliferativo surgen en el cuerpo, estas pueden ser portadoras de nuevos marcadores sobre su superficie, lo que sugiere la presencia en cierta cantidad de un antígeno nuevo, en tal condición una respuesta timo-dependiente puede iniciarse para la eliminación de esas células aberrantes" (Frank Macfarlane Burnet 1970) (3).

Con estos antecedentes resultaba fácil identificar las condiciones que se proponen necesarias para el buen desempeño de la vigilancia inmunológica.

- La existencia de antígenos asociados al tumor deben distinguir las células neoplásicas de las células normales, lo que genera una respuesta de las células inmunocompetentes hacia el tumor.

- Este tipo de reconocimiento es antígeno específico y resulta aplicable como una forma de regular la proliferación y diferenciación de gran variedad de células normales (regulador de la normalidad).

Esta fué la teoría original de la vigilancia inmunológica; indicando que sólo las células de linaje T son dotadas con capacidad de reconocer y eliminar los tumores que surgen en ciertas etapas de la

vida de un individuo (4,5,6,11). La teoría debería comprobarse con la existencia de ratones desnudos ya que al carecer de timo, serían incapaces de montar una respuesta inmune (individuos inmunodeficientes), condición que parecía correlacionarse con la susceptibilidad al desarrollo de tumores.

Sin embargo, en estos animales se observó la capacidad de eliminar el crecimiento tumoral. Lo anterior originó gran especulación sobre la participación de la célula T en la inmunovigilancia, por lo que se consideró la presencia de un nuevo tipo celular.

En la actualidad se ha generado un nuevo modelo de vigilancia inmunológica en el que se incluyen probablemente, diferentes tipos de reconocimiento antigénico, manteniendo cierta especificidad sobre la célula blanco. En este primer mecanismo de defensa se propone la existencia y actividad de otras células como son:

- célula NK (asesina natural)
- macrófago (4,6).

Estas células presentan una actividad específica sobre su célula blanco, la cual no está restringida por el reconocimiento de estructuras codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, y no requieren de un proceso previo de activación para ejercer su actividad citotóxica (8,11).

CELULAS NK (asesinas naturales)

Aproximadamente hace 16 años al realizar experimentos de cito-

toxicidad, se descubrió que en la población de células mononucleares existía una subpoblación celular que manifestaba una citotoxicidad espontánea in vitro, en contra de varias células en las que se incluyen células infectadas con virus, células hematopoyéticas inmaduras y células tumorales. La célula responsable de esta actividad resultó ser diferente, funcional y morfológicamente a los linfocitos así como al macrófago por lo que se denominó en base a su actividad, como una célula asesina natural (9).

Características morfológicas y fenotípicas:

La concentración de estas células en un individuo normal es de aproximadamente 0.6-2.5% respecto a la cantidad total de linfocitos y están definidas como linfocitos granulares gigantes (LGL) por presentar un gran citoplasma en relación a su núcleo y algunos gránulos azurófilos en su citoplasma. Las técnicas microscópicas y tintoriales demuestran una célula de tamaño mediano (menor a 20μ) con un núcleo redondo y cromatina condensada, además de la existencia de un gran nucléolo. En el citoplasma está incluido un aparato de Golgi demasiado extendido y numerosas vesículas o gránulos. El contenido de los gránulos son enzimas hidrolíticas que al parecer son responsables de algunos mecanismos citotóxicos (7,9). Estas células no se adhieren a ningún tipo de superficie (vidrio o plástico) y no son fagocíticas (8).

A pesar de no tener un origen tímico y no pertenecer al linaje mielomonocítico, comparte algunos marcadores con la célula T y el -

macrófago. En su superficie existen receptores para la fracción -- constante (Fc) de las inmunoglobulinas de la clase IgG, así como receptores para fracciones del sistema del complemento (C₃b). Otros - marcadores compartidos con la serie monocítica son Leu-11 (CD-16) y Mac-1 (CD-11).

Por otro lado los marcadores compartidos con la población de - células T son: Leu-19 o HNK-1 (CD-56), CD-10, Leu-7 (CD-57) y un receptor para eritrocitos de carnero (SRBC) de baja afinidad (9,10,-- 11).

Características funcionales:

El origen y diferenciación de estas células es en la médula -- ósea por lo que al llegar a la circulación sanguínea, donde normal- mente se encuentran, ya son células maduras y activas. Estudios his- toquímicos establecen que la presencia y actividad de la célula NK_ no esta restringida a la circulación sanguínea, pues también se han encontrado revistiendo la lámina propia de los tejidos (9).

Inicialmente se consideró que su acción era inespecífica, pero al realizar estudios competitivos de reconocimiento celular se lo- gró demostrar que la célula NK es selectiva y específica sobre su - blanco (9,10). La actividad citotóxica de esta célula se inicia con el reconocimiento de ciertas moléculas sobre la superficie de la -- célula blanco. Se desconoce la naturaleza de las moléculas en esta_ interacción celular, y sólo algunos reportes presumiblemente determinan_ que las moléculas de reconocimiento son proteínas y glicoproteínas -

de superficie denominadas integrinas. Además otros reportes describen la participación del heterodímero δ (TCR) y por supuesto la molécula LFA-1 que ayuda a estabilizar la adherencia celular (9,10,11,12). En relación a la célula blanco quedan excluidas las moléculas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (clase I,II) pues la línea celular sensible a la actividad de la célula NK carece de este tipo de moléculas (línea K-652) (9).

Inmediatamente después del reconocimiento de estructuras específicas sobre la célula blanco, existe una íntima interacción entre las membranas citoplasmáticas de la célula efectora y la célula blanco, el único requisito para que este evento se realice es una adecuada concentración de iones divalentes en especial de iones Mg^{++} (proporcionando la fuerza iónica necesaria o estableciendo puentes de unión), no importando la temperatura del medio (límites de 4-38 °C).

Posteriormente a la unión celular, ocurre una serie de eventos intracelulares en la célula efectora denominados como activación y programación para la lisis, los cuales requieren de una temperatura y concentración osmótica óptima. Durante el evento de programación lítica se ha demostrado que la célula libera un factor soluble de naturaleza proteica que se ha denominado como el factor citotóxico de la célula NK (NKCF), el cual manifiesta una actividad lítica potente cuando se une a las glicoproteínas de superficie de la célula blanco. La liberación de este factor soluble es una respuesta al estímulo inducido por la interacción específica con otra célula.

Otro evento que se realiza durante esta fase es la polarización o rearrreglo de gránulos y organelos citoplásmicos hasta el sitio de unión celular.

Una vez terminada la etapa de programación lítica ocurre la liberación del material contenido en los gránulos, que es una proteína de peso molecular aproximado a 60 Kd. y cuya actividad citolítica depende de una concentración óptima de calcio.

Con el uso de imágenes ultraestructurales que proporciona un microscópio electrónico, se ha demostrado que el daño generado a la célula blanco por el contenido granular, es el resultado de la polimerización de pequeñas estructuras monoméricas de forma circular, que al polimerizarse forman complejos estructurales de forma tubular, los cuales se insertan en la membrana celular atravesando la bicapa lipídica (la forma del daño provocado es similar al generado por el componente C₉ del complemento), para finalmente causar la destrucción de la célula blanco al estallar en forma inevitable por el desequilibrio osmótico causado (7,13).

MONOCITO/MACROFAGO

Esta célula se origina en la médula ósea a partir de una célula pluripotencial común a todas las células hematopoyéticas..

Las características que distinguen a esta célula como un tipo celular diferente son:

Características morfológicas

Es una célula mononuclear, con un diámetro aproximado de 15-20 μm , contiene un núcleo dentado y su citoplasma parece contener una ligera cantidad de gránulos azurófilos, que son sintetizados en la última etapa de maduración y son positivos a la mieloperoxidasa. En la superficie de esta célula existe gran cantidad de receptores que pueden dividirse en:

A) Receptores involucrados directamente con las funciones inmunes como son:

- Receptor para la fracción constante de las moléculas de inmunoglobulinas de clase IgG y un menor número de receptores -- para inmunoglobulinas de clase IgE.
- Receptores para algunas fracciones del complemento (C3b, -- C3d).
- Receptores para citocinas y factores de crecimiento.

B) Receptores involucrados indirectamente con las funciones inmunes:

- Receptores para hormonas.
- Receptores para lipoproteínas y apolipoproteínas.
- Receptores para enzimas (lactoferrina, transferrina, fibrina fibrinógeno, fibronectina) (15,22).

El manifestar este tipo de moléculas de superficie además de realizar su función biológica encomendada, ofrece la ventaja de ca-

racterizar a estas células (15,22).

Características funcionales:

Las diferentes actividades del macrófago se pueden dividir en dos categorías: funciones efectoras y funciones reguladoras (22).

Estas funciones tienen primordial importancia en diversas patologías pero de acuerdo al tema referido se hará la descripción de sus funciones relacionadas a los procesos neoplásicos.

Funciones efectoras:

Una de las características funcionales del macrófago es su participación en la vigilancia inmunológica, que se inicia por el reconocimiento de materiales extraños, para eliminarlos y/o destruirlos.

Cuando nos referimos al reconocimiento de antígenos tumorales, la destrucción de las células neoplásicas puede realizarse por alguno de los mecanismos citotóxicos siguientes.

- Citostasis: A través de una serie de factores liberados por el macrófago se puede regular las funciones de otras células manteniéndolas en un estado de inanición que posteriormente causará la muerte. Un ejemplo de este proceso es la liberación de arginasa, cuyo efecto se traduce en el agotamiento de arginina, nutriente necesario para la célula tumoral.

Otro ejemplo es la liberación de factores inhibidores de la --

proliferación celular (16).

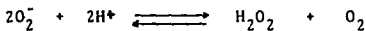
- Citotóxicidad y/o muerte celular:

Los macrófagos desarrollan la capacidad de identificar y eliminar a las células neoplásicas, esta actividad se realiza mediante la unión de la célula efectora y la célula blanco, provocando la secreción de varios productos celulares citotóxicos, en los que se -- incluyen enzimas proteolíticas, enzimas hidrolíticas (16,20), meta-bolitos reactivos de oxígeno, factor de necrosis tumoral (cuya actividad puede ser independiente o concertada con otras citocinas) e interferón (16,19).

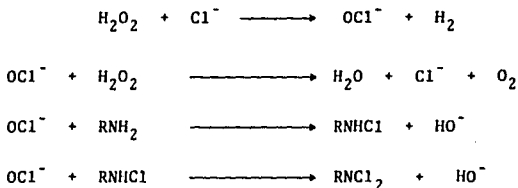
El monocito sanguíneo más que el macrófago tisular realiza su actividad citotóxica a través de la liberación de productos reactivos de oxígeno (20), debido a que dentro de su metabolismo normal - se encuentra la actividad enzimática de la mieloperoxidasa y la superóxido dismutasa; enzimas que parecen estar ausentes o con muy -- baja actividad en el macrófago tisular (16,17).

A continuación se plantean una serie de reacciones químicas, - catalizadas por estas enzimas y en las que se generan los metabolitos reactivos de oxígeno, que son altamente tóxicos.

Super oxido-dismutasa



Mieloperoxidasa



peróxido de hidrogeno (H_2O_2), ion superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (OH^-), ácido hipocloroso (HOCl) y cloraminas (RNHCl , RNC1_2) -- son los productos tóxicos, y su producción parece estar influenciada por el interferón ($\text{IFN-}\gamma$) (24).

Aunque existen varias maneras de que el monocito o el macrófago generen actividad citotóxica ya sea por los sistemas enzimáticos mencionados o por otros sistemas, se siguen reportando factores citotóxicos que no están definidos ampliamente y lo único que se conoce es que son factores termoestables, resistentes a la digestión -- enzimática o bien son inhibidores de enzimas importantes del metabolismo celular (16,18,23).

Por otro lado el factor de necrosis tumoral producido por el macrófago está referido como una molécula trimérica no glicosilada (caquetina) que corresponde al factor de necrosis tumoral tipo alfa ($\text{TNF-}\alpha$), y aunque difiere ligeramente en cuanto a su estructura -- con el tipo beta, también tiene efectos citostáticos y citolíticos sobre las células tumorales, (El factor de necrosis tipo beta, se -

ha indicado como una linfotoxina producido por la célula T) (28,64, 77,84,85,87,88).

La mayoría de las sustancias que liberan los macrófagos requieren de ciertos eventos particulares para realizar su actividad biológica en forma efectiva como son:

- La liberación de factores citostáticos y/o citolíticos debe ser directamente sobre la superficie de la célula blanco como un mecanismo enfocado y concentrado de secreción, similar a los realizados por los neutrófilos.
- La actividad de los factores liberados, sólo debe manifestarse -- sobre la célula blanco.
- Para el cumplimiento de los puntos anteriores debe simultáneamente presentarse una última condición; que la distancia mínima entre la célula efectora y la célula blanco debe ser de 100-200 Å para que en este espacio, se concentren los productos secretados, evitándose en lo posible la difusión y/o dilución (16,19).

Mucho se ha criticado que la actividad citotóxica natural del macrófago es inespecífica y aún más el reconocimiento de su blanco, pero actualmente existen evidencias experimentales que apoyan lo -- contrario. Una de las moléculas de superficie, que está implicada en el reconocimiento celular, es una glicoproteína denominada molécula asociada a la función linfocitaria LFA-1, que además de participar en la unión celular, estabiliza la adherencia con las células tumo-

rales (23).

- Fagocitosis: Esta actividad ya descrita desde 1883 por Elie Metchnikoff, propone al macrófago como la célula fagocítica de todo organismo, pero es necesario reconsiderar que dentro de esta actividad aparentemente sin precedente, se involucra una de las funciones importantes encomendadas únicamente a ciertas células, como es el poder regular la respuesta inmune, ya que la ingestión del material particulado (microorganismos y/o productos de la lisis de células neoplásicas) tendrá como destino:
 - La degradación en el interior de la célula y una posterior presentación en la superficie celular, de pequeños fragmentos (determinantes antigénicos) del material originalmente fagocitado(22).

Funciones reguladoras:

- Presentación antigénica: El inicio de una respuesta inmune específica radica en la presentación del antígeno (determinantes antigénicos) en asociación con moléculas de clase II, codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (22).

La presencia de moléculas de clase II es condición importante para realizar esta actividad y aunque la densidad de estas moléculas sobre la superficie del macrófago es baja existen otras moléculas que pueden regular su expresión, como por ejemplo IFN- γ (interferón gamma).

Para cumplir con su función de célula presentadora de antígeno (CPA) y proponerse como una eficiente célula reguladora, el macrófago es capaz de sintetizar y secretar IL-1 (interleucina 1), -- que es una función accesoria en la presentación antigénica (22).

- Supresión: El macrófago puede también interferir con las funciones de otras células, situación que redundará en la inhibición de la respuesta inmune. Esta actividad la realiza a través de dos mecanismos principales

i.- Liberación de prostaglandinas

ii.- liberación de otros productos diferentes
a las prostaglandinas (16).

(este tema será revisado y ampliado en la sección de supresión de - la repuesta inmune).

1.2 RESPUESTA INMUNE EN CANCER

Una célula que manifiesta alteraciones genéticas, funcionales, morfológicas y antigénicas es la mejor descripción que se puede -- hacer de una célula tumoral (26,27).

Por otro lado la inmunología tumoral, está cimentada en el reconocimiento de esas moléculas cualitativa y cuantitativamente diferentes o mejor definidos como antígenos tumorales. Aún se desconoce la naturaleza exacta de estos antígenos y sólo a través de técnicas serológicas o celulares se logra una clasificación que en mucho ayuda a su comprensión (28,29,30).

Antígenos tumorales (26-31).

- Antígenos de diferenciación celular: solamente son expresados durante la división celular y pueden ser comunes entre células normales y células tumorales. Esta clase de antígenos pueden ser es pecíficos para un tipo de tejido o grupo de tejidos.

- Antígenos de histocompatibilidad: En esta categoría se inclu yen antígenos expresados en forma similar a los tejidos normales, -- nos referimos exclusivamente a las moléculas de clase I, pues es -- una molécula expresada comúnmente por todas las células del organis mo.

- Antígenos fetales: Esta clase de antígenos pueden estar en -- la superficie celular o en la circulación sanguínea. Por lo regular

no son inmunógenos en el hospedero autóctono y su presencia se debe a la falta de represión genética, derivada de la transformación maligna.

- Antígenos expresados por oncogenes: Las alteraciones genéticas de la célula tumoral no suceden en todo el ADN sino en algunos fragmentos (genes) y la expresión de esos genes pueden ser productos característicos de la célula tumoral.

- Antígenos nuevos o específicos del tumor: La transformación celular provoca que algunos de sus productos expresados aberrantemente sea en forma exclusiva. En esta categoría se incluyen antígenos de tumores espontáneos (26-31).

En el inicio de esta introducción se mencionó que en los individuos inmunocompetentes existen tres tipos de interacciones entre las células tumorales y las células inmunes del hospedero, anteriormente ya fué descrito el proceso de vigilancia inmunológica, como un reconocimiento precoz de la transformación maligna, otorgándole un carácter de selectivo más que específico. Ahora toca el turno a la descripción del establecimiento de una respuesta inmune específica en contra de las neoplasias y al igual que cualquier otro proceso biológico es necesario el cumplimiento de los siguientes requisitos para que se realice:

A.- La clona tumoral debe expresar un antígeno específico y/o liberarlo, pero debe aparecer en el inicio del desarrollo tumoral y no modificar su expresión.

B.- El antígeno tumoral debe ser capaz de estimular la respuesta inmune del hospedero (ser inmunógeno).

C.- El sistema inmune del hospedero debe ser capaz de reconocer y responder en contra del antígeno tumoral (inmunocompetencia).

D.- El sistema inmune del huésped no debe ser tolerante al antígeno tumoral.

E.- La respuesta inmune debe dar por resultado un mecanismo -- efector apropiado que afectara la viabilidad y/o el crecimiento de las células tumorales.

F.- No deben ser bloqueados los mecanismos efectores en contra de las células tumorales, para mantener vigente la inmunidad.

Una vez cumplidos estos requisitos la respuesta inmune parece establecerse en dos etapas o fases:

- Fase inductora de la respuesta inmune.

La existencia de antígenos tumorales, como productos liberados de la célula tumoral (per se) o como productos de la lisis celular (vigilancia inmunológica) induce a que las células fagocíticas ingeran este material antigénico.

La fagocitosis aunque es considerada como el más primitivo mecanismo de defensa, involucra a una de las actividades reguladoras de la célula presentadora de antígeno (CPA), pues el destino del material fagocitado es su degradación en el interior de la célula -

y posterior presentación sobre la superficie celular como pequeñas - fracciones del antígeno (Determinantes antigénicos) asociadas con -- las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad_ (MHC) (23,33,38).

La expresión de estas moléculas de superficie (MHC clase II) - está restringida a células con la función de CPA y en ellas se incluyen a las células dendríticas, macrófagos, células B, células de Langerhans y células endoteliales.

La función principal de las moléculas de clase II codificadas_ por el MHC, es el unir péptidos exógenos, para su presentación espe- cífica a la célula T.

Por otro lado el reconocimiento antigénico lo realiza una sub- población de células T con el fenotipo regulador/cooperador CD-4+, _ y que son portadoras de un receptor para la asociación del antígeno y de las moléculas de clase II (MHC). Este receptor es un heterodí- mero polimórfico formado de cadenas α , β , que se asocia al comple- jo CD-3 (complejo molecular formado de cinco subunidades) (40,44,-- 52,53).

Cuando el receptor de la célula T interacciona con los antige- nos mostrados por la CPA en el contexto de los productos del MHC, - se inicia la activación del linfocito T. La liberación de sustancias solubles (citocinas) por parte de la CPA, en la que se destaca la - interleucina-1 (función accesoria de la célula presentadora), culmi- na con este proceso de activación (15,16,22).

Fase efectora de la respuesta inmune:

Una vez lograda la activación de la célula T reguladora CD-4⁺, se induce la producción de IL-2 y su receptor (32-40), lo que es un evento central en la respuesta inmune, y según el grado de interacción entre IL-2 con los receptores de otras células T determinan la magnitud y duración de la respuesta inmune, que se refleja en la -- proliferación de los linfocitos T reguladores y en la producción de mediadores solubles con diferente actividad biológica(37,78,79).

La amplificación de la respuesta inmune, es tarea única del - linfocito T regulador/cooperador, sin embargo. los mediadores solubles liberados por estas células participan principalmente en la ac tivación de las diferentes células involucradas en la fase efectora de la respuesta inmune (32-40), es decir en:

- La diferenciación y activación del linfocito pre-T citotóxico,
- La estimulación del linfocito B,
- La generación de células asesinas activadas con linfocinas (C. -- LAK),
- Estimular las actividades citotóxicas de la célula Nk y el macrófago (mecanismos efectores accesorios).
- Así como controlar la proliferación y actividad de células granulocíticas.

LINFOCITO T CITOTOXICO

La citotoxicidad celular representa un importante mecanismo de

defensa en contra de microorganismos patógenos, parásitos, virus, y principalmente de células tumorales. Esta actividad no está restringida a un sólo tipo de células citotóxicas, sino que se incluyen varios tipos, con un común denominador, que es la liberación de sustancias tóxicas, para provocar daño.

Las diferencias encontradas en los tipos de células citotóxicas son referentes a la forma y condiciones necesarias que se deben de reunir para iniciar su actividad.

Desde 1960 Govaerts (42), al trabajar con transplantes alogénicos de tejido en modelos animales, empezó a conocer las características de activación de la célula T citotóxica en el organismo de la mayoría de los mamíferos, mediante su capacidad de discriminar moléculas propias de extrañas, en una forma altamente específica.

Muchos grupos de investigadores han generado clonas de linfocitos T citotóxicos a partir de cultivos mixtos de linfocitos y células tumorales (MLTC) para analizar las características moleculares de la activación de estas células, encontrando que el reconocimiento de su blanco está restringido por los productos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (44,51,54,55). Por otro lado señalan que los antígenos que inducen la estimulación de las células T citotóxicas son antígenos virales y tumorales asociados a esta clase de moléculas.

Es por tanto, característica exclusiva del linfocito T citotóxico (LTC), contar con un receptor de superficie para las moléculas -

de clase I del MHC de otras células, asociadas con los diferentes antígenos y solamente de esta manera se logra entender la actividad antígeno específica de estas células (45,46,47,51,52,53,55).

Investigaciones posteriores, sobre las características moleculares del reconocimiento celular, determinan que el complejo CD-3, - participa funcionalmente en este proceso (complejo formado por 5 subunidades) (44).

Experimentalmente se han explicado algunos de los requisitos para inducir la actividad citotóxica de la célula T, pero tal vez in vivo se requieren condiciones adicionales:

- Una condición que in vivo se debe cumplir, es la diferenciación de una célula T con el fenotipo CD-8⁺ (pre-Tc) en una célula citotóxica efectora, mediante el contacto con citocinas (IL-2, IL-3, IFN- γ , IL-6) liberadas por las células cooperadoras, con el propósito de inducir su actividad (44,55,63,78).

- La otra condición que parece ser necesaria para la activación del LTC, es la presencia de mediadores solubles con actividad quimiotáctica. Lo cual se ha reportado, al realizar el análisis secuencial de la infiltración de células mononucleares normales en el tejido neoplásico, demostrándose que la infiltración de neutrófilos y macrófagos está precedida de una infiltración de linfocitos T con el fenotipo regulador-cooperador (208), para después continuar con una infiltración de LTC (48,49).

La presencia de linfocitos T reguladores fué explicada por la secreción de un factor quimiotáctico (LMF factor de la migración linfocitaria) producido por los neutrófilos que infiltraron inicialmente.

A su vez los linfocitos T reguladores son responsables de la producción y liberación de un segundo factor quimiotáctico específico para los LTC, y que además promueve su activación. En análisis fenotípico de las células infiltradas demuestra que sólo las células CD-3⁺, CD-4⁻, CD-8⁺, Leu-7⁺ (CD-57⁺), realizan específicamente una actividad citotóxica, este fenotipo coincide con la descripción del LTC (50,51,53,54).

Una vez establecida una célula T citotóxica efectora, su actividad lítica se realiza en tres eventos principales:

- 1.- El contacto celular específico, es un antecedente para lograr una fuerte adhesión entre las membranas de las células participantes (célula efectora y célula blanco). Esta se realiza en presencia de iones Magnesio (Mg⁺⁺), así como de óptimas condiciones fisiológicas de temperatura y pH.

Las moléculas en la superficie de la célula T, que participan en la adhesión celular son LFA-1 (molécula asociada a la función linfocitaria 1) (23), CD-2 y CD-3, esta última molécula además de estar asociada al reconocimiento antígeno específico, también es una molécula efectora importante ya que es la encargada de la seña-

lización transmembranal de las actividades mitogénicas y secretoras del linfocito T (52,53). Una fuerte adhesión se logra en aproximadamente dos minutos.

2.- Un evento de programación lítica, temperatura y calcio dependientes ocurre en los diez minutos siguientes. Con el análisis ultraestructural de la conjugación entre célula efectora y célula blanco, se reveló un aumento de la membrana de la célula citotóxica en forma de interdigitación, justo en el sitio de contacto celular, lo que favorece la zona de contacto.

Además se observó una distribución asimétrica de los organelos celulares, incluyendo a los microtúbulos del citoesqueleto que son polarizados a la región del contacto (43,44).

3.- Un último evento parece provocar la muerte celular. El reflejo de la actividad citotóxica se manifiesta a varios niveles, pero lo que sucede en el interior de la célula blanco es particularmente importante, iniciando con una serie de movimientos citoplásmicos compulsivos (Zeiosis) y un incremento en el flujo transmembranal que aumenta el contenido citoplásmico (41,57).

Recientemente se ha propuesto el modelo de desintegración intracelular, como resultado de una cascada autocatalítica, que incluye daño a la membrana nuclear y fragmentación del ADN (Apoptosis) (41,42,57). Estos rasgos morfológicos y funcionales caracterizan a una célula programada para morir y están enmarcados como los daños

prelíticos provocados por los LTC sobre las células blanco.

Antes de finalizar con el proceso de lisis de la célula blanco, es necesario mencionar que existen otras alteraciones en su membrana provocadas por enzimas proteolíticas y lipidoactivas. Las fosfolipasas secretadas por la célula efectora convierten la fosfatidilcolina de la membrana celular en un compuesto de carácter detergente (isoetilcolina). Otras enzimas proteolíticas, como la proteinasa neutra están implicadas en el debilitamiento de la membrana de la célula blanco.

Después del proceso anterior, se inicia la fase lítica de la célula blanco con la degranulación de la célula citotóxica efectora. El depósito sobre la membrana de la célula blanco de las proteínas polimerizables contenidas en los gránulos citoplásmicos, provocan daños irreversibles. La proteína contenida en los gránulos, es denominada proteína formadora de poros (perforina), con un peso molecular de 68 Kd (41).

El daño real a la superficie de la célula blanco se manifiesta cuando la perforina se polimeriza y forma una estructura compleja de apariencia anular, que atravieza la membrana de la célula blanco.

Se han descrito dos tipos de lesiones, la primera con diámetro interno de 16 nm llamada poliperforina I y la segunda con diámetro interno de 5 nm llamada poliperforina II, las cuales alteran la per

meabilidad membranal y como consecuencia al desequilibrio de las fuerzas osmóticas se logra el rompimiento de la célula blanco (41).

Una forma de autoprotección de la célula efectora es la síntesis de proteoglicanos en su superficie, los cuales interfieren con la actividad de las perforinas (41,42,43).

Existen otros factores citotóxicos solubles no menos importantes sintetizados por el LTC, como son:

- Linfotoxina/TNF- β (factor de necrosis tumoral tipo beta) es una proteína soluble formada de tres subunidades y cuya actividad es dual, es decir, manifiesta una actividad antiproliferativa (citostática) y necrótica (citolítica) para las células tumorales y -- por otro lado es una proteína que regula positiva y negativamente las actividades del resto de las células inmunes (41,42,54,56).

Es evidente que el linfocito T citotóxico requiere de condiciones especiales para iniciar su actividad. Pero una vez que esta se logra, su participación en las funciones efectoras es imprescindible.

LINFOCITO B

Esta célula tiene su origen en la médula ósea a partir de una célula madre pluripotencial, al igual que el resto de las células hematopoyéticas.

La célula precursora del linfocito B (célula pre-B) contiene en su citoplasma la cadena pesada de la inmunoglobulina de clase --

IgM, siendo esta una característica de su estado de maduración, el cual está regulado por la IL-3 (interleucina 3), IL-4 (interleucina 4), IL-5 (interleucina 5) e IL-7 (interleucina 7), que son algunos de los mediadores solubles liberados por el linfocito T cooperador activado (28,58,62,64,65,66).

Los antígenos de superficie codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (clase I, II), los receptores para fracciones del complemento (C3b, C3d, C4), los receptores para la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas de clase IgG y los receptores para el virus de Epstein Barr, además de las inmunoglobulinas de superficie de clase IgM (monomérica) como parte integral de su membrana celular, son algunas de las características del linfocito B maduro. En este estado de diferenciación, la célula B es capaz de funcionar como una célula presentadora de antígeno (38,58,59).

La diferenciación del linfocito B, para generar una célula plasmática, aún sin manifestar división celular se logra a través del contacto con los mediadores solubles liberados por el linfocito T regulador activado y estos son:

- IL-2 (interleucina 2)
- IL-6 (interleucina 6)
- IL-4 (interleucina 4)
- IL-5 (interleucina 5)
- IFN- γ (interferón gamma) (28,61,63,64,65).

La célula plasmática es una célula con la propiedad de sintetizar y liberar inmunoglobulinas (anticuerpos), las cuales son moléculas funcionalmente útiles en los procesos citotóxicos, ya que al unirse específicamente al antígeno que indujo su formación, puede destruirlo activando el sistema de complemento y/o sirviendo como puente de unión entre la célula citotóxica y el antígeno, proceso conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). De esta manera se logra proporcionar un carácter más específico a la capacidad citotóxica de algunas células (Célula NK) y macrófago).

Es evidente que la participación de la célula B en la respuesta inmune, es una doble participación, ya sea como célula presentadora de antígeno o logrando su diferenciación hasta célula plasmática con la liberación de anticuerpos (58,59).

CELULAS LAK (células asesinas activadas con linfocinas)

Originalmente más que asociar a un tipo celular específico -- esta función citotóxica; se describió el fenómeno observado en las células mononucleares sanguíneas de individuos sanos y de pacientes con cáncer, al ser incubadas con IL-2 (interleucina 2) (67,74).

Las células resultantes mostraban un incremento en su actividad citotóxica, pues eran capaces de eliminar células tumorales -- autólogas o alogénicas y células tumorales mantenidas en cultivo, - que no podían ser eliminadas por la célula NK.

Esta citotoxicidad, al igual que en las células que participan en la inmunovigilancia, no está restringida al reconocimiento de -- antígenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad. Este -- fué el fenómeno descrito por Grimm y Rosenberg en el año de 1982 -- (69,70).

Los primeros intentos por tratar de definir el origen (células progenitoras) y el fenotipo de esta clase de células LAK derivaron -- resultados muy diversos. Inicialmente se demostró que las células -- precursoras de las células LAK era una subpoblación de linfocitos -- granulares gigantes (LGL) que expresaban el fenotipo CD-3⁻, CD-16⁺, HNK-1⁺ (CD-56⁺).

Otros intentos de clasificación, demostraron que la actividad -- de las células LAK se derivaba de una subpoblación de células NK -- cuyo fenotipo era Leu-7⁻ (CD-57⁻), Leu-11⁺ (CD-16⁺).

Todos estos resultados fueron apoyados posteriormente por los -- estudios realizados en la cinética de formación de las células LAK, empleando diferentes subpoblaciones de linfocitos (Grimm).

Revelando que las fracciones diferentes a Leu-11⁺ (CD-16⁺) -- carecen de actividad citotóxica en contra de las células tumorales. Y sólo las células con el fenotipo Leu-7⁺ (CD-57⁺) desarrollaban -- actividad citotóxica similar, si eran pretratadas con IFN- γ (interferón gamma) e IL-2 (interleucina 2) en forma conjunta (68,69).

Por último se pretendió concluir que las células precursoras y

efectoras con actividad de célula LAK pertenecían al fenotipo - - CD-16⁺, y aunque en menor proporción existe otro tipo celular (subpoblación) con el fenotipo Leu-7⁺ (CD-57⁺), que presenta una forma - de activación diferente (IFN- γ , IL-2). Esta segunda población celu- lar también expresa el marcador CD-3⁺, molécula que parece importan- te en el reconocimiento de la célula blanco.

Con tales antecedentes la actividad de las células LAK quedaba restringida a dos poblaciones celulares:

CD-3⁺, CD-5⁻, Leu-7⁺ (fenotipo de célula T)

CD-3⁻, CD-5⁻, CD-16⁺ (fenotipo aparente de célula NK)(70).

La controversia de resultados fué colmada, al encontrar activi- dad LAK en linfocitos aislados del ducto torácico y de ganglios pe- riféricos (70).

Por lo que en la actualidad se optó en referirse a las células LAK de la siguiente forma: Las células LAK no son un tipo celular - único, funcionalmente su actividad citotóxica es un fenómeno que -- depende de poblaciones heterogéneas estimuladas por la IL-2, como - única característica en común (69,70,71).

Experimentalmente se puede apoyar la conclusión de que las lin- focinas (citocinas) producidas in situ, así como un incremento en - su producción, son condiciones que ocurren normalmente in vivo, -- para iniciar la generación de células LAK y que en forma sinérgica- con otros mecanismos efectores específicos se logra la eliminación-

de tumores. (72). Estas observaciones fueron comprobadas en diferentes regiones anatómicas (pulmón, riñón, nódulos periféricos, bazo, e hígado) (73,74).

ESTIMULACION Y MEJORAMIENTO DE LAS ACTIVIDADES CITOTOXICAS

La mayoría de las células del organismo humano están sujetas a una regulación de su proliferación y/o de su actividad a través de moléculas reguladoras (citocinas) sintetizadas y secretadas por -- otras células totalmente diferentes; por lo que las células NK no -- serían la excepción a la regla.

Las moléculas reguladoras de la actividad de la célula NK son:

- IFN (interferón)
- IL-2 (interleucina 2)
- IL-1 (interleucina 1) (7-13).

El interferón en sus tres tipos α , β , γ , sintetizados por leucocitos, fibroblastos, y linfocitos T respectivamente, tienen la -- particularidad de incrementar eficientemente la actividad citotóxica de la célula NK, que se refleja en un aumento de la síntesis proteica, pero no en su proliferación.

Una célula NK estimulada con IFN es capaz de generar la lisis -- en una célula tumoral que inicialmente era resistente a la actividad citotóxica de una célula NK no estimulada. Los efectos del interferón, en el mejoramiento de la actividad citotóxica son:

- Acelera la cinética de la lisis celular.
- Recicla más rápidamente la actividad citotóxica.
- Provoca un incremento en el número de receptores para factores de crecimiento.
- También logra aumentar el número de receptores para la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas de clase IgG, situación -- que facilita la capacidad para realizar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).
- Aumenta la síntesis de ácido siálico sobre la superficie de esta célula protegiéndola en forma selectiva de los productos citotóxicos que pudieran concentrarse en el medio circundante, manifestándose una mayor actividad citotóxica sobre las células blanco (7 - 14).

La Interleucina-2 en forma similar al IFN, es una molécula que induce un aumento en la actividad de la célula NK, pero además se aprecia un aumento en el crecimiento y maduración de dicha célula. Una característica particular y muy importante de esta molécula es que induce a la célula NK a producir IFN lo que se propone como un mecanismo de cooperación entre algunos sistemas celulares NK-NK, -- NK-macrófago, NK-linfocitos.

La Interleucina-1 es una citocina producida por la célula NK y se ha determinado que el contacto de esta célula con células tumorales o con lipopolisacáridos bacterianos (LPS) induce su síntesis. Las células tumorales sensibles a la actividad NK (línea K-562) in-

ducen con mayor eficiencia la producción de esta citocina, por lo que se ha sugerido su participación en el proceso citotóxico. Este concepto está apoyado experimentalmente, al demostrar que líneas de células tumorales pretratadas con la IL-1 incrementan su susceptibilidad a la actividad de la célula NK (efecto citostático de la IL-1) (14).

Las células NK son capaces de sintetizar otros factores de crecimiento como son: factor estimulador de colonias (CSF), factor de crecimiento de la célula B (BGF) (9,14). Y por tal motivo se le confiere una nueva actividad como célula reguladora en la respuesta inmune y principalmente de su autorregulación (7-14).

En forma muy similar, las actividades citotóxicas del macrófago se ven favorecidas por la estimulación con citocinas, y la única variante en este proceso, es que las moléculas de mayor influencia sobre el macrófago, en cuanto al mejoramiento de su citotóxicidad son:

IL-2 (interleucina-2)

IFN- γ (interferón gamma) (16,19,20,22,28,61,64,65).

CITOCINAS

Son mediadores solubles que participan en la respuesta inmune y constituyen un grupo de moléculas que comparten las siguientes características:

A.- Son proteínas solubles, con bajo peso molecular, algunas de ellas están glicosiladas (glicoproteínas).

B.- Regulan la amplitud y duración de la respuesta inmune.

C.- Son producidas transitoria y localmente, logrando la modulación de las actividades celulares de forma autócrina o parácrina.

D.- Son moléculas cuya actividad biológica es muy potente, ya que se observa en rangos mínimos de concentración (picomolar pM).

E.- Interactúan solamente con sus receptores específicos en la superficie celular.

F.- La unión a ellos, inicia un cambio en los patrones de síntesis protéica, así como en algunas otras funciones celulares.

G.- Algunas citocinas presentan múltiples actividades biológicas, las cuales dependen de su concentración local y acción sinérgica con otras citocinas.

H.- La interacción de las citocinas simulan una red de actividades, ya que cada citocina induce la síntesis de otra citocina y/o de sus receptores respectivos, y además pueden manifestar una actividad sinérgica o antagónica, sobre las funciones de todas las células del organismo (63,65,75,76).

Actividades biológicas de algunas citocinas:

Interleucina-1 (IL-1).

Sinónimo: Factor activador de linfocitos (LAF)

Pirógeno endógeno (EP).

Origen: Monocito-macrófago, célula dendrítica, célula NK -
célula endotelial, célula epitelial.

Efecto y célula blanco: Activa a la célula T y la estimula pa
ra producir otras citocinas. Estimula
la proliferación y diferenciación de_
la célula B. Incrementa la actividad_
de la célula NK. Provoca fiebre me---
diante la previa estimulación de las_
células del hipotálamo. Induce la sín
tesis de proteínas de fase aguda en -
hígado. Estimula la síntesis de pros-
taglandinas en macrófagos y de colage
na en fibroblastos. Induce la produc
ción de TNF e incrementa la expre---
sión de receptores para IL-2 en célu
las T.

Existen dos formas moleculares de esta citocina (α , β) con -
similar estructura y efecto (28,61,64,65,66,76,77).

Interleucina-2 (IL-2).

Sinónimo: Factor de crecimiento de la célula T (TGF)

Origen: Linfocitos T activados.

Efecto y célula blanco: Induce la proliferación del linfoci--
to T activado. Estimula la diferencia
ción del linfocito pre-T citotóxico -

y la actividad de la célula NK. Interviene en la generación de células LAK. Promueve la producción de otras citocinas (28,61,64,65,78,79).

Interleucina-3 (IL-3)

Sinónimo: Factor estimulador de colonias múltiples (multi- - CSF). Factor de crecimiento Hematopoyético.

Factor estimulador de colonias de la serie granulocito-macrófago (GM-CSF).

Origen: Linfocito T activado, clonas de células T, líneas_MLA-144.

Efecto y célula blanco: Estimula el crecimiento de células - hematopoyéticas de la serie mieloide_y eritroide (28,62,64,66).

Interleucina-4 (IL-4)

Sinónimo: Factor de crecimiento de la célula B (BCGF)
Factor uno, estimulador de la célula B (BSF-1)

Origen: Linfocitos T activados.

Efecto y célula blanco: Induce el crecimiento y proliferación de las células T y B. Estimula la expresión de receptores Fc, moléculas de clase I, II, del MHC y - la secreción de IgE en células B. Favorece el crece

cimiento de tejido mucoso y conectivo. Muestra un efecto inhibitor sobre las células estimuladas -- con IL-2 (28,62,64,65).

Interleucina-5 (IL-5).

Sinónimo: Factor dos del crecimiento de la célula B (BCGF-II)
Factor de la diferenciación de eosinófilos

Origen: Células T activadas.

Efecto y célula blanco: Estimula la diferenciación de eosinófilos, induce la secreción en forma preferencial de IgM, IgA en la célula B (28,62,64,65).

Interleucina-6 (IL-6).

Sinónimo: Interferón- β_2
Factor dos estimulador de la célula B (BCSF-2)
Factor de diferenciación de la célula B (BCDF)

Origen: Monocitos, Fibroblastos, Células epiteliales, Células tumorales, Células T activadas.

Efecto y célula blanco: Induce la diferenciación del linfocito pre-T citotóxico. Provoca la expresión de moléculas de clase I (MHC) en fibroblastos. Estimula la secreción de inmunoglobulinas en células B -- transformadas por el virus de Epstein Barr. Favorece el crecimiento de hibridomas (28,61,64,65,--80).

Interleucina-7 (IL-7).

Sinónimo: Linfopoyetina o factor de crecimiento de la célula pre-B

Origen: Linfocitos T activados.

Efecto y célula blanco: Estimula la diferenciación y desarrollo de linfocitos inmaduros y otras células inmaduras (62).

Interleucina-8 (IL-8)

Origen: Linfocitos T activados.

Efecto y célula blanco: Estimula el crecimiento de granulocitos (28,65,65).

INTERFERON

Interferón alfa (IFN- α).

Sinónimo: Interferón tipo I

Origen: Leucocitos, Macrófagos.

Efecto y célula blanco: Tiene un efecto antiviral. Incrementa la fagocitosis en neutrófitos. Induce la expresión de moléculas de clase I (MHC) en la mayoría de las células del organismo. Manifiesta un efecto citostático, citotóxico, antitumoral y antiproliferativo. Aumenta la expresión de receptores Fc para IgG y reduce los receptores Fc para IgM en células inmunes.

Interferón beta (IFN- β).

Sinónimo: Interferón tipo I

Origen: Fibroblastos y células epiteliales.

Efecto y célula blanco: Manifiesta un efecto antiproliferativo y citostático para células tumorales e infectadas con virus. Aumenta la expresión de moléculas de clase I (MHC) en todas las células del organismo. Estimula la proliferación de la célula B.

Interferón gamma (IFN- γ).

Sinónimo: Interferón tipo II o Interferón inmune.

Origen: Linfocitos T activados y Linfocitos Granulares Gigantes.

Efecto y célula blanco: Manifiesta un efecto antiviral, citostático y antitumoral. Aumenta la expresión de moléculas de clase I y II (MHC) y otros receptores en células inmunes. Estimula el crecimiento, diferenciación y proliferación de la célula B. Incrementa la actividad de las células citotóxicas. Inhibe la transcripción de oncogenes (28,64,65,76,77,81-87).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Sinónimo: Caquetina.

Origen: Macrófago y células endoteliales. Células Nk. Células del cerebro.

Efecto y célula blanco: Tiene un efecto citostático y citotóxico. Provoca fiebre, caquexia, shock séptico, y resorción ósea. Produce necrosis tumoral. Favorece la quimiotaxis. Induce una estimulación mitogénica.

Factor de necrosis tumoral beta (TNF- β).

Sinónimo: Linfotoxina.

Origen: Células T activadas.

Efecto y célula blanco: Tiene un efecto citotóxico para células tumorales. Manifiesta un efecto citotóxico y estimulador sinérgico con INF- γ . Es mediador en la patogenia de infecciones e inflamaciones (28, 64, 77, 84, 85, 87, 88).

Factor Transformante del crecimiento tipo beta (TGF- β).

Factor Transformante del crecimiento tipo alfa (TGF- α).

Factor del Crecimiento Epidérmico (EGF).

Origen: Células T activadas. Macrófagos. Fibroblastos. Célula Nk. Células Tumorales.

Efecto y célula blanco: Altera las funciones y modula el crecimiento de la mayoría de las células del organismo. Induce la expresión de un fenotipo transformado. Suprime la proliferación y la secreción de inmunoglobulinas en la célula B. Inhibe las activi-

dades de las células citotóxicas. Tiene un efecto antagónico en la proliferación inducida por IL-2. Estimula la proliferación y la síntesis de colagena en el Fibroblasto. Altera la síntesis de citocinas y proteínas ya que impide la transcripción del ARN. Regula la expresión de moléculas de clase II (MHC). Inhibe la proliferación y actividad de células NK y LAK (65,89-94).

Factor estimulador de colonias para Granulocitos (G-CSF)..

Origen: Macrófagos, Células Epiteliales, Células Endoteliales, Fibroblastos y Células T activadas.

Efecto y célula blanco: Tiene un efecto mitogénico sobre muchas células. Activa las funciones del Macrófago. Estimula la proliferación de la serie granulocítica (65,89).

Para una mayor comprensión de las fases en que se divide la activación de la respuesta inmune, el nivel de participación de las distintas células inmunocompetentes, así como la producción de factores solubles por cada una de ellas y sus efectos sobre otras células, es recomendable observar la Figura No. 1.

1.3 MECANISMOS DE EVASION A LA RESPUESTA INMUNE.

Resulta difícil comprender que las células tumorales o células de una transformación maligna, cuando estas se han originado, sobrevivan y se desarrollen progresivamente, si todo organismo inmunocompetente cuenta con una respuesta específica y potencialmente citotóxica para eliminarlas.

La única respuesta posible a tal cuestión, está en los mecanismos de evasión a la respuesta inmune que exhiben las células tumorales.

Existe una gran variedad de formas o mecanismos de escape, que no necesariamente requieren de la presencia de una respuesta inmune específica, o bien puede existir y no obstante es observado el crecimiento tumoral, implicando que este tipo de respuesta ha sido ineficaz (29,95). Por tal motivo los mecanismos de evasión se han clasificado de la siguiente manera:

A.- MECANISMOS DE EVASION PROPICIADOS POR EL HUESPED.

En un sentido estricto del concepto de los mecanismos de evasión no deberían de ser considerados como tales. Pero debido a la amplia participación del hospedero y de la célula tumoral, es la razón del porque se han incluido aquí.

Muy de acuerdo a la teoría de Burnet de la vigilancia inmunológica, el desarrollo tumoral es consecuencia de la incapacidad de respuesta del hospedero o de alguna de sus alteraciones inmunes. Lo

que es igualmente apoyado por las observaciones clínicas y experimentales, que el desarrollo tumoral es frecuente en individuos inmunodeficientes.

- TOLERANCIA INMUNOLOGICA:

La mayoría de los mamíferos están dotados genéticamente para responder en contra de formas antigénicas extrañas, mediante la capacidad de su sistema inmune de realizar un reconocimiento continuo de lo propio. Aunque también manifiesta una desventaja muy grande, pues el sistema inmune es fenotípicamente tolerante, y las evidencias que lo demuestran son:

1.- El contacto con sustancias antigénicamente diferentes durante la etapa fetal del desarrollo de todo individuo, genera una tolerancia inmunológica, con esto se quiere dar a entender, que resulta imposible establecer una respuesta inmune en contra de antígenos fetales (también presentes en células tumorales).

2.- El constante contacto con pequeñas cantidades de antígenos (dosis no inmunogénicas) provocan una tolerancia, proceso fácilmente extrapolable a una condición neoplásica, pues algunas células tumorales liberan mínimas cantidades de antígenos (modulación antigénica), logrando hacer tolerante su presencia (87,96-99).

-- DEFICIENCIAS INESPECIFICAS

Al evaluar el sistema inmune de los individuos con cáncer se

ha encontrado una buena correlación entre una deficiencia inmune y el desarrollo de tumores. La falta de inmunocompetencia es por tan to una buena condición para el escape tumoral. Pero también es -- cierto que no se ha logrado establecer cuál condición genera la - otra; es decir si el desarrollo tumoral provoca la inmunodeficiencia o visceversa (29,30,95).

- PRESENCIA DE CELULAS SUPRESORAS

La activación de células supresoras antígeno específicas, parece ser una de las formas más sofisticadas de regular la respuesta humoral y celular. Esta condición pareciera exclusiva del hospedero, pero experimentalmente se ha demostrado que las células tumorales también pueden generar la activación de estas células aún en periodos cortos de tiempo (24 horas) (29,30,100,101).

- INMUNOESTIMULACION

El establecimiento de una respuesta inmune en contra de las células neoplásicas parece favorecer su desarrollo inicial. Ya que los mecanismos reguladores y efectores de la respuesta inmune a ni vel del microambiente (local) o sistémico son modulados por una se rie de sustancias solubles (citocinas), que también pueden regular el crecimiento de las células tumorales, pues exhiben en su superficie receptores para algunas de estas moléculas (estimulación pa rácrina) (102-105).

B.- MECANISMOS DE EVASION INHERENTES A LAS CELULAS TUMORALES.

- INMUNOSELECCION O INMUNORESISTENCIA

La generación de una clona de células malignas potencialmente inmunógenas; en un huésped inmunocompetente, podría dar lugar a -- una selección de subclonas inmunoresistentes. En otras palabras, - células inmunosensibles serán destruidas con rapidez, y la presión continua de selección sobre el tumor inducirá el desarrollo de células con resistencia aumentada (En un simil a los microorganismos patógenos resistentes a antibióticos). Esta resistencia; no se obtiene por mutación o adaptación sino más bien, las condiciones locales inducen a la expresión de algunos genes reprimidos, los cuales le confieren nuevas propiedades.

Algunos ejemplos son: la modulación antigénica o la inducción de la expresión de nuevas moléculas por el IFN- γ (29,87,95,98).

- ESCABULLIDA CELULAR (Sneaking cell).

Este término pretende describir un mecanismo de evasión aparentemente simple. En las etapas iniciales del desarrollo tumoral, algunas células expresan una mínima cantidad de antígenos, lo que hace imposible sensibilizar al hospedero.

Si en un tiempo posterior llega a establecerse una respuesta específica en contra del crecimiento tumoral, este ya habrá alcanzado dimensiones que no se verán afectadas por los mecanismos efec

tores de la respuesta inmune para eliminarlo. Proceso fácilmente - desarrollable a la par de una tolerancia inmunológica del huésped, o a la ausencia de inmunogenicidad de los antígenos tumorales.

La escabullida celular se apoya en una de las propiedades más características de las células tumorales y es la modulación de su cinética de desarrollo celular manifestándose en el inicio del desarrollo tumoral a una velocidad de autoduplicación que rebase el potencial proliferativo del sistema inmune (27,95,106).

- MODULACION FENOTIPICA

En este mecanismo de evasión se incluyen algunos otros que en marcados bajo un mismo concepto, parecieran una estrategia inteligente para evadir a la respuesta inmune.

Durante el desarrollo tumoral existe una inhibición, transformación y reexpresión progresiva de determinantes antigénicos en la superficie de la célula tumoral, lo que permite una selección genética con base inmunitaria (95).

a) Modulación antigénica:

Este tipo de proceso ocurre cuando las células tumorales son expuestas a una respuesta inmune específica, exhibiendo un reducido número de determinantes antigénicos o bien un solo determinante antigénico sobre el cual se manifiesta la actividad efectora de la respuesta inmune. Para evitar su destrucción por el constante ac--

cionar de los mecanismos inmunes efectores, la célula tumoral cuenta con las alternativas de internalizar, disminuir la densidad en su superficie, o suprimir la expresión de sus determinantes antigénicos.

La inestabilidad de estas moléculas sobre la superficie de la célula tumoral es un buen mecanismo de evasión (87,106).

b) Desprendimiento de antígenos:

Las células nucleadas de todos los mamíferos, tienen la particularidad de mantener en constante recambio sus membranas celulares. Algunas de sus moléculas de superficie son desprendidas y otras son empleadas en el catabolismo de sus constituyentes. Por lo tanto las células tumorales no están exentas de realizar el desprendimiento de sus antígenos y lo hacen en forma más rápida debido a que su metabolismo está incrementado.

Si estas moléculas son determinantes antigénicos sobre los cuales se haya establecido una respuesta inmune, su liberación constante provoca que las células tumorales sean inmunoresistentes. No solo por su aparente carencia sobre la superficie celular, sino que también la alta concentración de esas moléculas, en la vecindad local bloquean los mecanismos efectores de la respuesta inmune.

Extrapolando este proceso a la condición de que esta clase de moléculas sean filtradas a otros tejidos y/o hasta la circulación sanguínea, la actividad de los mecanismos efectores no estará loca

lizada en un solo punto, sino que estaría diluída o distraída por todo el organismo.

También debe considerarse que la alta concentración antigénica puede provocar por si misma una inhibición de la respuesta inmune, o inducir la activación de células supresoras en el huésped -- (87,98,107).

c) Mimetismo molecular:

Las células transformadas pueden mantener características -- constitutivas como lo es, el sintetizar moléculas codificadas por el MHC, especialmente de clase I.

Otra alternativa es que la célula transformada no altere en -- mucho la expresión de este tipo de moléculas, haciéndolas parecer -- similares, y al ser reconocidas como propias pase desapercibida la existencia de células tumorales en el hospedero (87,97,98,106,108).

d) Enmascaramiento:

Las células tumorales durante su proceso de transformación -- adquieren nuevas características y una de ellas, relativa a la diferente expresión de antígenos o a la expresión de nuevos antígenos, provoca que la carga eléctrica neta de la superficie celular -- se modifique.

Este efecto logra que sean atraídas moléculas solubles circulantes con carga eléctrica contraria, hacia la superficie celular.

La interacción de estas moléculas con la superficie de la célula tumoral, la hace pasar como una célula que expresa moléculas propias del hospedero, por lo que no se detecta su presencia. (Un ejemplo es la interacción con plaquetas durante la metástasis) (109).

-- INDUCCION DE MOLECULAS BLOQUEADORAS

Aún en individuos capaces de establecer una eficiente respuesta inmune se ha observado que las células tumorales pueden estimular o dirigir esta respuesta en su contra. Es decir que los mecanismos efectores del hospedero, más que destruir, favorecen de manera indirecta el crecimiento neoplásico.

a) Anticuerpos bloqueadores:

Debido a las condiciones genéticas del individuo o tal vez a las células tumorales, en el hospedero se induce la formación de -- cierta clase de anticuerpos cuya actividad citotóxica es mínima o ausente. Estas inmunoglobulinas son incapaces de activar el sistema del complemento y poseen una afinidad mínima por los receptores de membrana (fracción Fc) en células citotóxicas capaces de realizar ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Naturalmente nos referimos a los anticuerpos de clase IgG₄.

De esta manera, la célula tumoral logra que los anticuerpos recubran su superficie, enmascarando a sus antígenos e impidiendo la actividad de los mecanismos citotóxicos efectores (29,95,110).

b) Complejos inmunes:

Esta condición biológica resulta de las características de -- sus protagonistas; por un lado, de individuos inmunocompetentes ca paces de formar anticuerpos en contra de los antígenos tumorales y por otro, células tumorales que de acuerdo a lo establecido en la - modulación fenotípica, liberan antígenos de su superficie celular. La formación de complejos antígeno-anticuerpo se puede lograr en - la superficie de la célula neoplásica con su posterior liberación_ o bien en los fluidos en los que existe gran cantidad de antígenos solubles.

El incremento en la concentración de complejos inmunes provo- ca una fuerte inhibición de la respuesta inmune, a través del -- bloqueo de las funciones celulares citotóxicas (29,95,96,110).

- LIBERACION DE SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN CON LA RESPUESTA INMUNE

Las células tumorales producen una gran variedad de sustan--- cias, con diferente naturaleza química, las cuales pueden dismi--- nuir en forma directa o indirecta la acción de las células efecto- ras de la respuesta inmune, evitando así su destrucción (29,95,96, 101,104,110). (ver sección de supresión inmune).

ANTECEDENTES

2.1 SUPRESION DE LA RESPUESTA INMUNE POR CELULAS T

Es evidente reconocer la diversidad funcional de las células que constituyen al sistema inmune, dentro de las cuales parece tener un papel preponderante aquellas cuya actividad está directamente involucrada con la regulación de la respuesta inmune (100).

Naturalmente nos referimos a las células T en las que sus diferentes funciones efectoras y reguladoras, representan las capacidades de sus dos subpoblaciones que se pueden distinguir en base a sus diferencias fenotípicas.

Aproximadamente el 65% de la población total de linfocitos T exhiben el marcador de superficie CD-4 y en ellas se incluyen a las células capaces de inducir, establecer, amplificar y modular la respuesta inmune en forma específica. Los mecanismos por los que realiza esta actividad ya fueron descritos en la sección anterior.

La otra subpoblación de células T que representa aproximadamente el 35% de la población total exhiben el marcador de superficie CD-8, estas células parecen estar integradas o relacionadas a funciones efectoras citotóxicas y funciones efectoras supresoras (101).

Estas grandes subpoblaciones de células T (CD-4 y CD-8) parecen estar fraccionadas en subtipos aun menores de células que difieren en cuanto a sus marcadores de superficie (fenotipo específico)

co) y a sus características funcionales y aunque no se ha definido en forma muy exacta, existen evidencias experimentales actuales - que pueden ayudar a comprender estos conceptos (comentarios retomados más adelante).

Por muchos años los inmunólogos han tratado de entender los - mecanismos responsables de la inmunorregulación, ya que una de las propiedades más excepcionales de las células del sistema inmune - es ciertamente su capacidad de suprimir específicamente los procesos inherentes a una respuesta inmune.

Inicialmente se pretendió explicar la supresión inmune como un fenómeno regulador, sin que se conociera la célula o células responsables. En la actualidad se le ha atribuido a la célula T supresora, la capacidad de una célula especializada que desempeña un papel importante en los mecanismos reguladores del sistema inmune, - tal vez no sea un concepto universalmente aceptado, pero las evidencias experimentales apoyan fuertemente su existencia.

La presencia de células T supresoras, con características antígeno específicas, demostradas originalmente por R.K. Gershon en 1970 (111,112) fue el inicio de un gran número de investigaciones acerca de las características funcionales y fenotípicas de este tipo - de células.

Cabe señalar que en los sistemas de supresión posteriores al - de Gershon se demostró que la célula T supresora puede modular una - variedad de funciones inmunes que involucran la inmunidad celular y

humoral (111,127).

Estas células T supresoras se identificaron en varias especies animales incluyendo al hombre, pero en los modelos murinos es donde se ha extendido su estudio.

El análisis de varios sistemas supresores antígeno específicos han revelado una compleja secuencia de eventos que se suceden para establecer un estado de supresión. Postulando la existencia de subpoblaciones de células T supresoras que interaccionan secuencialmente, es decir: La primera célula T supresora (Ts1) elabora un factor supresor uno (TsF1) que actúa como activador de una segunda célula supresora (Ts2) la cual se convierte en una célula supresora efectora al sintetizar un segundo factor supresor (TsF2) que manifiesta su actividad sobre el resto de las células inmunes (115, 122, 123, 128).

Esta secuencia de eventos celulares ha sido observada por varios grupos de investigadores, en diferentes modelos experimentales, pero existen algunos otros que tratan de explicar la supresión involucrando la participación de una tercera población de células supresoras (Ts3), la cual manifiesta su actividad cuando es estimulada por TsF2 para liberar un último factor supresor efector (128).

En todos los sistemas experimentales analizados tanto in vitro como in vivo se ponen de manifiesto dos importantes características:

- 1) La célula aparentemente responsable de la supresión inmune, es el linfocito T.
- 2) El proceso de supresión es establecido y ejecutado a través de una serie de señales, que sirven como vía de comunicación entre las células participantes. De tal modo que la inducción, establecimiento y desarrollo de la supresión inmune es por medio de factores o sustancias solubles elaboradas por los linfocitos T(115-118,122-125,127).

Por otro lado, de acuerdo a los distintos sistemas experimentales de supresión consultados, podemos clasificar a los factores solubles - supresores como:

A) FACTORES SUPRESORES CON ACTIVIDAD RESTRINGIDA POR EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

En los modelos experimentales del grupo de Tada y colaboradores - (116-119,125) se demostró que los linfocitos T o células de bazo provenientes de un ratón inmunizado previamente con altas dosis de antígeno (KLH), y transferidas a ratones singénicos desafiados posteriormente -- con dosis inmunizantes del mismo antígeno, lograron disminuir la capacidad de formar anticuerpos en contra de KLH. Estos resultados indican que la inmunización con dosis relativamente altas de antígeno o del -- conjugado hapteno-acarreador, activa una subpoblación de células T que específicamente inhiben la producción de anticuerpos en contra del -- hapteno sobre la misma molécula acarreadora, confiriéndole la propiedad de ser una supresión antígeno específica.

Al tratar de investigar los mecanismos moleculares de la supresión se encontró que las células T liberan un factor supresor - que inhibe las funciones de otro tipo de células. Cuando este grupo intentó caracterizar el factor supresor, a partir de extractos solubles de linfocitos T supresores, observaron las siguientes características:

- Que el factor supresor muestra cierta afinidad por el antígeno, es decir, que se une a él.
- El factor supresor exhibe determinantes antigénicos que son - codificados por el MHC, especialmente de la subregión I-J (ra tón).
- Este factor manifiesta una naturaleza química proteica.
- Además de que su actividad supresora sólo se puede demostrar - en receptores singénicos (receptores genéticamente compatibles) por lo que se considera que su actividad está restringida gené ticamente.

Por otro lado, empleando una combinación de técnicas in vivo - e in vitro Germain (120,122,126) logró investigar los posibles mecanismos de la supresión, al administrar en animales singénicos altas dosis de antígenos sintéticos (copolímeros de aminoácidos GAT-Tirosina-Ac. Glutámico-Alanina y GT-Tirosina-Ac. Glutámico o arsenato de azobenceno-ABA) que inducían un estado de supresión, y después de - caracterizar los extractos solubles celulares demostró la existen--

cia de un factor supresor con características muy similares al demostrado por el grupo de Tada. Esta molécula fue capaz de activar en animales histocompatibles una segunda población de células T supresoras (Ts2) o células supresoras de segundo orden, las cuales también liberan un segundo factor supresor cuyas características son:

- Que manifiesta una restricción genética en su actividad, es decir, sólo actúa en animales compatibles genéticamente.
- Posee determinantes antigénicos codificados por la región I-J del complejo histocompatible del ratón.
- El factor supresor uno (TsF1) y dos (TsF2) exhiben una porción molecular similar a la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, y que les sirve para comunicarse entre las diferentes subpoblaciones de células T (120, 122, 126).

Como es evidente en los sistemas experimentales que muestran la existencia de factores supresores restringidos genéticamente, responsabilizan a la subregión I-J del MHC del ratón y a los productos de ésta, como los reguladores y efectores de la actividad de la célula T supresora. Indicando que las interacciones entre las subpoblaciones de células T supresoras es a través de factores solubles portadores de determinantes antigénicos codificados por estos genes.

En la actualidad, este concepto parece invalidarse pues se sabe que los marcadores, así como los productos celulares codificados por la región I-J de los genes Ir en el ratón, son marcadores y pro

ductos transicionales de la diferenciación celular (134). Sin embargo se mantiene el interés en estudiar e identificar características en común en este tipo de factores supresores.

B) FACTORES SUPRESORES CON ACTIVIDAD NO RESTRINGIDA POR EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El modelo secuencial de interacciones celulares entre las subpoblaciones de células T supresoras es muy característico y compartido por varios sistemas experimentales, manifestando sólo algunas diferencias en cuanto a la naturaleza química y características de la actividad de los factores supresores participantes.

Kontianen y Feldman (124) fueron los primeros en demostrar en un sistema experimental in vitro la inducción de células supresoras capaces de producir un factor supresor con carácter antígeno específico no restringido al MHC; Ya que al adicionar sobrenadantes, obtenidos de cultivos de células esplénicas estimuladas con un antígeno sintético, a células de diferentes cepas de ratones, pero estimuladas con el mismo antígeno, se observó una supresión en la producción de anticuerpos (IgG, IgM).

La importancia de este trabajo radica en que el factor supresor, obtenido de una cepa de ratón específica, es capaz de manifestar su efecto en células de ratones genéticamente incompatibles -- (124).

Okumura K.O. y colaboradores observaron in vivo una supresión similar -

a la que reporta Kontiainen, y además demuestran que el factor supresor extraído de homogenados celulares de linfocitos T, era de naturaleza proteica (121).

Otras evidencias experimentales describen que en los sistemas supresores donde se valora las reacciones de hipersensibilidad tipo retardada en contra de antígenos sintéticos, está involucrada la participación de un factor supresor cuya actividad no está restringida genéticamente, tal es el caso de los grupos de Zembala y Bullock (127).

Aunque existen muy diversos sistemas experimentales además de los mencionados anteriormente, en todos ellos se señala que el efecto supresor está mediado por uno o varios factores solubles liberados por células T supresoras.

En la actualidad, se pone en tela de juicio la existencia de esta clase de moléculas, pues existen muchas otras sustancias solubles liberadas por los linfocitos T, que han sido bien caracterizadas (química, bioquímica e inmunológicamente) y que bajo ciertas condiciones manifiestan un efecto regulador de la respuesta inmune. Específicamente nos referimos a las siguientes citocinas:

IL-4 (interleucina 4) (28,62,64,65,173)

IL-6 (interleucina 6) (28,61,64,65,80,173)

IFN- γ (interferón gamma) (28,76,77,81,87)

TGF- β (Factor transformante del crecimiento tipo Beta) (65,89-94).

TNF (factor de necrosis tumoral) (28,64,77,84,85,87,88)

- La actividad supresora de algunas de estas moléculas se puede manifestar cuando su concentración local o sistémica se observa elevada, en comparación con una condición normal. (IFN- γ , TNF, IL-6).
- Algunas de ellas también muestran un efecto antagónico cuando se encuentra presente alguna otra citocina o que previamente se genere un estímulo por una citocina diferente. El más claro ejemplo de tal situación es la IL-4, la cual tiene un efecto inhibitorio sobre las funciones de la célula que previamente fueron estimuladas con IL-2.
- También debe considerarse la posibilidad de que su actividad individual se modifique o sea antagónica cuando algunas de ellas actúan en forma conjunta (TGF- β , IL-4).

Con el estudio y caracterización de moléculas inmunoreguladoras se ha tratado de dar explicación a las teorías de supresión propuestas en la década de los setentas. Sin embargo en la actualidad se mantiene la inquietud por conocer los mecanismos responsables de la regulación de la respuesta inmune, pues con el creciente desarrollo de técnicas como son:

- 1) La generación de anticuerpos monoclonales, para caracterizar subpoblaciones de células y moléculas solubles con función biológica específica (134,137,139,140,142,145-148).
- 2) El establecimiento de clonas de subpoblaciones de células - T (129-135,137-139,141,145,147,149).

- 3) Así como tratar de manipular los genes responsables de la síntesis de algunos factores supresores solubles (139,142, 144,-146,149).

Se han logrado hacer investigaciones importantes y más profundas sobre los mecanismos celulares y moleculares de la supresión antígeno específica, no sólo en modelos animales (ratón y rata) - (120,121,135,136), sino también esclarecer estos mismos mecanismos de supresión en el hombre (122,139,151,145,148).

Con aportaciones experimentales recientes, que se apoyan en el uso de clones de células T supresoras, Herbert y Watson (150) - postularon una teoría de supresión antígeno específica involucrando un reconocimiento restringido por el complejo mayor de histocompatibilidad como condición para que se realice este proceso de regulación en el hombre. Considerando que la supresión se puede desarrollar de la siguiente manera:

Inicialmente determinan que una célula T cooperadora-reguladora es activada a través de su receptor TCR (receptor formado por el heterodímero $\alpha\beta$) pues reconoce la asociación del antígeno -- con las moléculas de clase II (MHC) que se encuentran en la superficie de la CPA (célula presentadora de antígeno) y que además requiere la presencia de IL-1 (interleucina 1) para que se puedan expresar los receptores de interleucina 2.

Por otro lado, dependiendo de la concentración del antígeno -

también son activadas las células T supresoras ya que pueden reconocer la asociación del antígeno con moléculas del MHC, por contar con sus receptores de superficie TCR ($\alpha\beta$) y receptores para IL-1. Cuando la célula T supresora es activada de esta manera, se encuentra en condición de reexpresar la cadena δ de su receptor TCR (δ). Es por medio de esta molécula de superficie que se lleva a cabo la interacción con el receptor CD-2 (receptor E o receptor para eritrocitos de carnero) presente en la célula T cooperadora-reguladora que previamente había sido activada. La estimulación simultánea de esta última célula a través de sus receptores TCR que reconoce al antígeno y CD-2 que interacciona con el linfocito T supresor, provoca la inhibición de sus funciones normales.

Este circuito de interacciones celulares se completa al considerar que la IL-2 (interleucina 2), necesaria para favorecer la proliferación de las células T supresoras, es producida por otras células T cooperadoras-reguladoras que se activan al interactuar vía de su receptor CD-2 con la cadena δ de las células T supresoras y con la IL-1 presente en el medio local, descartando por completo en este último caso la activación por su receptor TCR.

Todo lo descrito anteriormente parece indicar que las propiedades conferidas al receptor δ del linfocito T, es el proporcionar un elemento esencial para las funciones efectoras de la célula T supresora. Estas evidencias experimentales tienen el apoyo de otros grupos de investigadores que determinan la existencia de

receptores $\gamma\delta$ en linfocitos portadores del marcador CD-8⁺ (150-153).

Actualmente las investigaciones realizadas sobre los factores solubles supresores, determinan que su existencia y actividad está restringida genéticamente por el complejo mayor de histocompatibilidad en el hombre (MHC) (149-155). Pues parece ser que estos factores comparten determinantes antigénicos con el receptor de la célula T (TCR) y en algunos casos llegan a ser estructuras muy similares al heterodímero $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ por lo que en armonía con la teoría de supresión expuesta anteriormente pueden ser considerados como las formas solubles de esta clase de moléculas (139,140, 145,156-159).

Desde que se describió el fenómeno de supresión, se trató de encontrar las células responsables de dicha actividad. Al determinarse la existencia de las dos subpoblaciones de linfocitos T -- (CD-4 y CD-8) y proponer a las células con el marcador CD-8 como las responsables de la supresión y de la citotoxicidad, surgieron especulaciones sobre su existencia real.

Con la generación de clonas de células T supresoras caracterizadas con anticuerpos monoclonales, es posible demostrar la existencia de células T citotóxicas y células T supresoras como subpoblaciones de células portadoras del marcador CD-8, separándose de esta forma la dicotomía funcional asignada desde siempre a estas células (160).

Las células T citotóxicas muestran el fenotipo:

TCR⁺ CD-3⁺ CD-4⁻ CD-8⁺ CD-11b⁻ CD-28⁺

en cambio a las células T supresoras se les asigna el fenotipo:

TCR⁺ CD-3⁺ CD-4⁻ CD-8⁺ CD-11b⁺ CD-28⁻
(160).

Es evidente que la diferencia que separa las actividades de estas subpoblaciones de células radica en los marcadores CD-11b (receptor para la fracción C₃ del complemento y especialmente encontrada en macrófagos, granulocitos y células Nk)(161) y CD-28 (marcador que describe una subpoblación de células T, según el 4^o taller sobre antígenos de diferenciación de los leucocitos humanos 1989) el cual se había señalado en el pasado como un marcador útil para distinguir poblaciones celulares, empleando el anticuerpo monoclonal 9.3 (160,162).

Estas evidencias experimentales requieren de una total confirmación pero pareciera ser el inicio de la separación de poblaciones celulares con el marcador CD-8.

Además el campo de la investigación de las células supresoras y sus productos solubles se ha extendido a los sistemas experimentales de las enfermedades infecciosas (130,132), autoinmunes (99, 129,132, 136,138), y en los procesos neoplásicos puesto que hay un gran paralelismo con la supresión de las respuestas antígeno - específicas (163-168).

2.2 SUPRESION DE LA RESPUESTA INMUNE POR EL MACROFAGO

Los monocitos o macrófagos tienen un importante papel en el inicio y regulación de la respuesta inmune específica.

Estas células son capaces de procesar y presentar antígenos, pero también pueden controlar en forma positiva o negativa el crecimiento y diferenciación de otras células (161,169,170).

Anteriormente ya fue descrita la participación del macrófago en el establecimiento de la respuesta inmune específica y su participación como una célula citotóxica, pero además esta célula también es capaz de suprimir la respuesta inmune (15,16,22,101,--174).

Cuando el macrófago está activado es capaz de producir y liberar una gran cantidad de moléculas solubles con diferente actividad biológica que se dividen en:

ENZIMAS

- Proteinasa neutras
 - Plasminógeno activador
 - Esterasa
 - Colagenasa I,II,III específicas para colágena intersticial.
 - Colagenasa IV específica para colágena de membrana basal
 - Colagenasa V específica para colágena pericelular.
 - Proteinasa citolítica.
- Arginasa
- Lisozima

- Lipoproteinlipasa
- Hidrolasas ácidas (proteínasa, peptidasas, glicosidasas, fosfatasa, lipasas).
- Enzima convertidora de angiotensina

PROTEINAS PLASMATICAS

- α Macroglobulina
- Fibronectina
- Transcobalamina II
- Apolipoproteína E
- Proteínas de la coagulación (tromboplastina tisular, factor - V, VII, IX, X).
- Componentes del complemento C1, C2, C3, C4, C5, properdina, - Factor B, Factor D, Factor I como inactivador de C3b, Factor H acelerador del inactivador del factor B, C3b.

METABOLITOS REATIVOS DE OXIGENO

- Ion superóxido (anion \bar{O}_2).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Ion hidroxilo (OH^-)

LIPIDOS BIOACTIVOS

- Prostaglandinas
- Leucotrienos

- Tromboxanos
- Acido 12-hidroxiicosatetranoico

NUCLEOTIDOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS

- Monofosfato de Adenosina (AMPc)
- Timidina
- Uracilo
- Acido Urico

FACTORES REGULADORES DE LAS FUNCIONES CELULARES

- Eritropoyetina
- IL-1
- IFN- α
- Factor de la angiogénesis
- Factores que promueven la proliferación de fibroblastos, células endoteliales, células T y B.
- Factor estimulador de colonias (CSF)
- Factor precursor de la serie mieloide
- Factores que inhiben la proliferación de células tumorales.
- Factor de necrosis tumoral. (Tipo α)

Por todo lo anterior es evidente reconocer la capacidad funcional del macrófago como una célula biológicamente activa.

Ya que muestra sus actividades reguladoras y supresoras sobre una gran cantidad de células (15,16,22,161,169,170).

Para facilitar la descripción de los mecanismos de supresión que realiza el macrófago en la respuesta inmune, se ideó la siguiente clasificación:

SUPRESION DE LA RESPUESTA INMUNE A TRAVES DE LA LIBERACION DE ---
PROSTAGLANDINAS.

Las prostaglandinas son producidas por el macrófago activado a partir de ácido araquidónico (ác. graso de 20 carbonos), el cual es metabolizado por un sistema enzimático denominado Ciclooxygenasa-Lipoxigenasa. Los productos finales de esta actividad son las protaglandinas (PGE_2 PGF_2 PGD_2 PGI), tomboxanos y leucotrienos (171,172).

El principal efecto de las prostaglandinas es actuar como precursor de los antagonistas β -adrenérgicos tales como histamina, mediante la estimulación del AMPc. Estos productos tienen una participación activa en los procesos inflamatorios. Un mecanismo aparentemente lógico del porqué estas moléculas influyen en las funciones de la mayoría de las células inmunocompetentes, es que las prostaglandinas y principalmente el tipo E, activan el sistema enzimático adenilato-ciclase, lo que provoca un incremento en los niveles de AMPc, el cual inhibe la actividad de la fosfolipasa de la membrana celular y con esto se provoca que la célula presente un estado refractario a posteriores estímulos (171).

En forma general las alteraciones funcionales que provocan -- las prostaglandinas en la mayoría de las células del organismo -- son:

- inhiben la síntesis de nucleótidos cíclicos;
- generan cambios en la membrana celular, alterando principalmente la composición lipídica y protéica, que se traduce en un -- trastorno de la permeabilidad membranal;
- inhiben la actividad de algunas enzimas.

En particular, las alteraciones funcionales que se inducen en las células inmunocompetentes son:

- inhiben la síntesis de linfocinas;
- inhiben la síntesis de anticuerpos;
- inhiben la expresión de moléculas de superficie (Fc y MHC);
- inhiben la proliferación de la serie mieloide.

Se ha observado que estas alteraciones celulares se detectan después de períodos breves de exposición a las prostaglandinas -- (24 horas).

Por su parte el macrófago no parece manifestar estas alteraciones biológicas y por el contrario se incrementa su fagocitosis y síntesis de colagenasa, aunque muestra una correlación inversa entre los niveles de prostaglandinas (en especial PGE_2) y la IL-1 (171,172).

Como dato adicional y muy importante, es necesario mencionar que en los procesos neoplásicos, las células tumorales parecen -

inducir la síntesis de prostaglandinas en el macrófago (101,169-172).

SUPRESION DE LA RESPUESTA INMUNE POR SUSTANCIAS SOLUBLES DIFERENTES A LAS PROSTAGLANDINAS.

Un gran número de reportes determinan que en sistemas experimentales in vitro, la respuesta inmune se encuentra inhibida cuando hay un exceso en el número de macrófagos. Por lo que se considera que estas células son responsables de la liberación de sustancias solubles con efecto supresor (15,16,22).

Aunque las primeras evidencias experimentales no determinaban la naturaleza química de las sustancias involucradas en la supresión, ésta puede deberse a algunas proteínas séricas (α_2 macroglobulina y apolipoproteína E) que cuando rebasan los límites de concentración fisiológica muestran efectos supresores (15,22,24).

Pero también algunas sustancias inmunoreguladoras (citocinas) que se producen a nivel sistémico o local manifiestan efectos duales o antagónicos que pueden explicar la supresión generada por el macrófago.

Uno de estos casos lo representa la IL-1 (interleucina 1) que por sí sola puede generar efectos citostáticos o inducir la síntesis de otras moléculas supresoras, como son las proteínas de fase aguda (en hígado) y las prostaglandinas.

La IL-6 (interleucina 6) que es una molécula involucrada en la diferenciación y activación de algunas células inmunocompetentes en condiciones fisiológicas, puede mostrar un efecto bloqueador cuando se alteran las condiciones normales.

El IFN- γ (interferón gamma) y el TNF (factor de necrosis tumoral) manifiestan efectos antiproliferativos cuando su concentración se encuentra incrementada en el microambiente.

Otra molécula no menos importante, sintetizada por el macrófago es el TGF- β (factor transformante del crecimiento tipo beta) cuyo efecto supresor se traduce en la inhibición de las funciones celulares, dentro de las cuales se destacan las siguientes:

- suprime la proliferación de células inmunocompetentes;
- impide la expresión del ARN lo que acarrea como consecuencia la inhibición de la síntesis protéica.
- interfiere con la actividad citotóxica de las células NK y LAK.

Por todo lo anterior es necesario considerar al macrófago no solamente como una célula fagocítica o una célula presentadora de antígeno, sino también como una célula potencialmente supresora.

2.3 SUPRESION DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIANTE LA LIBERACION DE PRODUCTOS SOLUBLES POR CELULAS TUMORALES.

La participación de la inmunología en el estudio del rechazo a tumores tiene por objetivo tratar de explicar las complejas interacciones que se suceden entre las células inmunocompetentes del hospedero y las células tumorales.

Por tal motivo se han generado un gran número de investigaciones clínicas y experimentales que pretenden evaluar el sistema inmune de los individuos que desarrollan un proceso neoplásico. En la mayoría de estas investigaciones se observa como característica, que en ellos se manifiesta un estado de inmunosupresión (177-191).

Las alteraciones en las valoraciones funcionales (respuesta inmune celular y humoral) realizadas en este tipo de individuos, tratan de ser explicadas o correlacionadas con la presencia de sustancias solubles que se han reportado con un efecto supresor (177-191).

Existen algunas sustancias normalmente producidas en el organismo de muchos individuos, que producen un estado de supresión (110,175).

Las proteínas séricas tales como:

Albúmina

Proteínas asociadas a la fracción α -globulina

Glicoproteínas

Proteína C reactiva

Lipoproteínas (de diferentes densidades)

Las hormonas glucocorticoides: progesterona, estrógenos, andrógenos.

Prostaglandinas.

Y proteínas de la fase aguda (producidas en el hígado) manifiestan un efecto supresor, cuando son evaluados los parámetros inmunes en pacientes con cáncer e individuos sanos (110,172,176).

Se desconocen los mecanismos responsables de tal efecto, pero se cree que es debido a las altas concentraciones en que se manifiestan este tipo de moléculas solubles. La explicación más lógica, a su incremento en pacientes con cáncer, pareciera deberse a que las células tumorales contribuyen en gran medida a su síntesis.

Otros sistemas experimentales, demuestran la presencia de factores supresores, en el suero de individuos con cáncer (175, 178,181,183,184,190,193,194) y/o en los extractos solubles del tejido tumoral.

El efecto supresor de esta clase de sustancias se ha manifestado cuando se realizan valoraciones funcionales del sistema inmune de individuos sanos o de pacientes (176-191).

En estas evidencias experimentales, aunque se manifiesta una excelente correlación en la producción y detección de factores solubles con la alteración de las funciones inmunes, se debe tener presente como única limitante la incapacidad de demostrar realmente a la célula tumoral como fuente principal de esos factores supresores, pues existe gran número de componentes séricos y tisulares normales que pueden generar el mismo efecto (110,172,175,176). Por otro lado, los extractos solubles de la masa tumoral, inclu--

yen componentes celulares normales y componentes de células tumorales.

Algunos sistemas experimentales que emplean los sobrenadantes del cultivo de las células tumorales, demuestran que éstas pueden producir sustancias solubles que bloquean o interfieren con la expresión de la inmunidad humoral o celular (117,179,180,182,187).

Estas evidencias se han logrado establecer en diversos tipos de tumores y en diferentes especies animales (175-191).

Sin embargo existen pocas evidencias experimentales que revelan la producción de factores supresores, por tumores pulmonares, además de ser indirectamente demostrados, ya que la supresión de las funciones inmunes valoradas se debe principalmente a que dichos factores solubles son obtenidos del suero de pacientes y de extractos solubles del tejido tumoral (110,192,193,194).

Se ha reportado que muchas clases de tumores, así como algunos carcinomas pulmonares (176) pueden producir y liberar hormonas, tales como:

Corticotrofina

Hormona estimulante de los melanocitos

Hormona antidiurética

Oxitocina y Neurofisisina

Hormona paratiroidea

Gonadotrofina

Hormona estimulante de la tiroides

Hormona del crecimiento

Glucagón e insulina

Tirocalcitonina y prolactina

Renina, etc., etc.

También se ha determinado que los tumores pulmonares son capaces de sintetizar algunas enzimas, cuya actividad se manifiesta principalmente en el sistema nervioso (Hipotálamo) y ellas son:

- Enolasa
- L-Dopa descarboxilasa
- Creatincinasa.

Esta clase de hormonas y enzimas pueden generar alteraciones neurológicas, hematológicas y bioquímicas que indirectamente influyen en la capacidad inmune del individuo durante el desarrollo tumoral (176,195,196).

Otro tipo de sustancias que producen los tumores pulmonares son los factores de crecimiento, que son considerados como moléculas multifuncionales ya que actúan en un gran número de células blanco estimulando su proliferación celular, situación que los propone como un control de la proliferación y diferenciación celular.

Los factores de crecimiento producidos por algunos tumores -

mayoría de las células del organismo, los demás pueden actuar en forma conjunta o individual para producir neovascularización y aumento del tejido conectivo con el fin de favorecer el crecimiento tumoral (moduladores de la carcinogénesis)(195,197,198,199).

Los tumores pueden producir y liberar, además de las moléculas antes mencionadas, una gran variedad de sustancias solubles - que han sido pobremente definidas pero que también pueden manifestar un efecto supresor.

Por último es necesario mencionar que el grupo de cáncer del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, ha reportado -- previamente que los linfocitos que infiltran a tumores (LIT) pulmonares tipo adenocarcinoma presentan un fenotipo CD-8⁺ y una incapacidad para proliferar frente a estímulos mitogénicos. Este comportamiento es totalmente opuesto al que exhiben las estirpes epidermoide y de células pequeñas (203).

OBJETIVO

El objetivo de esta tesis es valorar mediante el uso de sistemas de cultivo in vitro lo siguiente:

- 1.- Establecer si los tumores pulmonares son capaces de liberar sustancias solubles supresoras que interfieran con la proliferación de las células inmunocompetentes.
- 2.- Además, reconocer si la capacidad de producir y liberar esta clase de factores es una característica común a los tumores pulmonares o es exclusiva de alguna estirpe en particular.
- 3.- Tratar de correlacionar nuestros resultados experimentales con los obtenidos a partir de biopsias humanas.
- 4.- Todo esto con la finalidad de definir y esclarecer los mecanismos de evasión inmune que exhiben este tipo de neoplasias.

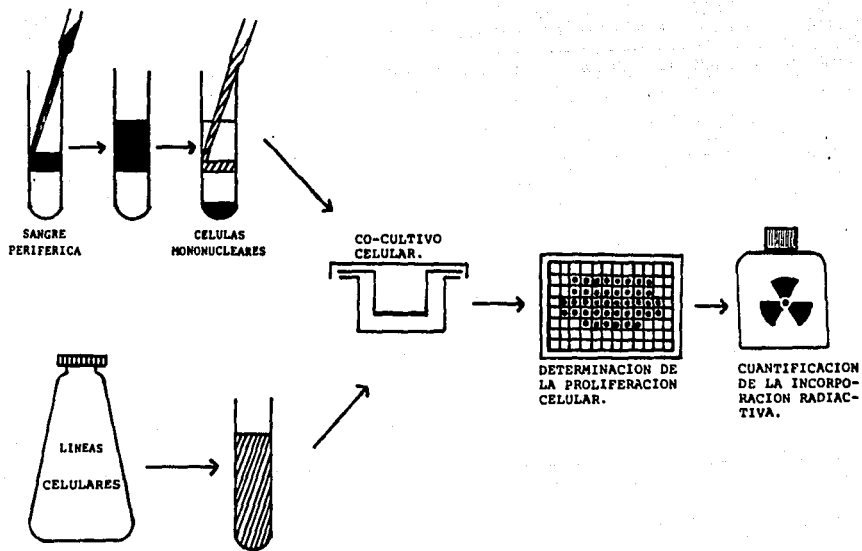


Fig. 2. DIAGRAMA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL

MATERIALES Y METODOS

4.1 LINEAS CELULARES

Todas las líneas celulares manejadas en esta investigación fueron proporcionadas por el American Type Culture Collection (ATCC) (204) y mantenidas en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco No. Cat. 330-2511) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Flow No. Cat 22102), glutamina a una concentración final 200 mM (Kodak No. Cat 1355627), bicarbonato de sodio (Gibco No. Cat. R494453), además de aminoácidos no esenciales (Gibco No. Cat. 320-1140) y piruvato de sodio (sigma No. Cat. S8636). También se adicionó una mezcla de antibióticos de amplio espectro tales como penicilina (100 u/ml Sector Salud Clave 1921) y estreptomycinina (100 µg/ml PISA No. Cat.2403). Este mismo medio de cultivo se utilizó en todos los procedimientos experimentales realizados.

Cada línea celular se mantuvo en cajas de cultivo T75 (Costar No. Cat 3375) hasta el momento de su empleo.

Todas las líneas celulares son derivadas del humano y aquellas que son obtenidas de tumores pulmonares, representan las estirpes más frecuentes en nuestro medio y a nivel mundial de esta patología; algunas de sus características particulares son resumidas a continuación (204).

ADENOCARCINOMA PULMONAR: Está representado por la línea celular A-427, su crecimiento es en forma de monocapa, adherida a la

superficie plástica de la caja de cultivo, su morfología es similar a una célula epitelial, con unas prolongaciones citoplasmáticas muy características. La viabilidad normal de estas células, mantenidas en cultivo es de 78%.

El tiempo de duplicación celular es en un periodo de 30-36 horas.

CARCINOMA PULMONAR EPIDERMÓIDE: La estirpe mencionada se representa con el uso de la línea celular SK-MES-1. Su crecimiento aparenta una monocapa de células adheridas a la superficie plástica de la caja de cultivo. Su morfología es muy similar a una célula epitelial y la viabilidad de estas células mantenidas en cultivo es normalmente de 90%. La duplicación celular está considerada en un amplio periodo de tiempo de 24-48 horas.

CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS PEQUEÑAS: Lo representa la línea celular NCI-H69. Su forma de crecimiento es en suspensión y su morfología es de agregados celulares. La viabilidad normal de estas células en cultivo es de 55-65%. El tiempo de duplicación celular es de 72 horas.

ERITROLEUCEMIA: La línea celular K-562 fue obtenida por el ATCC de individuos con Leucemia mielocítica crónica. Su crecimiento es en forma de monocapa, pero algunas células también crecen en suspensión.

La apariencia de una célula linfocítica, caracteriza a su morfología; la viabilidad normal de estas células mantenidas en cultivo es de 90% además de manifestar un tiempo de duplicación celular de

24 horas.

LINFOMA: Está representado por la línea celular Jurkat, cuya morfología es de una célula linfoide que manifiesta una única prolongación citoplasmática muy característica. Su desarrollo en cultivo es en cierta proporción adherido a la superficie plástica (monocapa) o bien puede observarse parte de su crecimiento en suspensión.

La viabilidad normal de esta célula es de 70-90%, y el periodo de su duplicación celular es de 24 horas aproximadamente.

4.2 OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES SANGUINEAS

A partir de 20 ml de sangre heparinizada, obtenida de individuos sanos por venopunción, se procedió a separar las células mononucleares empleando un gradiente de densidad de ficoll-hypaque (Nycomed No. Cat 802912), según el método de Böyum (205).

Las células mononucleares fueron separadas y lavadas con solución salina blanceada para eliminar los restos de plaquetas y excesos de ficoll-hypaque.

Posteriormente fueron mantenidas en congelación, con una mezcla de suero fetal bovino (Flow No. Cat. 22102) y dimetil sulfóxido (Merck No. Cat. 802912), a una temperatura de -70°C hasta el momento de su empleo en el co-cultivo celular.

4.3 CO-CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES SANGUINEAS Y CELULAS TUMORALES.

Las líneas celulares mantenidas en cultivo se separaron, algunas de ellas en forma mecánica (K-562, Jurat, NCI-H69) y el resto por métodos enzimáticos y mecánicos (A-427, SK-MES-1), según el tipo de crecimiento. Para lo cual se empleó una mezcla de tripsina-verseno (Microlab D8410) cuya actividad enzimática fue bloqueada con suero fetal bovino (Flow No. Cat. 22102).

Una vez separadas de las cajas de cultivo, las células se lavaron tres veces con solución salina balanceada para eliminar exceso de medio de cultivo o de tripsina-verseno.

Posteriormente se determinó la viabilidad y su concentración se ajustó en base a la primera, a razón de $1-1.6 \times 10^6$ cel/ml mediante el uso de un colorante vital como lo es azul tripano (Sigma No. Cat. T9520). Es conveniente señalar que se determinaron estos dos límites de concentración de acuerdo al tiempo de duplicación celular reportado, para obtener al final del co-cultivo una densidad similar en todos los casos.

Un mililitro de la suspensión celular (1.0 ó 1.6×10^6 cel/ml), se concentró en un volumen de $600 \mu\text{l}$, el cual fue colocado en cajas de 24 pozos (Costar No. Cat. 3524), sobre cada pozo al que le fueron adicionadas las células tumorales, se colocó el sistema de co-cultivo celular (Sistema transwell. Costar No. Cat. --

3413) (206,207), que consiste en una canastilla plástica con fondo semi-permeable, el cual formó un sistema de cultivo con dos cámaras (superior e inferior).

Por otro lado, las células mononucleares sanguíneas se descongelaron y lavaron con solución salina balanceada, ajustando su concentración a 1×10^7 cel/ml en medio de cultivo.

A partir de esta suspensión de células mononucleares se colocaron 100 μ l en la cámara superior del sistema de co-cultivo, para después ser incubado por un período de 18-24 horas, a una temperatura de 37°C con atmósfera de 5% de bióxido de carbono.

El sistema de Co-cultivo está formado de dos cámaras (superior e inferior) separadas por una membrana de policarbonato, con poro de 0.45 μ m que impide el contacto directo entre las dos diferentes poblaciones celulares, pero que permite la libre difusión de sustancias solubles o partículas de tamaño menor al diámetro del poro. Lo anterior permite su aplicación al estudio de las interacciones celulares a través de mediadores solubles (206,207).

En la figura No. 3 se muestra la representación esquemática del co-cultivo celular.

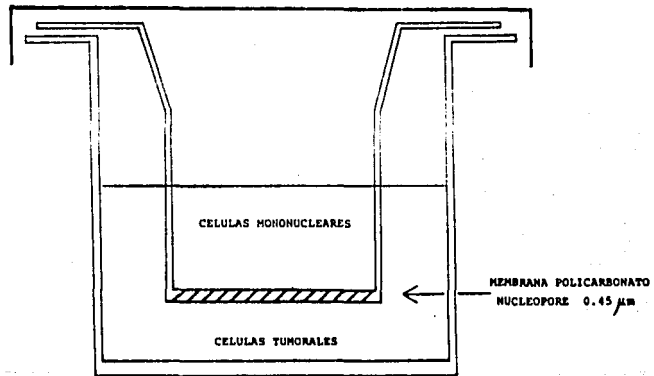


FIG. 3 REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CO-CULTIVO CELULAR
(SISTEMA TRANSWELL)

En los sistemas de co-cultivo celular de cada individuo, se incluyeron dos controles: 1) El primero de ellos, únicamente contenía células mononucleares sanguíneas en el compartimiento superior del sistema. 2) El segundo control, contenía células mononucleares sanguíneas en ambos compartimientos del sistema (cultivo control 2).

Este tipo de controles representan las condiciones regulares del desarrollo experimental.

Por otro lado, las células mononucleares enfrentadas a las diferentes líneas celulares en el sistema de co-cultivo (cultivos experimentales), se designaron con una letra en especial.

La descripción de los sistemas de co-cultivo empleados para cada individuo, se encuentra en la tabla No. I

| | COMPARTIMIENTO SUPERIOR | COMPARTIMIENTO INFERIOR |
|-----------|-------------------------|---------------------------------|
| CONTROL 1 | CELULAS MONONUCLEARES | MEDIO |
| CONTROL 2 | CELULAS MONONUCLEARES | CELULAS MONONUCLEARES |
| K | CELULAS MONONUCLEARES | LINEA TUMORAL K-562 |
| J | CELULAS MONONUCLEARES | LINEA TUMORAL JURKAT |
| A | CELULAS MONONUCLEARES | LINEA TUMORAL ADENOCARCINOMA |
| S | CELULAS MONONUCLEARES | LINEA TUMORAL EPIDERMÓIDE |
| N | CELULAS MONONUCLEARES | LINEA TUMORAL CELULAS PEQUEÑAS. |

Tabla I: Sistemas de co-cultivo celular.

4.4 ESTIMULACION MITOGENICA

Después del período de incubación del co-cultivo celular, únicamente se recuperaron las células mononucleares del compartimiento superior, las mismas que se lavaron con solución salina balanceada.

Nuevamente se determinó su viabilidad y se ajustó su concentración a 1×10^6 cel/ml de la cual se depositó 100 μ l en cada pozo de una placa de microtitulación (Nunc. No. Cat. 1-67008).

Posteriormente se adicionó a los pozos que sirven como control de la proliferación basal 100 μ l de medio de cultivo -- (cultivos no estimulados).

A los pozos restantes se les adicionó 100 μ l de mitógeno - concanavalina-A (Sigma No. Cat. C-2010) que es específico para estimular la proliferación de linfocitos T (cultivos estimulados), el mitógeno fue diluido en medio de cultivo para obtener una concentración final de 10 μ g/ml o 1 μ g/pozo.

Es importante señalar que estas determinaciones se realizaron por cuadruplicado y en ocasiones por quintuplicado.

Una vez concluidos estos procedimientos, las placas de cultivo se incubaron durante 72 horas, a 37°C de temperatura, con atmósfera de aire estéril y 5% de dióxido de carbono. 18 horas previas al término de la incubación se adicionó a cada pozo 1.0 μ Ci de ti

midina tritiada (Dupont NEN products No. Cat. NET-027).

4.5 COSECHA CELULAR Y DETERMINACION DE LA INCORPORACION RADIATIVA.

Finalmente las células mononucleares que fueron cultivadas en las placas de 96 pozos, se recuperaron en un cosechador de células (Brandel MH-12 serie 8635), y el ADN celular que incorporó la marca radiactiva es retenido en un papel de fibra de vidrio (Wittaker No. Cat. 23-995).

Cada fragmento de papel fue colocado en viales de vidrio a los que se adicionó líquido de centelleo, para posteriormente determinar la radiactividad en un contador de centelleo (Beckman modelo LS 6000SE No. Cat. 606603).

Los resultados de la incorporación de timidina tritiada son directamente proporcionales al índice de proliferación celular y son reportados en cuentas por minuto (CPM).

4.6 DETERMINACION DE LA INHIBICION EN LA PROLIFERACION CELULAR

Los resultados expresados en cuentas por minuto (CPM), que representan la proliferación máxima del cultivo control 2 y de los cultivos de células mononucleares en presencia de células tumorales (cultivos experimentales), se incluyen en la siguiente relación matemática la cual permite calcular el porcentaje de inhibición inducido por las células tumorales sobre las células mononucleares sanguíneas.

$$\% \text{ INHIBICION} = \frac{\Delta \text{CPM Cultivo experimental} - 1}{\Delta \text{CPM Cultivo control 2}} \times 100$$

Δ CPM Cultivo experimental:

CPM del cultivo experimental ESTIMULADO - CPM del cultivo experimental NO ESTIMULADO

Δ CPM Cultivo control 2:

CPM del cultivo control 2 ESTIMULADO - CPM del cultivo control 2 NO ESTIMULADO

4.7 ANALISIS ESTADISTICO

A cada sistema experimental se le determinó su error estándar para confirmar la veracidad y reproducibilidad de los métodos.

Empleando como análisis estadístico, la prueba T de Student.

RESULTADOS

Se realizaron una serie de diez experimentos para investigar la inhibición en la proliferación celular de las células mononucleares sanguíneas de individuos sanos, como consecuencia de un contacto indirecto mediado por factores solubles liberados de cinco diferentes líneas celulares. Dos de ellas fueron líneas celulares de tumores diversos, empleadas como control para el consumo de nutrientes y liberación de desechos metabólicos.

Las tres líneas celulares restantes son derivadas de tumores pulmonares, pues cada una de ellas representa a las estirpes tumorales de mayor incidencia en nuestro medio y a nivel mundial.

Los resultados encontrados en la investigación son los siguientes:

5.1 INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR EN FUNCION DEL TIEMPO

Al tratar de conocer y establecer las condiciones experimentales de esta investigación, se consideraron diferentes tiempos de incubación en el co-cultivo celular, con el objeto de seleccionar el período en el que se logra apreciar un mayor efecto provocado por la presencia de las células tumorales o bien de sus productos celulares solubles.

Los diferentes períodos de incubación del co-cultivo celular que fueron probados son:

6, 15, 18, 24, horas.

Y los resultados obtenidos, manifiestan que un mayor efecto sobre la proliferación celular se logra observar en los períodos de tiempo comprendidos entre las 18-24 horas.

5.2 INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR COMO CONSECUENCIA DE LA DENSIDAD DE CELULAS TUMORALES.

Nuevamente, una característica importante que debe resaltarse es que al pretender establecer, estandarizar y mantener constantes las condiciones experimentales fué necesario manejar diferentes relaciones o proporciones entre las poblaciones de células mononucleares sanguíneas y células tumorales.

Las relaciones celulares manejadas fueron:

| | | |
|---------|-----|---------------------------|
| CM : CT | 1:4 | CM- células mononucleares |
| | 1:1 | CT- células tumorales |

El efecto inhibitor en la proliferación celular es mucho mayor cuando la población de células tumorales se había aumentado, es decir que se observa una correlación directa.

Además, la viabilidad de las células mononucleares sanguíneas sólo se vió afectada, cuando eran co-cultivadas con poblaciones de células tumorales que le superaban en número. Resultados que se pueden apreciar en la tabla No. II

| Relación CM:CT | Sólo células mononucleares | 1:1 | 1:4 |
|-------------------------------------|----------------------------|-------|-------|
| Estimulación mitogénica (CPM) | 33758 | 14145 | 7588 |
| Inhibición de la proliferación (%). | ----- | 58.09 | 76.47 |
| Viabilidad de cel. mononucleares | 90.90 | 90.08 | 74.43 |

Tabla No. II Determinación de las condiciones experimentales.

Apyados en los resultados anteriores y en algunos antecedentes bibliográficos (192,209), las condiciones que se establecieron para realizar el co-cultivo celular fueron:

Tiempo de incubación 18-24 horas
 y la relación de poblaciones celulares 1:1

5.3 ESTIMULACION MITOGENICA:

Después de realizar el co-cultivo celular, las células mononucleares sanguíneas eran recuperadas y cultivadas en presencia del mitógeno (Con-A) que estimularía su proliferación .

Si existen alteraciones en las funciones celulares, causadas por las células tumorales durante el co-cultivo, se observará una alteración en su proliferación, con respecto a la multiplicación de las células mononucleares sanguíneas del mismo individuo que no

fueron enfrentadas con las células tumorales (Cultivo control 2).

Los resultados de la estimulación mitogénica de cada individuo se observan en la figura No. 4.

- Las dos primeras barras de cada gráfica, señaladas como C_1 y C_2 respectivamente, manifiestan la proliferación celular normal para cada individuo, interpretándose en cuentas por minuto por la incorporación de la marca radiactiva.

- El siguiente par de barras en cada gráfica, representan la proliferación de las células mononucleares enfrentadas a las líneas celulares de tumores no pulmonares. La barra designada con la letra K revela la estimulación mitogénica de las células de cada individuo, después de ser co-cultivadas con la línea celular de eritoleucemia (K-562), y como se puede apreciar en la mayoría de los casos, induce una disminución en su proliferación.

Esta misma característica se repite para las células que fueron enfrentadas en el co-cultivo a la línea celular del linfoma (Jurkat), pues las barras designadas con la letra J manifiestan un decremento en la proliferación.

- Las últimas tres barras en cada gráfica, representan las estimulaciones mitogénicas de las células mononucleares que fueron co-cultivadas con las tres estirpes de tumores pulmonares. Es evidente que las barras designadas con la letra A indican una mínima proliferación celular en la totalidad de los casos estudiados.

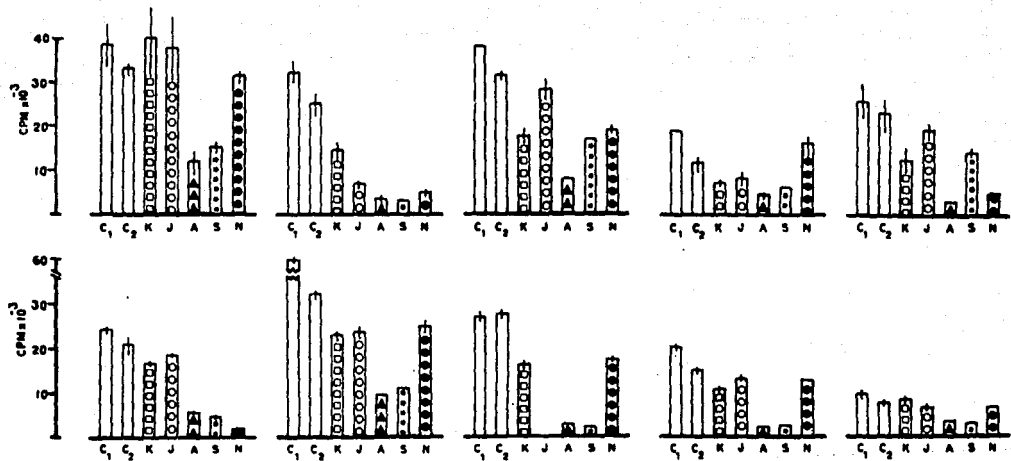


Figura No. 4 Estimulación mitogénica de las células mononucleares de cada individuo, después de ser co-cultivadas con las distintas -- líneas celulares.

En contraste, las células mononucleares de nuestro grupo de individuos estudiados, que fueron co-cultivadas con las líneas del carcinoma epidermoide y del carcinoma de células pequeñas representadas en cada gráfica por las letras S y N respectivamente, no manifiestan un comportamiento de inhibición uniforme. Es decir, que sólo en algunos casos la proliferación celular se ve afectada seriamente, mientras que en otros no parece existir alteración alguna en la funcionalidad celular. Sin embargo, la estimulación de las células sanguíneas enfrentadas a los tumores pulmonares tipo adenocarcinoma y epidermoide siempre fué mínima con respecto a la inducida por los tumores no pulmonares y los controles.

Debido a que la capacidad proliferativa de las células inmuno competentes en cada individuo varía dependiendo de sus características genéticas, se observa en la figura No. 4 una heterogeneidad en su respuesta, lo cual impide apreciar con facilidad el fenómeno de supresión lograda por las células tumorales y por esta razón es necesario interpretar los resultados en porcentajes de inhibición.

5.4 INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR:

Empleando los resultados en cuentas por minuto de la proliferación celular, de los cultivos experimentales y control, los cuales son incluidos en una relación matemática, se logró manifestar los resultados en porcentajes de inhibición de la proliferación celular (ver metodología).

Si la inhibición de la proliferación celular se muestra como un efecto independiente de cada línea celular tumoral, se puede apreciar lo siguiente:

- Los resultados que reportan el efecto de la eritroleucemia (K-562) sobre las células sanguíneas de los diez individuos, se encuentran en la primera gráfica de la figura No. 5 y en ella se muestran porcentajes de inhibición que se mantienen en niveles menores de 47%.

- Una situación similar es observada, en los porcentajes de inhibición que provoca en la proliferación celular, la línea Jurkat (Linfoma). Pues en la mayoría de los casos se aprecian niveles menores de 30%, a excepción de un solo caso, el cual exhibe niveles de 73% en la inhibición de la proliferación celular y que pareciera inexplicable, por el comportamiento tan uniforme del resto de los individuos del grupo.

- La inhibición en la proliferación de las células mononucleares sanguíneas, inducida por la línea del adenocarcinoma pulmonar (A-427) es muy elevada, con valores que se mantienen en un 70 a 90%

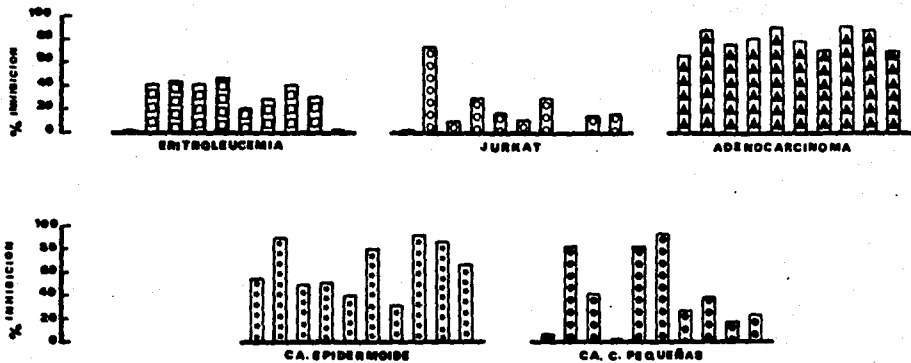


Figura No. 5 Porcentajes de inhibición en la proliferación celular causados por las distintas líneas celulares.

en la totalidad de los individuos, lo que sugiere que ésta línea celular produce factores solubles que influyen directamente sobre la proliferación celular.

- Los porcentajes de inhibición en la proliferación celular que generan las dos estirpes pulmonares (Ca. epidermoide y Ca. de C. pequeñas) restantes, son muy variables y los niveles en que se manifiestan son muy amplios por lo que es evidente reconocer este comportamiento tan contrastante.

El carcinoma epidermoide (SK-MES-1) logra establecer una inhibición en valores que van desde 30 a 90%. Y sólo en cinco de los diez individuos estudiados se aprecia una severa alteración, la cual se mantienen en niveles superiores al 50% (valores de 66 - 90%); los cinco individuos restantes muestran una inhibición de su proliferación en niveles inferiores de 50%.

El carcinoma de células pequeñas provoca alteraciones a la proliferación de las células mononucleares sanguíneas en valores aun más variables que van desde 0 hasta 93%. En este caso siete individuos presentan un bloqueo de su proliferación en niveles menores del 40%, mientras que los tres individuos restantes manifiestan porcentajes de inhibición superiores a 80%.

DISCUSION DE RESULTADOS

6.1 SELECCION DEL SISTEMA DE CULTIVO Y ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES EXPERIMENTALES.

El cáncer puede ser ya descrito, pero aún desafía la existencia de su definición científica. Las características más importantes de los tumores malignos, desde el punto de vista clínico y experimental son el crecimiento celular en forma desorganizada, la tendencia de invadir y diseminarse por el aparente fracaso de los mecanismos de control del sistema inmune (1,27,95).

A lo largo del siglo han surgido un gran número de investigaciones para tratar de entender y establecer las posibles interacciones que existen entre los componentes celulares del sistema inmune y las células tumorales, muchos de los resultados obtenidos han sido tema de especulación, pero algunos otros aportan datos que sirven para cimentar y continuar con nuevas investigaciones.

Uno de los datos más importantes obtenidos en el estudio del cáncer, es que los individuos que desarrollan un proceso neoplásico manifiestan una supresión cuali y cuantitativa de su sistema inmune (177-191).

Las investigaciones que aportan este dato son en su mayoría, producto del estudio de la respuesta inmune a nivel sanguíneo (175 178,181,183,184,190,193,194), resultando escasos los trabajos realizados in situ para lograr un mejor conocimiento de la inmunidad

en el sitio del tumor (49,208,210).

La principal causa que limita la investigación de la inmunidad tumoral a nivel local, se debe a los problemas metodológicos que existen en la separación de las células inmunes y neoplásicas de la masa tumoral, además de la presencia de innumerables sustancias y componentes tisulares cuyo origen no está bien establecido, pero que su presencia y actividad biológica parecen ser importantes.

Las investigaciones previamente realizadas en el laboratorio de cáncer pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias sobre la respuesta inmune a nivel local, con el objeto de establecer las relaciones entre las células tumorales y los mecanismos inmunes del huésped, mediante la separación y estimulación de los linfocitos que infiltran al tumor (TIL) en los distintos tipos de tumores pulmonares, demostró que existe una incapacidad de proliferación en los TIL, así como un aumento de linfocitos CD-8⁺ en los tumores tipo adenocarcinoma (203).

Estos datos nos impulsaron a generar sistemas de cultivo in vitro para tratar de averiguar los posibles mecanismos de supresión inmune observados anteriormente. Además con el uso de líneas celulares para el estudio del cáncer pulmonar se permite conocer la biología, bioquímica, inmunología y fisiología de esta patología (30,195,196).

Por tal motivo se empleó un sistema de co-cultivo, que involucra la participación de líneas celulares y células mononucleares sanguíneas, lo que permite imitar in vitro las interacciones que a nivel local se realizan durante el reconocimiento y rechazo a tumores, con la finalidad de evaluar si la supresión de la respuesta inmune observada en el hospedero es producida por factores solubles liberados de tumores o bien es necesario un contacto directo célula-célula.

Para realizar el co-cultivo celular fué necesaria la búsqueda de condiciones experimentales adecuadas. Inicialmente se estableció el tiempo de incubación, seleccionando aquellos periodos donde se logra apreciar un mayor efecto inhibitor en la proliferación de las células mononucleares debido a la presencia de las células tumorales en el compartimiento anexo de la cámara de co-cultivo. -- Como se observa en los resultados, se eligió el periodo de incubación de 18-24 horas el cual se mantuvo constante durante el desarrollo de la investigación para evitar en lo posible las variables metodológicas que pudieran influir en los resultados.

Otra de las condiciones experimentales establecidas, fué la relación o proporción célula tumoral-célula mononuclear en la que se mostraba una mayor inhibición en la proliferación de las células mononucleares, evitando que el efecto estuviera acompañado de otros factores tales como; el agotamiento de nutrientes, la presencia de desechos metabólicos tóxicos y la acidificación prematura -

del medio de cultivo como consecuencia de un acelerado metabolismo por la alta densidad celular, por lo que se prefirió el manejo de poblaciones celulares en relación 1:1, con un tiempo de incubación de 18-24 horas, pues son las condiciones donde la viabilidad de las células mononucleares no se observa alterada (ver resultados).

El establecimiento de estas condiciones experimentales está apoyado indirectamente por algunos reportes experimentales previos (192,209).

6.2 ESTIMULACION MITOGENICA

La proliferación de las células mononucleares de cada individuo están referidas en los controles C_1 y C_2 de la figura No. 4 y es ahí donde se puede apreciar dos importantes características:

-- En casi todos los individuos estudiados, se manifiesta un ligero decremento en la proliferación del control C_2 respecto a su control C_1 , lo cual puede ser consecuencia de las condiciones experimentales, ya que el control C_1 contiene solamente un millón de células mononucleares en el compartimiento superior (ver metodología), por lo que su proliferación estimulada es óptima y se considera como la máxima para cada individuo, mientras que en el control C_2 donde se adicionan por cultivo un millón de células mononucleares en el compartimiento superior y dos millones de células del mismo individuo en el compartimiento inferior del sistema, se considera el efecto causado por el metabolismo de otras células --

sobre la proliferación máxima. Debido a que este control C_2 (cultivo control 2) refleja en forma más adecuada el desarrollo regular del modelo experimental, fué empleado como punto de referencia para determinar el porcentaje de inhibición en la proliferación que provoca cada línea celular.

- También es evidente reconocer la variación en la proliferación celular normal, considerando los niveles manifestados por cada uno de los individuos que integran el grupo de estudio, demostrándonos que la capacidad de respuesta proliferativa es independiente y diferente en individuos de una misma especie.

La proliferación de las células mononucleares enfrentadas en co-cultivo a las líneas celulares de tumores no pulmonares (Jurkat y K-562), parece que no fué afectada severamente (Fig. 4), pues en algunos casos los niveles de duplicación llegan a ser similares a los reportados en los controles C_1 y C_2 . La inclusión de estas dos líneas celulares tiene como finalidad evaluar el efecto metabólico que tiene la presencia de células tumorales en el compartimiento inferior del sistema, sobre la proliferación normal.

Por otro lado, las células mononucleares de cada individuo que fueron enfrentadas a los tumores pulmonares en el co-cultivo celular, demuestran severas alteraciones en su proliferación, lo cual se puede apreciar claramente en la figura No. 4. Pero aún así se puede distinguir que la línea del adenocarcinoma pulmonar genera profundas alteraciones en la proliferación celular (obser-

var barras designadas con la letra A) de todos los individuos, -- comparadas con las generadas por los otros tumores.

Los resultados obtenidos del co-cultivo celular con las estirpes pulmonares restantes manifiestan un comportamiento muy variable, por lo que no es sencillo concluir acerca de las alteraciones reales provocadas en cada individuo (barras designadas con las letras S y N).

Para interpretar objetivamente el efecto que una sola línea celular manifiesta sobre el conjunto de individuos es necesario -- reportar los resultados en porcentajes de inhibición.

6.3 INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR

Los resultados de la inhibición en la proliferación celular, se obtuvieron después de incluir en una relación matemática los resultados de la estimulación mitogénica.

Si en la sección anterior se establece que los tumores no pulmonares (Jurkat y eritroleucemia) generan alteraciones mínimas a la proliferación de las células mononucleares sanguíneas, es lógico esperar que los porcentajes de inhibición en la proliferación -- celular se manifiesten en niveles muy bajos.

La línea de la eritroleucemia afecta la proliferación celular en niveles inferiores a 47%, mientras que la línea del linfoma -- (Jurkat) inhibe la proliferación celular en porcentajes menores de 30%, estos dos comportamientos hasta cierto punto pueden llegar a

ser apreciados como normales, pues un verdadero efecto de inhibición en la proliferación es considerado por los diferentes grupos de investigadores que trabajan sobre supresión inmune, cuando es superior al 50% (165,167,177,179,192).

Por otro lado, la alteración que provoca la línea del adenocarcinoma pulmonar (A-427) en las células mononucleares, describe importantes características: 1) Esta inhibición se manifiesta en la totalidad de los individuos que integran el grupo de estudio. 2) Se mantiene en niveles de 70-90%. 3) Además de que este efecto se logra establecer en períodos cortos de cultivo.

Estas evidencias experimentales nos llevan a concluir que es una línea celular capaz de producir factores solubles que directamente influyen sobre la capacidad proliferativa de las células mononucleares. Si este fenómeno tan particular se extrapolara a todos los tumores pulmonares tipo adenocarcinoma, puede ser indicativo de uno de los mejores mecanismos de evasión a la respuesta inmune del hospedero.

Como ya se mencionó, los porcentajes de inhibición en la proliferación celular que genera el carcinoma epidermoide son muy variables. Es decir que en cinco individuos del grupo analizado se establecen porcentajes de inhibición menores de 50% y en la otra mitad del grupo se observa una inhibición con porcentajes mayores de 50%, esto nos puede indicar que probablemente la línea celular representante del carcinoma epidermoide es capaz de liberar factores

solubles cuya actividad biológica sólo se manifiesta en individuos con ciertas características genéticas en común o sea que su actividad esté restringida genéticamente.

Lo anterior no debe considerarse como una conclusión definitiva, pues requiere de amplia confirmación realizando otra serie de investigaciones.

Por su parte, el carcinoma de c. pequeñas manifiesta diversos niveles de inhibición en la proliferación de las células mononucleares sanguíneas de los diferentes individuos estudiados. Sólo en tres de ellos se puede observar porcentajes de inhibición cercanos a 80 y 90%, mientras que en los siete individuos restantes sus niveles de inhibición son menores a 50%. Este comportamiento tan peculiar resulta difícil de interpretar pero tal vez sea consecuencia de una susceptibilidad no genética. Situación que se observa en el comportamiento de uno de los sujetos estudiados, ya que también mostró severas alteraciones, al co-cultivar sus células con los tumores no pulmonares. (segunda gráfica de la figura No. 4 y segunda barra en las gráficas de la figura No. 5).

Antes de finalizar con esta discusión es necesario mencionarlo siguiente: (ver pag. 109).

6.4 CARACTERISTICAS ASOCIADAS A LOS FACTORES SOLUBLES LIBERADOS - POR LOS TUMORES PULMONARES

EFFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR:

Es evidente en nuestra investigación, que la estirpe adenocarcinoma libera mediadores solubles cuya actividad biológica es muy particular, pues interfiere directamente con las funciones primordiales de las células inmunocompetentes del hospedero, situación que es fácilmente observable por las alteraciones que provoca en su -- proliferación.

Además, es importante señalar que este efecto no es causado por una disminución en la viabilidad celular, por lo que se puede concluir que dichos factores solubles no son citotóxicos.

DURACION DEL EFECTO INHIBIDOR SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR:

Como detalle metodológico es importante remarcar que posterior al co-cultivo celular se recuperaron las células mononucleares y fueron sometidas a tres lavados con solución salina balanceada, con el objeto de eliminar los residuos de medio de cultivo metabolizado y/o de cualquier otra sustancia que interfiera con los ensayos de estimulación. Y aún después de este tratamiento el efecto supresor pudo ser detectado, lo que indica que las alteraciones en la proliferación celular provocadas por estos factores son irreversibles.

MODO DE ACCION DE LOS FACTORES SOLUBLES:

Se puede obtener información extra sobre el modo de acción de los factores solubles liberados por los tumores pulmonares, de acuerdo al diseño experimental empleado en el co-cultivo celular (sistema Transwell). Ya que por estar impedido el contacto directo entre las dos poblaciones co-cultivadas, podemos asumir que no es necesaria la interacción de las células membrana-membrana para permitir la liberación de un factor supresor, sino que este se produce en forma constitutiva. Además es difícil precisar el blanco celular específico de estos factores y aunque fue estimulada preferentemente la población de linfocitos T (con el mitógeno Con-A) es posible que los factores supresores actúen sobre ellos y otras células inmunes. Por lo que algunos otros mecanismos de acción son:

- 1) Que los productos liberados principalmente por el adenocarcinoma Pulmonar alteren las funciones celulares de todas las células mononucleares sanguíneas, es decir, que su actividad se manifieste en blancos inespecíficos, situación que está de acuerdo con la actividad biológica de algunas sustancias séricas normales y moléculas reguladoras que bajo ciertas circunstancias pueden generar un efecto supresor (176,195,197-202).

- 2) Una segunda posibilidad es que la actividad biológica de los factores solubles liberados del tumor activen al macrófago induciéndolo a producir sustancias inmunosupresoras, algunas de las cuales actúen sobre el linfocito T (prostaglandinas p.e.) (15,16,22,101,169-172).

3) También debe considerarse que los factores solubles puedan influir directamente sobre la capacidad proliferativa de las células T(165,167,177,179,192).

4) Y por último, que se induzca la activación de células T - supresoras durante el co-cultivo, las cuales pudieran bloquear la proliferación del resto de las células sanguíneas (29,30,100,101, 150-155,186).

CONCLUSIONES

En los individuos con cáncer pulmonar es muy común encontrar que se manifieste in situ una respuesta inmune para tratar de limitar y eliminar el desarrollo neoplásico. Pero al evaluar la eficacia de dicha respuesta, se ha encontrado que no es funcionalmente útil, razón por la cual se piensa que las células tumorales son las responsables de esta alteración.

Interesados por conocer los mecanismos con que disponen las células tumorales para evitar su destrucción, fue diseñado un sistema de co-cultivo celular el cual aportó la siguiente información:

- Los tumores pulmonares tienen la capacidad de producir y liberar sustancias solubles que interfieren con las funciones principales de las células inmunocompetentes.

- Esta es una característica que muestra en forma particular la estirpe adenocarcinoma, pues logra suprimir la capacidad proliferativa de las células mononucleares sanguíneas de cualquier individuo.

- Las alteraciones en las funciones de las células inmunocompetentes son detectadas después de un período de incubación de 18-24 horas, además de manifestarse en niveles muy evidentes.

- Al juzgar la actividad biológica mostrada por los factores solubles liberados por el adenocarcinoma pulmonar, es pertinente señalar que en ésta investigación se demostró la existencia de uno

de los mejores mecanismos de evasión tumoral, ya que cuenta con la capacidad de suprimir la respuesta inmune en su hospedero.

- Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de investigaciones tendientes a estudiar y caracterizar estructural y funcionalmente a las moléculas responsables de la supresión, con el fin de interferir su efecto, y poder proporcionar una terapia adecuada a los pacientes con cáncer.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Stutman O. Immunologic Surveillance. In: Immunity to Cancer. Academic Press U.S.A. 1985, sect 3, pp. 323-346.
- 2.- Burnet FM. Enzyme, Antigen and virus. Cambridge University U.S.A. 1956, ch. 3 and 4.
- 3.- Stutman O. Immunosuppression and malignancy. Adv Cancer Res 22; 261 1975.
- 4.- Flamand V, Biernaux C, Mechelen MV, Sornase T, Urbain J, et al. Immune surveillance, both CD-3, CD-4, and CD-3, CD-8 T cells control in vivo growth of P815 mastocytoma. Int J Cancer 45; 757-762, 1990.
- 5.- Grossman Z, Herberman RB. Immune Surveillance without Immunogenicity. Immunol Today 7; 128-131, 1986.
- 6.- Kirchner H. Immunologic surveillance and human papilomaviruses. Immunol Today 5; 272-276, 1984.
- 7.- Roder JC, Haliotis T. Do Nk cells play a role in anti-tumor-surveillance? Immunol Today 1; 96-100, 1980.
- 8.- Herberman RB, Ortaldo JR. Natural killer cells; their role in defenses against diseases. Science 214; 24-30, 1981.
- 9.- Trinchieri G, Perussia B. Human natural killer cell; Biologic and Pathologic aspects. Lab Investigation 50; 489-513, 1984.
- 10.- Herberman RB, Reynolds CW, Ortaldo JR. Mechanism of cytotoxicity by Nk cells. Am Rev Immunol 4; 651-680, 1986.
- 11.- Lainer LL, Le AM, Cwiria S, Federspiel N, Phillips JH. Antigenic, functional and molecular genetic studies of human Nk cells and lymphocytes Tc not restricted by the MHC Fed Proc 45; 2823-2828, 1986.
- 12.- Malkouska V, Sondel PM, Malkousky M. Tumor immunotherapy Current Opinion in Immunology 1; 883-890, 1989.
- 13.- Herberman RB. Natural killer (Nk) cells; Characteristics and possible role in resistance against tumor growth. In: Immunity to Cancer. Academic Press U.S.A. 1985, sect 2, pp 217-229.
- 14.- Herman J, Rabson AR. Tumor cells stimulate Interleukin 1 (IL-1) production from enriched large granular lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol 38; 282-294, 1986.

- 15.- Werb Z. Células fagocíticas, funciones quimiotácticas y efectoras de los macrófagos y granulocitos. In: Inmunología básica y clínica. Ed. Manual Moderno México, 1985. Cap 9 pp 103-118
- 16.- Russell SW. Macrophage effector and regulatory functions. In: Immunity to Cancer. Academic Press 1985, sect 2, pp 205-216.
- 17.- Weissler JC, Lipscomb MF, Lem VM, Toew GB. Tumor killing by human alveolar macrophages and blood monocytes. Am Rev. Resp Dis 134; 532-537. 1986.
- 18.- Sone S, Tachibana K, Ishii K, Ogawara N, Tsubura E. Production of a tumor cytolytic factor(s) by activated human alveolar macrophages and its action. Cancer Res 44; 646-651, 1984.
- 19.- Adams DO, Kao K-J, Farb R. Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. J Immunol 124; 293-300, 1980.
- 20.- Warren JS, Johnson KJ. Oxygen radicals in cell injury and cell death. Pathol Immunopathol Res 6; 301-315, 1987.
- 21.- Evans R, Alexander P. Mechanism of immunologically specific killing of tumor cell by macrophages. Nature 236; 168-170, 1972.
- 22.- Unanue ER, Allen RM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. Science 236; 551-557, 1987.
- 23.- Strassmann G, Springer TA, Somers SD, Adams DO. Mechanisms of tumor cell capture by activated macrophages. J Immunol 136; 4328-4333, 1986.
- 24.- Hogg N. Factor-induced differentiation and activation of macrophages. Immunol Today 7; 65-66, 1986.
- 25.- Onozaki K, Matsushima K, Kleinerman ES, Saito T, Oppenheim JJ. Role of interleukin 1 in promoting human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. J Immunol 135; 314-319, 1985.
- 26.- Bonavida BD. Tumor immunology. In: Medical microbiology. 1986 section I, ch 15, pp152.
- 27.- Garcia GG. El conocimiento moderno de la biología del Cáncer. Gaceta Médica de México 125; 69-88, 1989.
- 28.- Rosenberg SA, Longo DL, Lotse MJ. Principles and applications of biologic therapy. In: Cancer principles and practice of Oncology. J.B. Lippincott. 1989, ch 17 pp 301-347.
- 29.- Alexander P. Tumor Immunology In: The immune system. Blackwell Scientific 1976, ch 21 pp 296-305.

- 30.- Bush H. Methods in Cancer Research. Vol. II
Academic Press 1967.
- 31.- Lennox ES. What are tumor antigens?. In: Immunity to Cancer.
Academic Press U.S.A. 1985, section 1, pp 17.
- 32.- Long EO. Intracellular traffic and antigens processing.
Immunol Today 10; 232-234, 1989.
- 33.- Benacerraf B. Role of MHC gene products in immune regulation.
Science 212; 1229-1238, 1981.
- 34.- Toews GB, Vial WC, Dunn MM, Guzzeta P, Nuñez G, et al. The accessory cell function of human alveolar macrophages in specific T proliferation. J Immunol 132; 181-186, 1984.
- 35.- Zoltan AN. Why peptides? their possible role in the evolution of MHC restricted T-cell recognition. J Immunol 10; 132-138, 1989.
- 36.- Umetsu DI. Functional heterogeneity among human induce T-cell clones. J Immunol 140; 4211-4216, 1988.
- 37.- Maizel AL. Control of human lymphocyte proliferation by soluble factors. Lab Investigation 50; 369-377, 1984.
- 38.- Warner L. Cellular interactions in the immune response.
Am J. Pathol 129: 26-33, 1987.
- 39.- Weir DM. Surface carbohydrates and lectins in cellular recognition. Immunol Today. 1: 45-51, 1980.
- 40.- Mustelin T, Alton AM. Does CD-4 and CD-8 control T-cell activation via specific Tyrosin cinasa protein.
Immunol Today 10; 189-192, 1989.
- 41.- Young DEJ. Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity.
Adv in Immunol. 41; 269-332, 1987.
- 42.- Henny CS. Effector cells of T cell lineage. In: Immunity to Cancer. Academic Press. U.S.A. 1985, Sect 2 pp 197-204.
- 43.- Henny CS. The mechanisms of T-cell mediated lysis.
Immunol Today 1; 37-45, 1980.
- 44.- Roberts TE. Role of MHC Class-I antigens and CD-3 complex in the lysis of autologous human tumors by T cell clones.
Int J Cancer 39; 436-441, 1987.
- 45.- Bjorkman BJ, Saper MA, Samraoui B. Structure of the human class I histocompatibility antigen.
Nature 329; 505-512, 1987.

- 46.- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B. The foreign antigen -- binding site and T cell recognition regions of class I Histocompatibility antigens. *Nature* 329; 512-518, 1987.
- 47.- Long EO, Jacobson S. Pathways of viral antigen processing and presentation to CTL. *Immunol Today* 10; 45-48, 1989.
- 48.- Topalian SL, Solomon D, Rosenberg SA. Tumor-specific by -- lymphocytes infiltrating human melanomas. *J. Immunol* 142; 3714-3725, 1989.
- 49.- Shijubo N. Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumor. *J Immunol* 142; 2961-2969, 1989.
- 50.- Vose BM. Human tumor, lymphocyte interaction in vitro. *Int J Cancer* 20; 895-900, 1977.
- 51.- Vanky F. Lysis of tumor biopsy cells by autologous T-lymphocytes activated in mixed cultures and propagated with T cell growth factor. *J Exp Med* 155; 83-95, 1982.
- 52.- Meuer SC. The human T-cell receptor *Ann Rev Immunol* 2; 23-50, 1984.
- 53.- Noah I. Signal transduction and intracellular events in T-lymphocyte activation. *Immunol Today* 49; 271-277, 1986.
- 54.- Vanky F. Tumor biopsy cell participation in which cytotoxicity of lymphocytes is generated. *Int. J Cancer* 27; 273-280, 1981.
- 55.- Engleman EG, Benike CJ, Grumet C. Activation of human T lymphocyte subsets. *J Immunol* 127; 2124-2129, 1981.
- 56.- Sayers TJ, Ranson JH, Herberman RB. Analysis of a cytos-tatic lymphokine produced by incubation of lymphocytes with tumor cells. *J Immunol* 137; 385-390, 1986.
- 57.- Martz E, Howell DM, CTL: virus control cells first and cytolytic cells second? *Immunol Today* 10; 79-86, 1989.
- 58.- Cooper M. B lymphocyte differentiation In: Immune system. Blackwell Scientific 1976, ch 13, pp 187-205.
- 59.- Herbert F, Oettgen, Lloyd JO. The humoral immune response to human cancer. In: Immunity to cancer. Academic Press U.S.A. 1985, Sect. 2 pp 161-172.
- 60.- Mc Connel L. T and B lymphocytes In: The immune system Blackwell Scientific 1976, ch 7, pp 98-119.
- 61.- O'Garra A. Peptide regulatory factor. Interleukins and the immune system 1. *Lancet* (april) 943-946, 1989.

- 62.- O'Garra A. Peptide regulatory factor. Interleukins and the immune system 2. Lancet (may) 1003-1005, 1989.
- 63.- Balkwill FR. The cytokine Network Immunol Today 10; 299-305, 1989.
- 64.- Multi author Review. Recent developments in interferon research Experientia 45; 500-525, 1989.
- 65.- Kelly J. Cytokines of the lung. Am Rev Respir Dis 141; 765-788, 1990.
- 66.- Hunuighenke G.W. IL-1 is an chemiotactic factor for human T lymphocytes. Am Rev Resp Dis 135; 66-71, 1987.
- 67.- Mulé JJ, Shu S, Rosenberg SA. The anti-tumor efficacy of lymphokine activated killer cells and recombinat interleukin-2 in vivo. J Immunol 135; 646-652, 1985.
- 68.- Itoh K, Tilden AB, Balch CM. Lysis of human solid tumor cells by lymphokine-activated killer cells. J Immunol 136; 3910-3915, 1986.
- 69.- Herberman R.B. Lymphokine-activated killer cell activity Immunol Today 8; 178-181, 1987.
- 70.- Tilden AB, Itoh K, Balch CM. Human LAK cell: identification of two types of effector cells. J Immunol 138; 1060-1073, 1987.
- 71.- Lotzova E, Herberman RB. Reassessment of LAK phenomenology Nat Immun Cell Growth Regul 6; 109-115, 1987.
- 72.- Miltenburg AMM. Lymphokine-activated killer cells lyse human renal cancer cell lines and cultures normal kidney cells. Immunology 63; 729-731, 1988.
- 73.- Miltenburg AMM, Meijer-Peepe ME, Daha MR. Endothelial cells lysis induced by lymphokine-activated human peripheral blood mononuclear cells. Eur J Immunol 17; 1383, 1987.
- 74.- Maghazachi AA. Influence of T cells on the expression of lymphokine-activated killer cell activity and in vivo tissue distribution. J Immunol 141; 4039-4046, 1988.
- 75.- Cohen MC. The role of lymphokines in neoplastic diseases. Human Pathol 17; 264-270, 1986.
- 76.- Fauci AS. Immunomodulators in clinical medicine Ann Internal Med 106; 427-433, 1987.

- 77.- Onozaky K. Synergistic interaction of IL-1, IFN- β , TNF in terminally differentiating a myeloid leucemic cell line. *J. Immunol* 140; 112-119, 1988.
- 78.- Grabstein KS. Expression of IL-2, IFN- γ , IL-2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 136; 4503-4508, 1986.
- 79.- Bich-thuy LT. Direct activation of human resting cell by IL-2. *J Immunol* 139; 1550-1556, 1987.
- 80.- Wong GG. Multiple action of IL-6 with a cytokine network. *Immunol Today* 9; 137-139, 1988.
- 81.- Gresser I. Comentary on the varied biologic effects of interferon. *Cellular Immunol* 34; 406-415, 1977.
- 82.- Stewart WE. Interferons; cytostatic and immunomodulatory effects. In: *Immunity to Cancer*. Academic Press U.S.A. 1985, sect. 3, pp. 295-308.
- 83.- Balkwill FR. Peptide regulatory factors interferons. *Lancet* (may) 1060-1063, 1989.
- 84.- Tsujimof M. IFN- γ enhances expression of cellular receptor for TNF. *J Immunol* 136: 2441-2444, 1986.
- 85.- Ruggiero V. Induction of the synthesis of TNF receptor by IFN- γ . *J Immunol* 136; 2445-2450, 1986.
- 86.- Itoh K. Differential effect of interferon expression of IgG-Fc and IgM-Fc receptor on human lymphocytes. *J Immunol* 121; 2589-2595, 1980.
- 87.- Munker M, Munker R, Saxton RE, Koeffler HP. Effect of recombinant monokines, lymphokines and other agents on clonal proliferation of human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 47; 4081-4085, 1987.
- 88.- Tracey KJ. Peptide regulatory factor cachetin/ TNF. *Lancet* (may) 1122-1125, 1989.
- 89.- Slack JMV. Peptide regulatory factor in embriogenic development. *Lancet* (june) 1312-1315, 1989.
- 90.- Czararecki CW. TGF- β modulate the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J Immunol* 140; 4217-4223, 1988.
- 91.- Kichrl JH. TGF- β is an important immunomodulatory protein from human B lymphocytes. *J Immunol* 137; 3855-3860, 1986.
- 92.- Kasid A. Effects of TGF- β on human LAK cell precursor. *J Immunol* 136; 690-698, 1988.

- 93.- Rook AH. Effects of TGF- β on the function of Nk cells. *J Immunol* 136; 3916-3920, 1986.
- 94.- Strayer DS. Inhibition of epidermal growth factor induced cellular proliferation. *Am J Pathol* 128; 203-209, 1987.
- 95.- Curie GA. Escape inmunitario tumoral. In: El cáncer y la respuesta inmune. El Manual Moderno México. 1985, cap. 6, pp 96-117.
- 96.- Ravikumar T, Steele MDG, Rodrick PM, Ross D, Wilson R, et al. Effects of tumor growth on interleukins and circulation immune complexes. *Cancer* 53; 1373-1378, 1984.
- 97.- Stam NJ, Kast WM, Vordouw AC, Pastoors LB, VanDer Hoeven FA, et al. Lack of correlation between level of MHC class I antigen and susceptibility to lysis of Small Cell Lung Carcinoma by Natural killer cells. *J Immunol* 142; 4113-4117, 1989.
- 98.- Fries RU, Golub SH. Characteristic and mechanism of IFN- γ induced protection of human tumor cells from lysis by LAK cells. *J Immunol* 140; 3686-3693, 1988.
- 99.- Nossal GJV. Immunologic tolerance; collaboration between antigen and lymphokines. *Science* 245; 147-153, 1989.
- 100.- North RJ. Suppressor cells; T cell and Macrophages In: Immunity to cancer. Academic Press U.S.A. 1986, sect. 3, pp. 239-252.
- 101.- Wassin YA. Suppressor cell-inducing factor: a new lymphokine secreted by a natural suppressor cell line with natural cytotoxic activity. *J Immunol* 141; 2529-2535, 1988.
- 102.- Chen FA. Cell surface glycoprotein associated with human Lung tumors, that is similar but distinct from the EGF receptor. *Cancer Res* 49; 3642-3649, 1989.
- 103.- Waldman TA. The structure, function and expression of IL-2 receptor on normal and malignant lymphocytes. *Science* 232; 727-732, 1986.
- 104.- Taylor DD, Levy EM. Shed membrane vesicles; a mechanism for tumor induced immunosuppression. In: Immunity to Cancer. Academic Press U.S.A. 1985, sect 3, pp. 369-374.
- 105.- Stell MC. Peptide regulatory factors and malignancy. *Lancet* (july); pp. 30-34, 1989.

- 106.- Asham LK. The immunogenicity of tumor cell. *Immunol Cell Biol* 65; 271-277, 1987.
- 107.- Panneerselvam M. A molecular mechanism of complement resistance of human melanoma cells. *J Immunol* 136; 2534-2535, 1986.
- 108.- Alexander MA. Defective antigen presentation by human melanoma cell lines cultures from advanced but not biologically early disease. *J Immunol.* 142: 4070-4078, 1989.
- 109.- Weiss L. Interaction of cancer cell with the microvasculatures during metastasis *FASEB J* 2; 12-21, 1988.
- 110.- Roth JA. Tumor induced immunosuppression. *Surgery Gynecology Obstetric* 156; 233-240, 1983.
- 111.- Dorf ME., Benacerraf B. Suppressor cells and immunoregulation *Am Rev Immunol* 2; 127-158, 1984.
- 112.- Gershon RK. T cell control of antibody production. *In: Contemporary topic in Immunobiology.* Plenum Press 1974, ch 1. pp 1-40.
- 113.- Kuchroo VK, Minami M, Diamon B, Dorf ME. Requiriments for suppressor cell activation. *J Immunol* 142; 2192-2199, 1989.
- 114.- Lachmann PJ. Immunological tolerance and unresponsiveness. *In: The Immune system.* Blackwell Scientific 1976, ch 10, pp 152-164.
- 115.- Bullock WW., Katz D.H. Induction of T lymphocyte response to a small weight antigen. *J Exp Med* 142; 275-287, 1975.
- 116.- Takemori T, Tada T. I: Properties of antigen specific suppressive T-cell function in the regulation of antibody response of mouse. *J Exp Med* 142: 1241-1253, 1975.
- 117.- Taniguchi M, Tada T, Hayakama K. II: -IDEM- *J Immunol* 116; 542-547, 1976.
- 118.- Taniguchi M., Tada T. III: -IDEM- *J Exp Med* 144; 20-31, 1976.
- 119.- Tada T, Taniguchi M. IV: -IDEM- *J Exp Med* 144; 713-726, 1976.
- 120.- Herzenberg LA, Okumura K, Cantor H, Sato VL, Shen FW, et al. T cell regulation of antibody response. *J Exp Med* 144; 331-344, 1976.
- 121.- Okamura KO, Tada T. Regulation of homocitotropic antibody formation in the rat. *J. Immunol* 112; 783-791, 1974.

- 122.- Man-Sun S., Dietz H. I; Antigen and receptor driven regulatory mechanism. J Exp Med 151; 1183-1193, 1980.
- 123.- Michael H, Dietz H, Man-Sun S. II: -IDEM- J Exp Med. 153; 450-463, 1981.
- 124.- Kontianinen S, Feldmann M. Suppressor cell induction in vitro J Exp Med 147; 111-122, 1978.
- 125.- Taniguchi M. Functional and molecular organization of antigen specific suppressor factor from hybridoma. Nature 238; 227-228. 1980.
- 126.- Germain R, Theze J, Kapp JA, Benacerraf B. Antigen-specific T cell mediated suppression. J Exp Med 147; 123-138, 1978.
- 127.- Zembala M. In vitro absorption and molecular weight of specific T cell suppressor factor. Nature 253; 72 - 74, 1975.
- 128.- Dutton WR, Swain SL. Regulation of the immune response: T- cell interaction. Crit Rev Immunol 3; 209-261, 1982.
- 129.- Morimoto C, Letvin K, Distao JA, Brown HM. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8' suppressor cells. Eur J Immunol 16; 198-204, 1986.
- 130.- Lieu FY. Suppressor cells for cell-mediated immunity to infections disease. Res Immunol 140; 328-333, 1989.
- 131.- Takeuchi T, Schlossman SF, Morimoto C. Development of an antigen-specific CD-8 suppressor effector clones in man. J Immunol 141; 3010-3015, 1988.
- 132.- Leclerc C. Suppressor T cells. An appraisal of their role by in vivo elimination. Res Immunol 140; 318-323, 1989.
- 133.- Bennaroch P., Bordenave G. T cell-induced chronic immunoglobulins allotopic suppression in mouse. Res Immunol 140; 307-313, 1989.
- 134.- Ishizaka K, Iwata M, Katamura K. Characteristics of carrier-specific regulatory T cells. Res Immunol 140; 299-301, 1989.
- 135.- Herzenberg LA. Murine suppressor T cells. Res Immunol 140; 337-338, 1989.
- 136.- Brostoff SW. Suppressor cells in rats than have recovered from autoimmune disease. Res Immunol 140; 334-337, 1989.
- 137.- Pitchard-Bricoe H, Loblay RH. Suppression in an adoptive hapten-carrier system. Res Immunol 140; 313-317, 1989.

- 138.- Flood PM. The role of suppressor cells in maintaining tolerance to self molecules.
J Mol Cell Immunol 2; 140-142, 1985.
- 139.- Zheng H, Boyer M, Fotedar A, Singh B, Green DR. An antigen-specific helper T cell Hybridoma produce an antigen-specific suppressor inducer molecule with identical antigen fine specificity. J Immunol 140; 1351-1358, 1988.
- 140.- Green DR, Zheng H. Antigen-specific regulatory T-cell factors and the T-cell receptor. Res Immunol 140; 294-297, 1989.
- 141.- Aune TM, Pogue SL. Generation and characterization of continuous lines of CD8 suppressor T lymphocyte.
J Immunol 143; 3731-3739, 1989.
- 142.- Takashi M, Satomi S. Contra IL-2 a suppressor lymphokine that inhibits IL-2 activity. J Immunol 136; 3298-3303, 1986.
- 143.- Granstein RD, Staszewski R, Knisely TL, Zeira E, Nazareno R, et al. Aqueous humor contains TGF- β and a small inhibitor of Thymocyte proliferation. J Immunol 144; 3021-3027, 1990.
- 144.- Hertel-Wulff B, Strober. Immunosuppressive lymphokine derived from natural suppressor cells.
J Immunol 140; 2633-2638, 1988.
- 145.- Fairchild RL, Kubo RI, Morehead JW. Soluble factors in tolerance and contact sensitivity to 2,4-DNFB in mice.
J Immunol 141; 3342-3348, 1988.
- 146.- Kitamura K, Nakauchi H, Koyasu S, Yahara I, Okumura K, et al. Characterization of an antigen-specific suppressive factor derived from a cloned suppressor effector T cell line.
J Immunol 133; 1371-1378, 1984.
- 147.- Webb DR, Semenuk G, Krupen K, Gendrisak GM, Bellone CJ. Purification and analysis of an antigen-specific suppressor factor from a T cell Hybridoma specific for PTA-hapten.
J Immunol 142; 224-229, 1989.
- 148.- Chan MM, Tada N, Kimura S, Hoffmann MK, Miller RA, et al. Characterization of T Lymphocyte subsets with monoclonal antibodies.
J Immunol 130; 2075-2078, 1983.
- 149.- Tada T, Asano Y. Present understanding of suppressor T cell.
Res Immunol 140; 291-294, 1989.
- 150.- Herbert AG, Watson JD. T cell ontogeny. The role of a stimulator-suppressor cell. Immunol Today 7; 72-76, 1986.

- 151.- Batchelor JR. More speculations on specific suppression. Immunol Today 10; 326-327, 1989.
- 152.- Triebel F, Hercer T. Subpopulations of human peripheral T lymphocyte. Immunol Today. 10; 186-188, 1989.
- 153.- Batchelor JR, Lambardi G, Lechler R. Speculations on the specificity of suppression. Immunol Today 10; 37-40, 1989.
- 154.- Kölsch E. T suppressor lymphocyte and aspects of immunological tolerance. Res Immunol. 140; 286-290, 1989.
- 155.- Krzych U, Nanda N. Specificity and interactions of CD-8 T suppressor cells. Res Immunol. 140; 291-294, 1989.
- 156.- Moorhead JW. Soluble factors in tolerance and control sensitivity to DNFB in mice II. Genetic requirements for suppression by soluble suppressor factor. J Immunol 119; 1173-1181, 1977.
- 157.- Moorhead JW, -IDEM- V. Genetic requirements for stimulating suppressor factor production in vitro. J Immunol 29: 1883, 1982.
- 158.- Fairchild RW. -IDEM- VI.- Cellular and lymphokines requirements for stimulating suppressor factor production in vitro. J Immunol 137; 2125-2130, 1986.
- 159.- Fairchild RL. -IDEM- VII.- Characterization of monoclonal efferenting acting suppressor factor with specificity for DNP/H2K. Cell Immunol 105; 147-154, 1987.
- 160.- Koide J, Engleman EG. Differences in surface phenotype and mechanism of action between alloantigen-specific CD-8 cytotoxic and suppressor T cell clone. J Immunol 144: 32-40, 1990.
- 161.- Hansel TT. Leucocyte Typing OK, CD? Lancet (december) 1382-1383, 1987.
- 162.- Rich RR. Human T-T interactions. In: Immunity to cancer. Academic Press U.S.A. 1985, sect 3 267-280.
- 163.- Nepom GT, Hellstrom I, Hellstrom KE. Suppressor mechanisms in tumor immunity. Experientia 39; 235-242, 1983.
- 164.- Von Roena J, Harris JE, Brawn DP. Suppressor cell function in solid tumor cancer patients. J Clin Oncol 5; 150-159, 1987.

- 165.- Jerrells JR, Dean JH, Richardson GL, McCoy JL, Herberman RB, Role of suppressor cells in depression of in vitro Lymphoproliferative response of lung cancer and breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 61; 1001-1009, 1978.
- 166.- Schatten S, Drebin JA, Perry LL, Chung W, Greene MI. Regulation of the immune response to tumor antigens. *J. Immunol* 133; 1064-1069, 1984.
- 167.- Ebihara T, Koyama S, Fukao K, Osuga T. Lymphokine-activated suppressor cell (LAS) in patients with gastric carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 28; 218-214, 1989.
- 168.- García M.J. Actividad supresora inducida por Con-A en linfocitos periféricos de pacientes con tumores sólidos. *Acta Physiol Latin.* 33; 15-20, 1983.
- 169.- Metzger Z, Hotted JJ. Macrophage-mediated suppression. *J Immunol* 124: 983-988, 1980.
- 170.- Liu MC, Proud D, Schleimer RP. Human lung macrophages enhance and inhibits lymphocyte proliferation. *J Immunol* 132; 2895-2903, 1985.
- 171.- Stensen WF, Parker CW. Prostaglandins, macrophages and immunity. *J Immunol* 125; 1-6, 1980.
- 172.- Ninemmann JL. Prostaglandins and immunity. *Immunol Today* 5: 170-178, 1984.
- 173.- Malkousky M, Sondel PM, Strober W. The interleukins in acquired disease. *Clin Exp Immunol* 74; 151-161, 1988.
- 174.- Usui M, Aoki I. A role for macrophage in suppressor cell induction. *J Immunol* 132; 1728-1733, 1984.
- 175.- Baskies AM, Chretien BP, Weiss JF, Makuch RW, Beveridge RA, et al. Serum glycoproteins in cancer patients. *Cancer* 45; 3050-3060, 1980.
- 176.- Ross EJ. Síndromes extrapulmonares relacionados con el cáncer pulmonar In: Tratado de Neumología. Ed. Mc-Grawhill. México. 1983, cap. 128, pp. 1332-1344.
- 177.- Ebert EC, Robert AI, O'Connell SM. Characterization of an immunosuppressive factor from colon cancer. *J. Immunol* 138; 2161-2168, 1987.
- 178.- Kanayama H, Hamazoe R, Osaki Y, Shimizu N, Maeta M, et al. Immunosuppressive factor from the spleen in gastric cancer patients. *Cancer* 56; 1963-1966, 1986.

- 179.- Werkmeister J, Zbroja R, McCarthy W, Hersey P. Detection of an inhibitor of cell division in cultures of tumor cells with immunosuppressive activity in vitro. Clin Exp Immunol 40; 168-177, 1980.
- 180.- Hersey P, Brindon C, Czernieck M. Inhibition of interleukin 2 production by factor released from tumor cells. J Immunol 131: 2837-2842, 1983.
- 181.- Bugis SP, Lotzova E, Savage HE, Hester JP, Racz T, et al. Inhibition of lymphokine-activated killer cell generation by blocking factors in sera of patients with head and neck cancer. Cancer Immunol Immunother 31; 176-181, 1990.
- 182.- Nelson M, Nelson D. Inhibition of interleukin 2 production by tumor cell products and CKS-17 a synthetic retroviral envelope peptide. Cancer Immunol Immunother 30; 331-341, 1990.
- 183.- Bashford J, Gough R. Depression of high affinity rosette formation in dysplasia in carcinoma in situ of the uterine cervix, mediated by serum factors. Cancer Res 43; 3953-3963, 1983.
- 184.- Sinclair T, Ezdinli EZ, Boonlayangoor P, Wasser LP, Han T, Rosette and blastogenesis inhibition by plasma from Hodgkin's disease and other malignancies. Cancer 51; 238-244, 1983.
- 185.- Chou-chik T, Rodrigues D, Ting RC, Wivel N, Collins M. Suppression of T cell-mediated immunity by tumor cells. Int. J Cancer 24; 644-655, 1979.
- 186.- Tsuchiya Y, Igarashi M, Suzuki R, Kumagai K. Production of CSF by tumor cells and the factor-mediated induction of suppressor cells. J Immunol 141: 699-708, 1988.
- 187.- Inove I, Carolyn L, Nelson & Nelson. Lymphokine-like products of cultured tumor cell. Immunology 48; 713-738, 1983.
- 188.- Nelson & Nelson, Kuchroo K. Depression of cell mediated immunity by tumor cell products. Cancer Immunol Immunother 24; 231-236, 1987.
- 189.- Strayer DS, Dombrowski T. Immunosuppression during viral oncogenesis. J. Immunol 141; 347-351, 1988.
- 190.- Cornelius JG, Normann SJ. Isolation of low molecular weight inhibitor of lymphocyte proliferation from tumor ascitis. J Immunol 141; 2173-2180, 1986.
- 191.- Friedmann H, Specter S. Tumor associated immunosuppressive factors. Ann N.Y. Acad Sci 417-429, 1976.
- 192.- Roth JA, Grimm EA, Grupta RJ, Ames RJ. Immunoregulatory factors derived from human tumors. J Immunol 128; 1955-1982, 1982.

- 193.- Manke HG, Aulembacher R, Ruster S. Inhibition of antibody synthesis and expression of T cell membrane markers in SCLC. Anticancer Res 6: 869-873, 1986.
- 194.- Benson MD, Eyausu S, Naomi S. Serum Amyloid A in carcinoma of the lung. Cancer 57: 1793-1787, 1986.
- 195.- Minna JD, Pass H, Gltstein E. Cancer of the lung
In: Cancer principles practice of Oncology. Lippincott 1989, ch.22, pp 591-687.
- 196.- Fergusson RT. Studing lung cancer in the laboratory
Thorax 42: 753-925, 1987.
- 197.- Roberts AB. Growth factors related to transformation.
In: Cancer principles and practice of Oncology. Lippincott 1989, ch. 5, pp 67-80.
- 198.- Macaulay VM, Everard MJ, Teale DJ, Trott PA, Judson VW, et al. Autocrine function for IFG-1 in Human SCLC cell lines and fresh tumor cells. Cancer Res 50; 2511-2517, 1990.
- 199.- Shigematsu K, Kataoka Y, Kamio T, Kurihara M, Niwa M, et al. Partial characterization of IFG-1 in primary human lung cancers using immunohistochemical and receptor autoradiographic techniques. Cancer Res 50; 2481-2484, 1990.
- 200.- Tsunawaki S, Sporn M, Nathan C. Comparison of TGF- β and macrophage deactivating polypeptide from tumor cells. J Immunol 142; 3462-3468, 1989.
- 201.- Akhurst RJ, Lehnert S.A. The role of TGF- β in mouse development and carcinogenesis. Biochemical society trans. 17; 595, 1989.
- 202.- McDonnells S, Doley M, Clynes M. Growth factor produced by human carcinoma cells in culture. Biochemical society trans. 17; 594-595, 1989.
- 203.- Saucedo L.E. TESIS Análisis funcional y fenotípico de los linfocitos que infiltran los tumores sólidos. 1989. Fac. de química. UNAM.
- 204.- Stevenson RE. Catalogue of cell lines and hybridomas American Type Culture Collection 6th Edition. Raklaw-Maryland 1988.
- 205.- Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest (suplement) 21; 77-39, 1968.
- 206.- Steele RE. Porous--bottom dishes for cultures of polarized cells. Am J Physiol 251: 136-139., 1986.
- 207.- Feldmann M, Basten A. Cell interaction in the immune response in vitro. III.- Specific collaboration across a cell impermeable membrane. J Exp Med 136; 49-60, 1972.

- 208.- Yamaki T, Uede T, Shijubo N, Kikuchi K. Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors. *J Immunol* 140; 4388-4396, 1988.
- 209.- Miescher S, Whiteside TL., Cerrel S. Functional properties of tumor infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumor. Effects of tumor cells and their supernatants on proliferative response of lymphocytes. *J. Immunol* 136; 1899-1907, 1986.
- 210.- Ioachim HL, Dorsett BH, Paluch E. The immune response at the tumor site in lung carcinoma. *Cancer* 38; 2296-2309, 1976.