

**UNIVERSIDAD CENTRAL (MADRID)
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

Cooperación al estudio de la dacriocistitis

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jesús Rodríguez García

Madrid, 2015



5306072997

KOD
C00

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGICAS

COOPERACION ENTRE CELULAS T, B Y MACROFAGOS EN LA RESPUESTA
IN VITRO A ANTIGENOS TIMO DEPENDIENTES. SUSTITUCION DE LAS
CELULAS T POR LECTINAS Y TRF. ESTUDIO DE SU ESPECIFICIDAD.

M E M O R I A

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

PRESENTA

R O S A R O D R I G U E Z B E R N A B E



Febrero, 1979.

R. 23.197

El presente trabajo ha sido realizado en el Servicio de Inmunología de la Clínica Puerta de Hierro (Universidad Autónoma de Madrid) bajo la dirección del Dr. Fernando Díaz-Espada Lorenzo y en colaboración con el Dr. Carlos Martínez-Alonso, a quienes va dedicado mi agradecimiento.

Quiero agradecer especialmente a Antonio Coutinho y a Eva-Lotta Larsson no solo las ideas, discusiones y experimentos que aportaron a este trabajo sino su amistad incondicional.

A Carlos, en recuerdo de aquel tiempo
en que la Inmunología comenzó a signi-
ficar para nosotros algo más que una
ciencia experimental.

INDICE

OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO	viii
I. INTRODUCCION	
I.1. ORGANIZACION GENERAL DEL SISTEMA INMUNE	1
I.2. LINFOCITOS B	4
I.2.1. Estructura de las inmunoglobulinas.....	4
I.2.2. Receptores específicos de los linfocitos B.....	8
I.2.3. Receptores mitogénicos de las células B.....	10
I.2.4. Activación de las células B.....	12
I.2.5. Heterogeneidad de los linfocitos B.....	16
I.3. SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	19
I.4. LINFOCITOS T	22
I.4.1. Heterogeneidad de los linfocitos T	22
I.4.1.1. Marcadores sobre la superficie celular...	22
I.4.1.2. Subpoblaciones de células T.....	24
I.4.2. Receptores de células T	28
I.4.2.1. Receptores con determinantes comunes a las inmunoglobulinas	28
I.4.2.2. Evidencias a favor de la no existencia de inmunoglobulinas como receptores de las células T	28
I.4.2.3. Las células T y B presentan la misma es- pecificidad idiotípica	30
I.4.3. Activación de las células T	33
I.4.3.1. Respuesta a mitógenos	34

I.4.3.2. Estimulación alogénica	33
I.5. INTERACCIONES CELULARES EN LA RESPUESTA INMUNE	37
I.5.1. Colaboración entre células T y B	37
I.5.2. Factores solubles que reemplazan a las células T en la colaboración T-B	40
I.5.3. Colaboración entre linfocitos T y macrófagos	42
I.6. REGULACION DEL SISTEMA INMUNE	44
I.6.1. Interacciones idiotipo-anti-idiotipo	44
I.6.2. Restricción H-2	49
I.6.3. Genes Ir	53
II. MATERIAL Y METODOS	
II.1. MATERIAL PARA CULTIVO CELULAR.....	57
II.2. REACTIVOS	57
II.3. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	58
II.4. ANIMALES	59
II.5. ANTIGENOS	59
II.6. PREPARACION DE ANTISUEROS	60
II.6.1. In vivo	60
II.6.2. In vitro	60
II.7. PREPARACION DE COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO	60
II.8. DETERMINACION DE PROPIEDADES QUIMICAS DE FACTORES SO- LUBLES	61
II.8.1. Cromatografía de afinidad	61
II.8.2. Filtración en gel	61
II.8.3. Electroenfoque	62

II.9.	PREPARACION DE LINFOCITOS	63
II.10.	SEPARACION DE DISTINTAS POBLACIONES CELULARES	63
II.10.1.	Linfocitos B	63
II.10.2.	Linfocitos T	64
II.10.3.	Macrófagos	64
II.11.	SEPARACION DE BLASTOS Y PEQUEÑOS LINFOCITOS	65
II.11.1.	Gradientes de albúmina	66
II.11.2.	Gradientes de Percoll	66
II.12.	CANULACION DEL CONDUCTO TORACICO	67
II.13.	SELECCION NEGATIVA DE CELULAS T	68
II.14.	OBTENCION DE CELULAS T ESPECIFICAS PARA EL ANTIGENO IN VIVO	68
II.15.	OBTENCION DE FACTORES SOLUBLES IN VITRO	69
II.16.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AUXILIAR DE SOBRENADAN- TES OBTENIDOS IN VITRO	69
II.17.	DETERMINACION DEL NUMERO DE AFC	70
II.17.1.	AFC específicas anti-antígeno	71
II.17.2.	Determinación del número total de AFC	72
II.18.	ABSORCION DE FACTORES SOLUBLES INDUCIDOS POR ConA ...	73
II.18.1.	Absorción sobre el antígeno	73
II.18.2.	Absorción sobre complejos antígeno-anticuerpo .	73
II.18.3.	Absorción sobre distintos tipos de células	74
II.19.	INHIBICION DE LA SINTESIS DE DNA	74
II.20.	INHIBICION DE LA ACTIVIDAD AUXILIAR DEPENDIENTE DE WGA	74

II.21. PRODUCCION DE SOBRENADANTES DE WGA A PARTIR DE LI- NEAS DE MACROFAGOS CULTIVADAS IN VITRO	75
II.22. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO CELULAR DE CELULAS T IN VI- TRO	75
II.23. ACTIVACION DE CELULAS T POR FACTORES INDUCIDOS POR ConA	76
II.24. ESTIMULACION POR LPS	77
II.25. CALCULO DE FRECUENCIA DE PRECURSORES	78
III. RESULTADOS	
III.1. CARACTERIZACION DEL SISTEMA EXPERIMENTAL	79
III.2. PRODUCCION IN VITRO DE TRF EN CULTIVOS ESTIMULADOS POR ConA	81
III.2.1. Cinética	81
III.2.2. Estudio de la influencia de distintas concen- traciones de FCS	82
III.2.3. Influencia del tratamiento previo con mitomi- cina C en la producción de TRF	84
III.3. CELULA RESPONSABLE DE LA PRODUCCION DE TRF	88
III.3.1. Producción de TRFs en ausencia de células T ..	88
III.3.2. Producción de los TRFs en ausencia de macró- fagos	90
III.3.3. Producción de los TRFs en ausencia de células B	90
III.3.4. Requerimiento de célula accesorias en la pro- ducción de ConA-TRFs	93

III.3.5. Producción de ConA-TRF por distintas poblaciones celulares separadas en gradiente de albúmina	97
III.3.6. Producción de TRF por distintas poblaciones celulares separadas mediante gradientes de Percoll	100
III.4. ACTIVIDAD POLICLONAL DE LOS ConA-TRFs	101
III.4.1. Selección positiva de células T específicas para el antígeno	103
III.4.2. Selección negativa de células T específicas para el antígeno	105
III.5. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ConA-TRFs.....	108
III.6. LA AUSENCIA DE ACTIVIDAD AUXILIAR DE LOS ConA-TRFs ABSORBIDOS EN COMPLEJOS NO ES DEBIDA A LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS LIBRES	111
III.7. EL RECEPTOR PARA LOS ConA-TRFs ESTA EN LOS LINFOCITOS B	117
III.8. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION DE TRFs EN LA FRACCION DE ACTIVIDAD AUXILIAR QUE SE ABSORBE EN COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO	119
III.9. EVALUACION DEL NUMERO DE CELULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS NATURALES	123
III.9.1. Cálculo de la frecuencia de precursores específicos	125
III.10. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ACTIVIDADES TRF Y TGR DE FACTORES INDUCIDOS POR ConA	129

III.10.1. Absorción de los sobrenadantes de ConA sobre timocitos	135
III.10.2. Absorción de los sobrenadantes de ConA sobre células de bazo	136
III.10.3. Absorción de los sobrenadantes de ConA sobre blastos T	136
III.10.4. Absorción de los sobrenadantes de ConA sobre blastos B	138
III.10.5. Propiedades fisicoquímicas de los factores TRF y TGF	141
III.10.5.1. Determinación del pI por electroenfoque	141
III.10.5.2. Cromatografía de afinidad en columnas de ConA-Sepharosa	144
III.10.5.3. Determinación de pesos moleculares ...	144
III.11. ACTIVIDAD AUXILIAR INDUCIDA POR WGA	147
III.11.1. Actividad policlonal de los sobrenadantes inducidos por WGA	149
III.11.2. Actividad auxiliar de WGA en la respuesta de células de ratones atímicos a antígenos TD	152
III.11.3. Inhibición de la actividad auxiliar de WGA por N-acetil-glucosamina (NAGA).....	154
III.11.4. Influencia de NAGA en la actividad auxiliar de los ConA-TRFs	156

III.11.5. Requerimiento de macrófagos en la actividad auxiliar del WGA	158
III.11.6. Caracterización de la actividad auxiliar de los sobrenadantes inducidos por WGA	161
III.11.6.1. Inhibición por NAGA	162
III.11.6.2. Cinética de inducción de la actividad auxiliar	162
III.11.6.3. Activación de las células B por sobrenadantes de líneas de macrófagos estimulados por WGA	164
IV. DISCUSION	166
V. CONCLUSIONES	183
VI. BIBLIOGRAFIA	186

OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

Los linfocitos T pueden activarse in vitro, induciéndose la liberación de factores solubles capaces de llevar a cabo actividades biológicas muy diversas. Parte, al menos, de estos factores están relacionados con el receptor específico de los linfocitos T, receptor cuya presencia en la membrana celular ha sido postulada en numerosos sistemas, pero cuya realidad física es difícil de demostrar.

Entre las actividades mediadas por los factores solubles de las células T, se encuentra la de reemplazar a las células T (actividad TRF) en la cooperación con los linfocitos B en la respuesta de éstos a antígenos timo-dependientes. En el presente trabajo hemos estudiado la activación in vitro de células B en presencia de antígeno y factores solubles de células T inducidos por estimulación con la lectina Concanavalina A (ConA-TRF). Asimismo, se estudió la capacidad de ciertas lectinas (WGA) de reemplazar la actividad auxiliar de las células T en la activación específica de los linfocitos B. También se estudiaron algunas propiedades físico-químicas de los TRF_S, comparándose con las de otro factor producido por las células T en idénticas condiciones y que es capaz de mediar otra actividad biológica distinta (inducción del crecimiento de blastos T, actividad TGF).

Nuestro interés principal se ha dirigido a determinar

la especificidad de los TRF_s por distintos antígenos timo-dependientes, discutiéndose su relación con el receptor específico de las células T y su importancia en el reconocimiento de las estructuras idiotípicas de los linfocitos B, así como otros tipos de interacciones celulares que conducen a la activación de células B por antígenos timo-dependientes.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

SI: Sistema Inmune.

MHC: Sistema Principal de Histocompatibilidad.

Ig: Inmunoglobulina.

Cadena H: Cadena pesada de la molécula de Ig.

Cadena L: Cadena ligera de la molécula de Ig.

IgG₁: Inmunoglobulina G₁.

IgG_{2a}: Inmunoglobulina G_{2a}.

IgG_{2b}: Inmunoglobulina G_{2b}.

IgG₃: Inmunoglobulina G₃.

IgM: Inmunoglobulina M.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgD: Inmunoglobulina D.

γ_1 : Cadena pesada de la IgG₁.

γ_{2a} : Cadena pesada de la IgG_{2a}.

γ_{2b} : Cadena pesada de la IgG_{2b}.

γ_3 : Cadena pesada de la IgG₃.

μ : Cadena pesada de la IgM.

α : Cadena pesada de la IgA.

ξ : Cadena pesada de la IgD.

κ : Cadena ligera Kappa.

λ : Cadena ligera Lambda.

V_H: Dominios variables de la cadena pesada.

V_L: Dominios variables de la cadena ligera.

CH: Dominios constantes de las cadenas pesadas.

CL: Dominios constantes de las cadenas ligeras.

TH: Células T auxiliares.

TC: Celulas T citotóxicas.

TS: Celulas T supresoras.

MLC: Cultivo mixto de linfocitos.

AFC: Célula formadora de anticuerpos.

PFC: Célula formadora de placas hemolíticas.

TDL: Linfocitos del conducto torácico linfático.

PBA: Activador policlonal de células B.

TRF: Factor que reemplaza a las células T.

TGF: Factor que induce el crecimiento de blastos T.

LPS: Lipopolisacárido de E.coli.

LP: Lipoproteína de E.coli.

Dx: Dextrano

POL: Proteína polimérica flajelar de Salmonella.

PVP: Polivinilpirrolidona.

PPD: Extracto purificado de Micobacterium tuberculosis.

Poli (I,C): Polinucleótido de inosina y citosina.

(T,G)-A-L: Polímero sintético de tirosina, glutámico, alanina y
lisina.

(Phe,G)-A-L: Polímero sintético de fenilalanina, glutámico,
alanina y lisina.

(T,G)-Pro-L: Polímero sintético de tirosina, glutámico, prolina
y lisina.

PHA: fitohemaglutinina de Phaseolus vulgaris.
ConA: Concanavalina A de Canavalia ensiformis.
WGA: Aglutinina de germen de trigo.
SBA: Aglutinona de semilla de soja.
LA: Leucoaglutinina.
TD: Timo dependiente.
TI: Timo independiente.
SRBC: Hematíes de carnaro.
HRBC: Hematíes de caballo.
TNP: Derivado 2,4,6-trinitrofenil.
NIP: Derivado 3,nitro,5,iodo-fenil-acetil.
BSS: Solución salina balanceada.
FCS: Suero bovino fetal.
PLL: Poli-L-Lisina.

I. INTRODUCCION

I.1. ORGANIZACION GENERAL DEL SISTEMA INMUNE.

Los animales superiores poseen un sistema de reconocimiento específico que permite la neutralización y eliminación de sustancias (antígenos) potencialmente nocivas. Para este fin, se ha desarrollado durante la evolución de dichos organismos un sistema completo de células (linfocitos y células accesorias) y moléculas (anticuerpos especializados, capaces de reconocer estructuras químicas (determinantes antigénicos o epítopes) presentes en la molécula de antígeno. El Sistema Inmune (SI) puede reconocer tanto antígenos libres como antígenos presentes en estructuras celulares.

En el hombre el Sistema Inmune está formado por aproximadamente 2×10^{12} linfocitos. Este número es proporcionalmente menor en animales más pequeños (alrededor de 10^9 linfocitos en el ratón y de 10^6 en el renacuajo). De esta forma, el número de células específicas del SI es equivalente al del hígado o el cerebro. Los linfocitos, sin embargo, se encuentran presentes en todos los órganos (excepto el cerebro), tejidos y fluidos intersticiales, con especial preferencia en los órganos linfoides (médula osea, timo, bazo, ganglios lin-

fáticos, apéndice, etc.). Además, las células linfoides recirculan continuamente a través del sistema sanguíneo y linfático (1). Los linfocitos tienen una vida media limitada, existiendo un continuo reemplazamiento a partir de células precursoras. Este reemplazamiento da cuenta en el hombre de la aparición de aproximadamente 10^6 nuevos linfocitos por segundo.

Existen dos tipos principales de linfocitos (T y B), distinguibles tanto por la presencia de distintos marcadores de membrana, como por sus diferentes vías de maduración ontogénica y distintas funciones efectoras.

Ambos tipos de linfocitos se originan a partir de células pluripotenciales del saco vitelino o del hígado fetal en el embrión o de la médula osea en el adulto. La generación de diversidad (en cuanto a las especificidades antigénicas distintas que los linfocitos pueden reconocer) así como la maduración a linfocitos inmunocompetentes ocurre en los órganos linfoides primarios, timo para los linfocitos T y la bolsa de Fabricio en aves o su equivalente en mamíferos para las células B. Estas células que ya han adquirido la capacidad de reconocimiento antigénico, abandonan los órganos linfoides primarios y recirculan entre los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos, apéndice, placas de Peyer, amígdalas, tejido difuso subepitelial del tubo diges-

tivo, etc.) a través de la sangre y de las vías linfáticas. Los linfocitos T y B ocupan distintas áreas especializadas dentro de la arquitectura de los órganos linfoides secundarios (2-5).

El papel de los órganos linfoides secundarios durante la estimulación antigénica, se ha puesto de manifiesto estudiando linfocitos obtenidos por canulación del conducto linfático torácico (TDL). De esta manera, se ha podido demostrar que en los órganos linfoides secundarios tiene lugar el reconocimiento del antígeno por los linfocitos y la subsiguiente formación de centros germinales. Sin embargo, tanto la recirculación como la localización tisular de los linfocitos depende de las diferentes etapas de su activación. Así, por ejemplo, en el ratón, un 85-90% de los linfocitos recirculantes son linfocitos T, siendo además la capacidad para recircular de los linfocitos vírgenes (no activados por el antígeno) menor que la de linfocitos estimulados.

Mientras que los linfocitos T controlan la respuesta inmune de tipo celular (rechazo alogénico, reacciones de injerto-contra-huésped, hipersensibilidad de tipo retardado, activación del sistema reticuloendotelial en la eliminación de ciertos agentes patógenos, destrucción de células infectadas con determinadas virus) y colaboran con los linfocitos B en la respuesta inmune a determinados antígenos llamados

timo-dependientes (TD), las células B son las responsables de la respuesta inmune de tipo humoral (secreción de anticuerpos específicos). Algunos antígenos, llamados timo-independientes (TI) son capaces de activar a las células B en ausencia de células T.

I.2. LINFOCITOS B

I.2.1. Estructura de las inmunoglobulinas.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (IgS) pertenecen a un grupo de glicoproteínas estructuralmente relacionadas y responsables de la inmunidad humoral. Los anticuerpos son secretados por los linfocitos B como resultado de su activación por un antígeno, siendo capaces de unirse específicamente a éste (6).

La estructura básica de las IgS está formada por un dímero compuesto de dos subunidades idénticas que a su vez comprenden dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por interacciones covalentes y no covalentes. Una de dichas cadenas contiene alrededor de 450 aa y se denomina cadena pesada (H); la otra es de menor peso molecular (220 aa) y se denomina cadena ligera (L). La estructura dimérica se mantiene por uniones covalentes y no covalentes entre las cadenas H de los monómeros.

Existen dos tipos (isotipos) de cadenas ligeras, denominadas κ y λ distinguibles por su estructura primaria. Igualmente existen siete isotipos distintos para la cadena pesada que en los múridos se denominan $\gamma_1, \gamma_{2a}, \gamma_{2b}, \gamma_3, \mu, \alpha, \delta$. Cada isotipo de cadenas pesadas se asocia con un tipo de cadena ligera κ o λ , formándose la molécula completa de Ig (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgA e IgD) (7,8).

La estructura primaria de las cadenas polipeptídicas puede dividirse en dos regiones. La región formada por los 110 aa próximos al extremo N-terminal de la molécula presenta una gran variabilidad de secuencia y se denomina región variable (V) (9). Existen tres grupos de regiones variables, uno correspondiente al isotipo κ (V_κ), otro al λ (V_λ) y un tercero común a todos los isotipos de cadenas pesadas (V_H). El resto de la molécula correspondiente al extremo C-terminal se denomina región constante (C), existiendo un tipo de secuencia básico para cada isotipo. Las pequeñas variaciones encontradas en la región C de cada isotipo constituyen variaciones heredables denominadas alotipos (10).

La especificidad antigénica de las IgS reside en su región variable siendo la diferente secuencia de aa de esta región la base de dicha especificidad. De esta forma, cada secuencia de aa originan un sitio de unión distinto (parátipe), capaz de interaccionar con un determinante antigénico

(epítope) concreto (11). El sitio de unión del antígeno, está formado por aa de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada.

Las moléculas de IgS de una especie tienen propiedades antigénicas para otra especie. Los determinantes antigénicos de las IgS pueden residir en la región C de la molécula (determinantes isotípicos o alotípicos) o en su región variable (determinantes idiotípicos) (12). El determinante idiotípico de una Ig está estrechamente relacionado con su centro de unión; sin embargo, en algunos casos se ha demostrado que la relación idiotipo-especificidad antigénica no es unívoca (13,14). Así, pues, los idiotipos confieren individualidad a las IgS, por lo que permite que éstas puedan ser reconocidas por otro animal singénico con el donante del idiotipo (15).

Los idiotipos normalmente se detectan por reacciones serológicas con anticuerpos anti-idiotipo, aunque en algunos casos ha sido posible correlacionar la identificación serológica con la secuencia primaria de la región variable (16,17).

En los múridos, los genes que codifican las cadenas ligeras κ , cadenas ligeras λ y las cadenas pesadas de las moléculas de IgS, están situadas en cromosomas diferentes (18). Las cadenas pesadas están codificadas en el cromosoma 12 ,

CIENCIAS BIOLÓGICAS

mientras las κ lo están en el 6, siendo aun desconocido el grupo de ligamiento que codifica la cadena ligera .

Los genes que codifican las regiones V y C de cada grupo de ligamiento se encuentran separados en el genoma, existiendo un mecanismo de unión pretranscripcional que origina un cistrón funcional V-C que se traducirá en una cadena de Ig completa (19).

Mientras el número de genes que codifican las regiones constantes es relativamente pequeño (uno por cada isotipo) , los genes que codifican las regiones variables son más abundantes, si bien su número aproximado es objeto de discusión (20). Existen dos corrientes de pensamiento que representan interpretaciones antagónicas del origen de la diversidad del SI. La teoría de la línea germinal propone que en el genoma de un individuo existe un gran número de genes ($V_L + V_H$) capaces de codificar anticuerpos específicos para todos los antígenos. Por el contrario, la teoría de la mutación somática defiende la existencia de un número pequeño de genes V en la línea germinal de cada individuo admitiendo un mecanismo de diversificación ontogénica del SI basado en procesos de mutación que daría cuenta de la diversidad funcional del SI (21, 22).

I.2.2. Receptores específicos de los linfocitos B.

El antígeno induce la activación de los linfocitos B específicos produciéndose su proliferación y diferenciación a células plasmáticas secretoras de IgS. El linfocito B re conoce los determinantes antigénicos mediante Ig de membrana que funcionan como receptores específicos (23).

Los receptores específicos se distribuyen clonalmente en la población de linfocitos B, de manera que cada linfocito expresa en su membrana receptores (IgS) de una determinada especificidad. De acuerdo con la teoría de la Selección Clonal descrita por Burnet (24), el antígeno selecciona el clon de linfocitos específicos que es capaz de interaccionar con él. La proliferación y diferenciación del linfocito seleccionado no afecta la especificidad de las IgS (región V) que produce, asegurándose así, la identidad de los anticuerpos secretados por la célula plasmática y el receptor Ig del linfocito inicial (25).

Así, pues, el SI en un momento determinado está constituido por un cierto número de clones de linfocitos, cada uno de los cuales se caracteriza por la molécula de Ig que sintetiza, residiendo la diversidad del SI en el número de clones diferentes y en el número de moléculas de anticuerpo diferentes presentes en el sistema.

Sin embargo, el proceso de síntesis y secreción de inmunoglobulinas no siempre es consecuencia de la entrada en el organismo de antígenos exteriores. Aproximadamente, el 1% de todas las células B se diferencia en ausencia de antígeno a células plasmáticas, con la consiguiente producción y secreción de inmunoglobulinas. La presencia de estos linfocitos que espontáneamente secretan anticuerpos "naturales" ha sido estudiada tanto en el hombre como en el ratón (26,27). En este sentido, todavía resulta incierto si esta producción de anticuerpos naturales es consecuencia de la estimulación de los linfocitos B por algún agente interno o si las células B que secretan anticuerpos de determinadas especificidades están sometidas a algún proceso de selección.

Mediante antisueros específicos, se ha podido identificar la presencia de distintas clases de IgS tanto en el citoplasma como en la superficie celular. De esta manera, se ha detectado la presencia de moléculas de IgM, IgM e IgD, IgD e IgG e IgG sola en la superficie celular, donde actúan como receptores específicos. Se ha observado asimismo, que los linfocitos B activados por el antígeno son capaces de producir durante su diferenciación IgS con isotipos diferentes al inicial, pero manteniendo la misma especificidad (idiotipo)(28).

Tanto la aparición posterior de la IgD en la ontogenia

respecto a la IgM así como la presencia de ambas IgS en la superficie de la misma célula, ha sido interpretado por algunos autores en el sentido de que la interacción del antígeno con el receptor IgM induciría una señal de parálisis celular en tanto que la interacción con el receptor IgD daría lugar a proliferación y diferenciación. La tolerancia durante la vida fetal frente a los autoantígenos estaría así relacionada con los diferentes tipos de señal liberados por los receptores específicos de la superficie de las células B (29,30).

I.2.3. Receptores mitogénicos de las células B.

La activación de las células B inducida por el antígeno, puede reproducirse experimentalmente por la acción de determinadas sustancias capaces de inducir en las células B proliferación y diferenciación a células efectoras productoras de anticuerpos (31).

La naturaleza y origen de estas sustancias es muy diversa, incluyéndose en el grupo tanto sustancias de origen bacteriano (LPS, LP, Dx, polisacáridos-C, POL) como compuestos sintéticos (PVP, Ficoll).

Estas sustancias reciben el nombre de activadores policlinales de células B (PBA) porque estimulan a las células B independientemente de la especificidad de sus receptores específicos. Sin embargo, puede afirmarse que el grupo es he

terogeneo tanto en cuanto a requerimientos de activación como al grado de activación policlonal alcanzado.

El receptor mitogénico más conocido es el del LPS (32, 33), que ha sido estudiado utilizando antisueros específicos, obtenidos en una cepa de ratones (C3H/Hej) que carece de dicho receptor. Se ha encontrado en un tercio de los linfocitos B de ratón y por estudios genéticos se ha demostrado que el gen responsable de su control está situado en el cromosoma 4. El hecho de que en este cromosoma estén también codificados los antígenos Lyb 2 presentes en los linfocitos B y que poseen una heterogeneidad similar a la descrita para los antígenos Ia, permite numerosas especulaciones sobre el origen y función de estos receptores (34).

El receptor para Dextrano se encuentra en aproximadamente el 10% de las células B (35) y su estudio se ha llevado a cabo con un antisuero específico (anti-idiotipo) de la proteína del mieloma J588 (que posee actividad anti-Dx, α , 1-3). La existencia de estructuras moleculares comunes entre los idiotipos del receptor específico y los receptores mitogénicos específicos para el Dx han permitido establecer la hipótesis de la existencia de una relación filogenética entre ambos receptores (35).

La inhibición por un antisuero anti-IgM (36) de la ac

tivación inducida por LPS ha permitido la elaboración de un posible modelo basado en interacciones de naturaleza alostérica entre ambos receptores (37). Del mismo modo, Coutinho ha estudiado los cambios en la asociación entre distintos receptores de las células B (IgM, IgD, receptor mitogénico y Fc) como consecuencia de la activación inducida por LPS (38).

I.2.4. Activación de las células B.

Los linfocitos B en ausencia de estímulo antigénico o mitogénico permanecen largo tiempo en la fase G_0 del ciclo celular. Durante este período sintetizan una pequeña cantidad de IgS que actúan como receptores específicos en la superficie celular. Como consecuencia del encuentro con el inmunógeno específico o el mitógeno en el caso de los PBA, el linfocito B sufre una serie de transformaciones tanto a nivel citológico como bioquímico que conducen a un proceso de proliferación y diferenciación a una célula blástica y plasmática que sintetizan y secretan gran cantidad de anticuerpos con la misma especificidad que la del receptor específico de la célula inicial (39).

La señal que la interacción del antígeno con su receptor específico comunica a la célula B así como los distintos requerimientos por parte de antígenos TI y TD para la activación de dichos linfocitos han conducido a la elabora-

ción de distintas teorías sobre la activación de los linfocitos B.

Bretscher y Cohn (40,41) propusieron en 1970 la existencia de dos señales en la activación específica de los linfocitos B, una de ellas producida como consecuencia de la interacción del antígeno con su receptor específico que conduce a la incapacidad por parte de la célula para sintetizar anticuerpos específicos (señal 1 ó paralitogénica). Para revertir los efectos de la señal 1, se requiere una segunda señal producida por el sistema de reconocimiento asociativo de las células T en el caso de los antígenos TD, o el propio antígeno en el caso de los antígenos TI debido a sus propiedades intrínsecas.

Esta teoría de dos señales ha sido ampliada para explicar la activación de las células T y los diferentes tipos de respuesta humoral y celular en función del número y relación de señales recibidas por el linfocito (42,43).

Otra teoría acerca de la activación de los linfocitos B fue elaborada por Coutinho y col. (44,45) quienes demostraron que la activación directa de las células B por los antígenos TI refleja la capacidad mitogénica de tales moléculas. Estos autores postulan que los antígenos TI poseen dos tipos de estructuras moleculares capaces de interaccionar con la cé-

lula B, el epítope, (que reacciona con el receptor específico de la célula B) y la región capaz de interactuar con el receptor mitogénico. De esta manera, los antígenos TI inducirían respuestas específicas a bajas concentraciones pues sus determinantes antigénicos, al unirse a sus receptores específicos, facilitarían la interacción del componente mitogénico con su receptor correspondiente comunicando así a la célula la señal necesaria para su proliferación y diferenciación a AFC. Por otra parte, a altas concentraciones los antígenos TI se unirían a todos aquellos linfocitos B provistos del receptor mitogénico apropiado independientemente de su especificidad, induciéndose así en ellos la división y síntesis policlonal de anticuerpos (pues, se estimulan clones con distintas especificidades).

Esta teoría postula que la interacción del antígeno con su receptor específico no comunica ninguna señal a la célula B. Esta conclusión estaría apoyada por la incapacidad de los antígenos TD de inducir tolerancia específica en las células B en ausencia de células T y macrófagos. Según esta teoría, los antígenos TD actuarían concentrando sobre la célula B específica las señales mitogénicas producidas por factores mitogénicos liberados por las células T al reconocer el antígeno, de una manera similar al sistema de reconocimiento asociativo propuesto por Bretscher y Cohn. De esta

manera los linfocitos B específicos concentrarían las señales mitogénicas necesarias para su activación, mientras que aquellos linfocitos B con especificidades distintas necesitarían de un estímulo mitogénico muy superior para ser activadas.

En ambos casos, los receptores específicos sobre los linfocitos B funcionarían como concentradores pasivos de la molécula antígeno, permitiendo que un estímulo no específico (mitogénico) activasen al linfocito B. Esta teoría ha sido basada en las siguientes observaciones: 1) la separación física entre los determinantes antigénicos del LPS (hidrato de carbono) y los mitogénicos (lípidos A) de forma que la eliminación por hidrólisis de lípidos A va acompañada de la pérdida de las propiedades antigénicas de la molécula (46); 2) la segregación genética de las respuestas mitogénica y antigénica al LPS en ratones C3H/HeJ (47); 3) la detección con antisueros específicos del receptor mitogénico para LPS en la membrana de uno de cada 3 linfocitos B (32); 4) la dificultad de demostrar la parálisis específica de células B por interacción con los receptores Ig (48).

Melchers (37), sin embargo, ha propuesto que el papel de los receptores específicos no es el de mera presentación pasiva de moléculas de antígeno ya que el tratamiento de células B con anticuerpos anti-Ig (anti- μ , anti- κ , anti- λ) inhiben la diferenciación a AFC inducida por LPS o PPD en células

B. Estos autores postulan, sin embargo, que los receptores específicos modulan la conformación funcional de los receptores mitogénicos y como consecuencia las señales comunicadas por los mitógenos a las células B.

I.2.5. Heterogeneidad de los linfocitos B.

Las evidencias que condujeron a admitir la heterogeneidad de los linfocitos B vinieron por un lado de la distinta susceptibilidad de dichas células B a la estimulación por mitógenos y de otro al grado de timo dependencia o independencia de la respuesta a distintos antígenos así como por análisis de dilución límite.

Diamanstein y col. (49) estudiaron comparativamente las propiedades mitogénicas de LPS, Dx y poli (I,C) encontrando una respuesta aditiva en síntesis de DNA a Dx y LPS o poli(I,C) y LPS cuando ambos mitógenos se añaden simultáneamente al cultivo in vitro. Estos resultados sugerían que el LPS estimula a una subpoblación de células B distinta a la que estimulaba el Dx o poli(I,C). Igualmente, la capacidad de responder a Dx de células de bazo de ratones irradiados, timectomizados y reconstituidos con médula osea, aparece antes en la ontogenia (primera semana) que la capacidad de responder a LPS (segunda semana), indicando que LPS activaba células B más maduras que las que estimulaba Dx.

Gronowicz y col. (50) demostraron que Dx, LPS y PPD además de activar diferentes subpoblaciones de células B, actuaban sobre dichas células en distintos estadios ontogénicos; así mientras el Dx induce una gran proliferación de los linfocitos B (sin excesiva maduración a AFC), el PPD activa a células más maduras y por tanto el índice de proliferación es bajo pero la producción de AFC es muy alta. El LPS actúa sobre ambas poblaciones.

Melchers y col. (51), estudiando la secreción de IgS de linfocitos B activados por mitógenos, demostraron la existencia de tres tipos de linfocitos B que aparecen secuencialmente durante la ontogenia: 1) linfocito grande, in capaz de ser estimulado por LPS y PPD; 2) linfocito pequeño capaz de ser estimulado por LPS y 3) linfocito pequeño susceptible de ser estimulado por PPD y LPS.

El estudio de la respuesta anti-hapteno de derivados haptenizados de antígenos TD y TI, ha conducido igualmente a la descripción de una heterogeneidad en la población de linfocitos B (52,53).

La hipótesis de que las distintas subpoblaciones de células B (B_1 y B_2) responden a los antígenos TI y TD, fue postulada por Playfair (54). Posteriormente, Gershon (55)

postuló que el desarrollo del timo está relacionado con la aparición filogenética de las células B₂. La presencia de distintas subpoblaciones de células B que responden a TI y TD, ha podido establecerse posteriormente siguiendo distintos criterios: 1) marcadores de superficie distintos en ambas subpoblaciones (CRL, receptor para el C3) (56); 2) actividad de la respuesta in vitro a TNP-KLH (TD) y TNP-T4 (TI) (52) y 3) cálculo de frecuencia de precursores específicos in vitro (57).

Se han descrito sistemas en los que las células B, a lo largo del desarrollo ontogénico, adquieren la capacidad de responder a antígenos TI o TD, aunque el orden de aparición de la respuesta es objeto de discusión (58). Igualmente, se ha descrito la influencia del antígeno en la diferenciación de los linfocitos B (respecto a su capacidad de responder a antígenos TI y TD) (59,60).

Lefkovits y col. (61), en condiciones de cultivo limitando el número de células B, han señalado la heterogeneidad de las células B en cuanto a su susceptibilidad para ser activadas por factores no específicos producidos por estimulación mitogénica de células T. Estos autores postulan que este fenómeno puede deberse a la heterogeneidad de la respuesta de células B a este factor o a la existencia de múltiples factores, cada uno de los cuales sería capaz de ac-

tivar a un determinado clon de células B.

I.3. SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El sistema principal de histocompatibilidad (MHC) (62) del ratón, denominado H-2, está presente en el cromosoma 17, grupo de ligamiento IX, y codifica diversas proteínas, muchas de las cuales están presentes en la mayoría de las células. Mediante análisis de recombinación de loci marcadores, se ha podido dividir el sistema H-2 en varias regiones. Las regiones K y D situadas en los extremos del sistema H-2 (clásicos antígenos de histocompatibilidad H-2) contienen genes que codifican especificidades definidas serológicamente y que se presentan en la superficie de casi todas las células, siendo los antígenos diana en el rechazo de aloinjertos. Debido a su alto grado de polimorfismo, existen un gran número de alelos en los loci H-2K y H-2D.

Los antígenos Ia están codificados por la región I, estrechamente ligada a loci K (63), que comprenden 5 loci : I-A, I-B, I-J, I-E, I-C. En contraposición con los antígenos H-2K y H-2D, los antígenos Ia se encuentran predominantemente en las células del sistema linforeticular (células B, algunas subpoblaciones de células T, macrófagos, etc.) y también en las células epidérmicas de Langerhans. Existen tam-

bién diferencias en cuanto a la distribución celular de antígenos Ia, codificados por distintas subregiones, así los codificados por el locus I-J se presentan en las células T supresoras. Existe, igualmente, un alto grado de polimorfismo en la región I.

La región I, además de codificar los antígenos Ia, contiene genes (Ir) (64) que controlan la respuesta a ciertos antígenos sintéticos, proteínas y algunos autoantígenos. La subregión I-A contiene también el locus LD que codifica los antígenos que estimulan la proliferación celular en el MLC (cultivo mixto de linfocitos).

Próximo al locus D se encuentra el locus TL que codifica para antígenos expresados en timocitos y en células de algunos linfomas derivados del timo.

Próximo a la región K aparece el complejo T/t, cuyos genes controlan una serie de etapas esenciales durante la embriogénesis, probablemente codificando componentes de la superficie celular en etapas relevantes del desarrollo.

La región S contiene el gen estructural para el cuarto componente del complemento (65), mientras que la G codifica para determinantes antigénicos presentes predominantemente en eritrocitos (66).

Los antígenos H-2K, H-2D y TL son glicoproteínas de peso molecular similar y que llevan asociada en su estructura la molécula de β_2 microglobulina.

Es de gran interés el hecho de que estos loci, que están dentro de una región de 15cM, codifican moléculas análogas en la membrana celular y que juegan un papel importante en las interacciones celulares. Esto ha conducido a la hipótesis de que todos estos loci han evolucionado a partir de un gen ancestral que codifica proteínas implicadas en fenómenos de reconocimiento intercelular de gran importancia en la evolución de los metazoos (67).

Inicialmente se consideró como papel biológico del MHC el rechazo de aloinjertos, fenómeno que por se quizás no pueda dar cuenta de las presiones selectivas necesarias para mantener la integridad de la estructura genética del MHC. Sólo últimamente, y como se desprende de la descripción anterior, se ha demostrado el significado funcional de los productos génicos del MHC en los fenómenos inmunológicos. Se han así descrito su participación en el control de la especificidad de la respuesta inmune, en las interacciones entre células inmunocompetentes y en la generación de células reactivas con autoantígenos modificados.

Igualmente, es de suma importancia la participación de antígenos codificados en el MHC en la generación de la diversidad de los linfocitos T, lo que constituye uno de los mecanismos de tolerancia inmunológica frente a los antígenos propios.

I.4. LINFOCITOS T.

I.4.1. Heterogeneidad de los linfocitos T.

Aunque los linfocitos son por criterios morfológicos una población celular uniforme, pueden separarse en subgrupos funcionales. Esta separación ha podido realizarse debido a la existencia de un gran número de marcadores de superficie. Los marcadores más utilizados son: thy-1, que diferencia a los linfocitos T y B, así como los Ly-1, Ly-2,3 y la gran familia de antígenos Ia (68,69).

I.4.1.1. Marcadores sobre la superficie celular. El antígeno thy-1, inicialmente descrito por Reif y Allen (70), se encuentra presente en casi todos los timocitos, y en las células T de otros órganos linfoides. Aparece, igualmente, en células de cerebro, fibroblastos y células epidérmicas. Recientemente, se ha localizado en el cromosoma 9 el gen que controla su síntesis, no estando por tanto ligado ni a los

genes que codifican las IgS ni al MHC (71). Su expresión está controlada por dos alelos, el thy-1^a que codifica el antígeno thy-1.1 presente en la cepa de ratones AKR, RF y otras subcepas y el thy-1^b que codifica el antígeno thy-1.2 presente en la cepa C3H.

Desde el punto de vista molecular, el antígeno thy-1 es una glicoproteína de peso molecular 25.000-30.000 que rápidamente se secreta al medio, lo que hace pensar que se trata de una proteína de superficie (72).

Los antígenos Ly han despertado recientemente gran interés desde el punto de vista inmunológico puesto que se ha postulado que los genes que controlan las especificidades antigénicas Ly están íntimamente relacionados con las funciones inmunológicas de los linfocitos. Han sido ya descritas ocho especificidades Ly, cuatro de las cuales se encuentran fundamentalmente en los linfocitos T (Ly-1, Ly-2, Ly-3 y Ly-5) mientras que las restantes se encuentran en linfocitos B o en ambos tipos de células.

De los cuatro antígenos presentes en los linfocitos T, sólo se conoce la localización cromosómica de tres de ellos. El gen Ly-1 se encuentra en el cromosoma 19 mientras que Ly-2 y Ly-3 se encuentran en el cromosoma 6 (73).

Desde el punto de vista de la maduración ontogénica de las células T, Cantor y Boyse postularon que en la población más inmadura es $Ly-1,2,3^+$ generándose durante los procesos normales de diferenciación tres subclases de células T: $Ly-1^+$, $Ly-2,3^+$ y $Ly-1,2,3^+$.

Todos estos antígenos muestran modelos de distribución característicos en diferentes subpoblaciones de linfocitos, modelos que se correlacionan con distintos agrupamientos funcionales (74,75).

I.4.1.2. Subpoblaciones de células T. Clásicamente, se admite la existencia de tres categorías de linfocitos T: linfocitos T auxiliares (T_H), citotóxicos (T_C) y supresores (T_S).

Las células T_H comprenden una subpoblación de células T cuya presencia resulta indispensable tanto en la respuesta de tipo humoral como en la de tipo celular. Colaboran con las células B en la formación de anticuerpos en la respuesta a antígenos TD, participan en la generación de células T_C , en el desarrollo de la sensibilidad de tipo retardada y probablemente en la generación de células T_S . Son asimismo las células responsables de la mayor parte de la actividad mitótica en la reacción mixta de linfocitos (MLC) (73,75).

De acuerdo con los conocimientos actuales, las célu-

las T_H se caracterizan por ser thy-1^+ , Ly-2,3^- y Ly-1^+ , comprenden alrededor del 35% de las células T periféricas (76). La existencia de antígenos Ia en la superficie de los linfocitos T_H es objeto de controversia (77,78).

Recientes estudios indican que las células T_H pueden subdividirse atendiendo a la categoría de células B con las que son capaces de colaborar. Así pues, mientras unas células T_H son capaces de colaborar con células B de una determinada especificidad alotípica (79,80), otras colaboran solamente en la respuesta de tipo IgE o IgG (81). Por último, Ward y Cantor (82) han descrito la existencia de células T_H específicas para un determinado idiotipo. Si esta relación unívoca entre una célula T y una célula B resultase ser un fenómeno general, las células T_H se subdividirían en diferentes subgrupos según su especificidad.

Las células T_C son las responsables de la lisis celular mediada por linfocitos. Asimismo son las responsables del rechazo de aloinjertos y probablemente desempeñan un importante papel en el fenómeno de rechazo de injerto-contrahuésped y en el de sensibilidad de tipo retardada. Aunque inicialmente se habían descrito las células T_C como un subgrupo de células T homogéneo, más recientemente se ha comprobado que existen distintos tipos de citotoxicidad celular y de células efectoras. Es posible que los distintos tipos de

células T efectoras intervengan en distintas clases de citotoxicidad (natural, inducida por antígeno o por mitógeno) (83, 84).

Las células T_C presentan el antígeno thy-1 en su superficie y fenotípicamente son células Ly-1⁻, Ly-2,3⁺ en contraposición a las células T_H (85).

Las células T_C se generan por estimulación alogénica si bien su frecuencia es del orden de 100 veces menor que la de las células T_H . Pueden ser igualmente generadas por estimulación con mitógenos, principalmente PHA y ConA siendo las células así generadas las responsables de la citotixicidad inducida por lectinas o LICC (83).

Las células T_S son las responsables de la inhibición específica de la inmunidad humoral y celular y han sido descritas como elementos importantes tanto en los fenómenos de tolerancia a alta y a bajas dosis como en la inducción de tolerancia a antígenos propios y en la inducida a aloinjertos (55). Parece igualmente que pueden ser activadas por virus oncogénicos, resultando en una disminución de la respuesta inmune (86). Asimismo, la existencia de enfermedades autoinmunes en la cepa de ratones NZB ha sido asociado con la ausencia de células T_S (87).

Las células T_S se caracterizan por presentar el antí-

geno thy-1, siendo Ly-1⁻, Ly-2,3⁺ al igual que las T_C. No obstante ha sido descrita la existencia de células T_S con fenotipo Ly-1⁺, Ly-2,3⁺, si bien esta subpoblación se la considera como células T_S no específicas. Ha sido también descrito que las células T_S presentan antígenos codificados por el locus I-J de la región I del MHC (88).

Feldman y Kontianen han estudiado los requerimientos antigénicos y celulares en la inducción de las células T_S, concluyendo su independencia de la presencia de macrófagos y la necesidad de concentraciones de antígenos mayores que las necesarias para la inducción de las células T_H (89).

Huber y col. (90) estudiaron si las subpoblaciones de células T_H y T_S corresponden a distintos estadios de maduración de la misma población celular o si se originan por distintas vías de diferenciación de la misma población celular inicial. Sus resultados indican que las células T_H inyectadas en recipientes B singénicos podían mantenerse durante seis meses sin que pudieran detectarse células T_S y viceversa, lo que indicaba que ambos tipos de células derivan de sublíneas celulares distintas.

Cantor y col. (91) han descrito que la respuesta neta a SRBC representa un equilibrio entre las células T_H específicas para dicho antígeno y las T_S. Estos datos implican que:

a) el nivel de respuesta a un determinado antígeno refleja las proporciones relativas entre las células T_H y T_S y b) la ausencia de respuesta a un determinado antígeno refleja la dominancia de las células T_S .

I.4.2. Receptores de las células T.

I.4.2.1. Receptores con determinantes comunes a las IgS. La naturaleza del receptor de las células T es motivo de controversia. Existen abundantes datos que apoyan la existencia de moléculas similares a las IgS como receptores de las células T. Estos receptores se pusieron de manifiesto, al menos en ratón, mediante la utilización de sueros de pollo anti-IgS de ratón. De igual forma, de linfocitos T de rata, han podido extraerse moléculas de su membrana que reaccionan con antisue-ros anti-IgG, anti-IgM y anti- κ . Debido a que dicha interacción es más evidente para la IgM que para la IgG, se especula con la posibilidad de que estas últimas moléculas estén más sumergidas en la membrana de la célula T (92,93).

I.4.2.2. Evidencias a favor de la no existencia de IgS como receptor de las células T. Otro sistema genético diferente del que controla la síntesis de IgS ha sido relacionado con la expresión de los receptores de las células T. Durante los

últimos años, se han acumulado gran cantidad de datos sugiriendo que los genes de la respuesta inmune (genes Ir) localizados en el MHC están directamente implicados en el control de expresión de los receptores específicos de las células T (94).

Existen actualmente evidencias en favor de que las células T activadas liberan factores específicos para el antígeno que reaccionan con antisueros anti-Ia pero no con anti-IgS y que son capaces de colaborar positiva o negativamente en la formación de anticuerpos (95,96).

La existencia de factores auxiliares capaces de sustituir a las células T en la activación de las células B, ha sido ampliamente estudiada por Taussig, utilizando antígenos formados por heteropolímeros de aa del tipo de (T,G)-A-L. El factor activo es liberado por los linfocitos sensibilizados in vivo al ser estimulados in vitro con el mismo antígeno. Estos linfocitos presentan el antígeno thy-1 específico de las células T. El factor descrito por Taussig posee un peso molecular de 50.000 y es capaz de unirse al antígeno inmovilizado en columnas de Sepharosa. Su alta especificidad por el antígeno viene demostrada por el hecho de que factores liberados por estimulación con (T,G)-A-L no son capaces de colaborar en la respuesta a (Phe,G)-A-L o a (T,G)-Pro-L, aun cuando anti-

sueros dirigidos frente a estos antígenos reaccionan cruzadamente. Además de contener determinantes antigénicos Ia, controlados por la región I del MHC, este factor se absorbe sobre linfocitos B cuyo receptor para el factor puede ser bloqueado por antisueros anti-Ia. De esta forma, se pudo comprobar que algunas cepas de ratones que no responden al antígeno (T,G)-A-L no producen el citado factor en tanto que la falta de respuesta de otras cepas se debe a la ausencia de su receptor sobre las células B (95).

Algunos datos en favor de un sistema de reconocimiento de las células T análogo al postulado de Taussig, ha sido descrito por McDougal y Gordon utilizando otros antígenos (97).

Además de factores auxiliares liberados por las células T, presumiblemente T_H , existen factores supresores. Aunque antigénica y químicamente parecen ser análogos a los factores auxiliares, se diferencian en: 1) actúan suprimiendo la producción de anticuerpos; 2) no son liberados al medio de cultivo, siendo necesaria la lisis celular; 3) actúan sobre las células T probablemente sobre las T_H y 4) los genes que controlan su producción están localizados en la región I-J (98, 99).

I.4.2.3. Las células T y B presentan la misma especificidad idiotípica. Los linfocitos T en determinados sistemas pre-

sentan un poder de discriminación antigénico casi idéntico al que poseen los linfocitos B (100,101). Esto sugiere que los sitios de unión de antígeno deberían presentar estructuras similares en ambos tipos de linfocitos. Estos datos parecen indicar que los receptores antigénicos de las células T y B estuvieran codificados por el mismo grupo de genes V si bien, el resto de la molécula podría estar codificada por diferentes genes en ambos tipos de células.

Si los genes V que codifican las regiones variables de los receptores de las células T y B son idénticos, esto implicaría que los linfocitos T y B que reaccionan con el mismo determinante antigénico poseerían idiotipos idénticos o muy similares. Durante los últimos años se han acumulado numerosos datos que favorecen esta hipótesis. Por ejemplo, los aloanticuerpos producidos por las células B y los receptores de las células T que median el fenómeno de injerto-contrahuésped, el cultivo mixto de linfocitos y los fenómenos de citotoxicidad producido en respuesta frente al mismo aloantígeno, muestran idiotipos muy similares e idénticos (102).

Recientemente, se ha caracterizado físicoquímicamente moléculas liberadas por las células T con capacidad de unirse al antígeno. Estas moléculas no poseen determinantes antigénicos característicos de las IgS ni determinantes codificados por genes del MHC. Su peso molecular es de 150.000 aunque tam-

bién se encuentran moléculas de peso molecular 70.000, que posiblemente representan productos de degradación de las primeras (103).

Eichmann y Rajewsky llegaron a las mismas conclusiones demostrando además que anticuerpos anti-idiotipo eran capaces de sensibilizar tanto a las células T_H como a las células B, portadoras de dicho idiotipo (104,105).

Basándose en que los idiotipos son marcadores de las regiones V de las IgS y pueden ser utilizados como marcadores de los genes que codifican las regiones V de las moléculas de anticuerpo en el grupo de ligamiento de la cadena pesada, Eichmann y col. (106) han encontrado evidencias genéticas que apoyan el que estos últimos genes controlan los sitios de unión de las moléculas de anticuerpo en la célula B y los receptores de la célula T_H .

Recientes resultados obtenidos utilizando moléculas de receptor de las células T específicamente purificadas, sugieren, al igual que los experimentos de Wigzell (103), la ausencia de determinantes isotípicos de las IgS, expresando, sin embargo, regiones variables de las cadenas pesadas de las IgS. Estos autores encontraron igualmente un peso molecular de 150.000 para estas moléculas (107).

I.4.3. Activación de las células T.

Debido a la ausencia de ensayos reproducibles para estudiar las funciones de las células T a nivel individual, no ha sido posible el análisis cuantitativo de la respuesta inmune de este tipo de células. El estudio de la actividad auxiliar, supresora y de sensibilidad de tipo retardada, se limita a ensayos de actividades biológicas mediadas por otras células. La incorporación de precursores radioactivos (^3H -timidina) en el DNA es un método ampliamente utilizado para detectar la proliferación de células T *in vitro*. Sin embargo, solamente en condiciones muy determinadas puede asociarse directamente la incorporación de ^3H -timidina con el número de células que responden al estímulo antigénico. Por el contrario puede estudiarse la respuesta a determinadas lectinas y la respuesta a células alogénicas *in vitro* (MLC).

Los mecanismos de activación de las células T presentan algunas peculiaridades que las diferencian de los linfocitos B: a) las células T no son capaces de unir o lo hacen débilmente antígenos solubles, al menos no pueden ser eliminadas por tratamiento con antígenos radioactivos de muy alta actividad específica (suicidio radioactivo). Ello implicaría bien que los receptores de las células T poseen poca afinidad por el antígeno o que la interacción de ambos origi

na otros efectos distintos del puro contacto entre ambos (108) y b) las células T no se activan por antígenos solubles; estos deben ser presentados sobre la superficie de células metabólicamente activas (macrófagos) (109).

I.4.3.1. Respuesta a mitógenos. Los linfocitos T pueden ser activados policlonalmente al igual que los linfocitos B, por determinadas sustancias con propiedades mitogénicas (110). En el caso de las células T, las sustancias que presentan mayor capacidad mitogénica son determinadas lectinas (PHA, ConA y PWM). Si bien no se conoce exactamente la frecuencia de células sensibles a estas lectinas, Watanabe y col. (111) han demostrado que al menos el 20% de las células T de bazo de ratón son sensibles a la estimulación con ConA. Sin embargo, estas células específicas para ConA, no pertenecen a una población funcionalmente homogénea de células T, sino que incluyen tanto células T_H como células T_S y células T_C (112). En este sentido, Dutton y col. (113) demostraron la existencia de distintos requerimientos en cuanto a dosis, cinética y proliferación en la activación de células T_H y T_S por ConA.

Ha sido, asimismo, demostrado por distintos autores que la activación de los linfocitos T por PHA o ConA requiere la presencia de macrófagos como células accesorias (114), aunque en este sentido se han encontrado diferencias entre espe-

cies animales.

La modificación de la membrana celular de los linfocitos T inducida bajo determinadas condiciones (rosetas) in dependientes de estimulación antigénica, hace a estas células sensibles a la acción de activadores policlonales (115). Determinados factores solubles son capaces de inducir activación policlonal de células T modificadas pero no de células T en reposo. La célula responsable de la producción de dichos factores no se ha podido determinar si bien dicha producción depende de la presencia de células T (116,117).

Es muy posible que modificaciones indiscretas introducidas en la superficie celular de las células T bien por la acción de lectinas o por interaccionar con otras células provocan en ellas la aparición (o exposición) de un receptor para sustancias mitogénicas producidos probablemente por células distintas a las que se estimulan. En este sentido, tra bajos actuales postulan la separación de la activación de las células T en dos etapas: una muy rápida, caracterizada por la aparición del receptor mitogénico y otra más lenta, carac terizada por la producción de los citados factores mitogénicos (117).

I.4.3.2. Estimulación alogénica. La diversidad de las subpoblaciones de células T que responden a aloantígenos puede ser

analizada desde dos perspectivas: 1) identificando y separando las distintas subpoblaciones basándose en sus diferentes propiedades de adherencia a los antígenos presentes sobre la superficie celular y 2) analizando el sistema aloantigénico frente al cual responden las células (118).

Las estructuras responsables de la proliferación de las células T inducida por la estimulación alogénica se denominan antígenos LD en oposición a aquellos determinantes reconocidos por las células T_C generadas en la estimulación anterior que se denominan SD que se utilizan como dianas en la citotoxicidad mediada por células (119). Los antígenos LD están codificados por los genes localizados en la región I del MHC; los antígenos SD están codificados por las regiones K y D (62).

La demostración más clara del papel de los antígenos LD y SD en la estimulación alogénica se deriva de los experimentos de las "tres células" en cultivos in vitro (120). Cuando las células estimuladora y respondadora difieren en la región I pero son idénticos en las regiones K y D, se induce una fuerte proliferación in vitro, mediada por incorporación de ^3H -timidina, no detectándose la presencia de células T_C contra las regiones K y D. Por el contrario, si las diferencias entre la célula estimuladora y respondadora ocurre en las regiones K y D pero existe homología en la región I, no

se induce ni proliferación ni respuesta de células citotóxicas. Si la célula estimuladora se diferencia de la respondadora en las regiones K y D y en la región I, se generan ambas actividades de proliferación y actividad citotóxica. Así, pues, ambos antígenos, LD y SD, son requeridos en la activación de las células T_C . Las células T_H reconocen los antígenos LD induciéndose así su proliferación. Estas células T_H activadas son necesarias para activar las células T_C que reconocen los antígenos SD.

I.5. INTERACCIONES CELULARES EN LA RESPUESTA INMUNE.

I.5.1. Colaboración entre células T y B.

En la respuesta inmune a determinados antígenos (TD) se requiere la cooperación T y B para la activación y diferenciación de las células B a células productoras de anticuerpos. Esta cooperación no requiere el contacto físico entre ambos tipos de linfocitos sino que factores liberados por las células T pueden llevar a cabo aquella cooperación (121).

La activación de las células T es necesaria para inducir la activación de las células B. Las células T se activan bien por reconocimiento específico de la molécula de antígeno (determinantes portadores) o por estimulación policlonal por

mitógenos o por aloantígenos (111). Las células T activadas o los factores que las reemplazan pueden ser específicos o no específicos para el antígeno.

La cooperación de las células T y B en su expresión más fisiológica supone el reconocimiento de los determinantes portadores de la molécula de antígeno por las células T y de los determinantes hapténicos por las células B.

La presencia de células T_H no específicas se pone de manifiesto por la liberación de factores solubles por parte de células T sensibilizadas para KLH in vivo y reestimuladas in vitro con el mismo antígeno en presencia de macrófagos. Estos factores son capaces de colaborar con las células B en la respuesta a otros antígenos como SRBC y DRBC (122).

Mediante sistemas apropiados de inmunización in vivo, ha sido posible seleccionar ambos tipos de células T_H (específicas y no específicas). Marrack y Kappler (123) han demostrado que la inyección de bajas dosis de KLH por vía intraperitoneal con FCA genera preferentemente células T_H no específicas; sin embargo, la inmunización con altas dosis del antígeno genera ambos tipos de células T_H . No ha sido posible, sin embargo generar poblaciones celulares con actividad auxiliar específica careciendo de actividad no específica.

No se conoce actualmente si la célula que media la ac

tividad no específica corresponde a una célula intermedia en la diferenciación hacia células T_H específicas, o si ambos tipos de células representan poblaciones no relacionadas, si bien estas poblaciones pueden ser distinguidas en base a su distinta adherencia al nylon (124).

Waldman (121), utilizando el ensayo de análisis de dilución límite a fin de determinar el número de células B con las que es capaz de colaborar una célula T, encontró que ambas células cooperan en una relación 1:1. Asimismo, Phillip y col. (125) llegaron a análogas conclusiones utilizando sobrenadantes de cultivos in vitro producidos en condiciones limitantes de células T.

Estudiando los requerimientos de homología en las regiones de MHC, se ha comprobado que las células T y B histoincompatibles no son capaces de colaborar en una respuesta, tanto debido a fenómenos de inhibición por factores generados en una reacción alogénica concomitante, como a la ausencia de células T de las apropiadas estructuras de reconocimiento del MHC (concretamente de la región I) de las células B (121).

Swin y col. (126) estudiaron los requerimientos para la colaboración entre las células T y B en la respuesta secundaria in vitro. Estos autores interpretaron sus resulta

dos en el sentido de que bajo determinadas condiciones no existen preferencias en cuanto a identidad genética en la región I para la colaboración entre los linfocitos T y B, siendo la ausencia de colaboración debida a efectos alógenos negativos.

Sin embargo, estas interpretaciones están en total oposición a las descritas por Zinkernagel (127,128) sobre los fenómenos de aprendizaje inmunológico de las células T en la corteza epitelial del timo, donde queda definida claramente la restricción a nivel de MHC a la que está sometida la colaboración entre las distintas células inmunocompetentes.

I.5.2. Factores solubles que reemplazan a las células T en la colaboración T-B.

La cooperación in vitro entre diferentes poblaciones celulares puede llevarse a cabo a través de factores solubles liberados por las células activadas. En la literatura se han descrito numerosos factores, existiendo una gran heterogeneidad tanto en las células responsables de su producción como en su especificidad, presencia o no de determinantes antigénicos asociados a ellos o en su actividad, ya como factores auxiliares o supresores (95,98,123,129,130,131).

De esta manera, ha podido ponerse de manifiesto la

existencia de factores capaces de reemplazar a las células T (TRF) en la respuesta in vitro a antígenos TD (130). La producción de estos factores es inducida por la acción de la lectina ConA sobre las células T o bien por estimulación alogénica de éstas (132). Estos factores se habían considerado como inespecíficos, aunque recientemente se ha descrito que poseen actividad anti-idiotipo (133). Igualmente se ha demostrado que no poseen antígenos Ia (134).

Amerding y Katz (135) han descrito la producción por estimulación alogénica de un factor inespecífico que posee antígenos Ia y la proteína β_2 microglobulina. Igualmente, Taussig y col. (136) han descrito la liberación de un factor específico que presenta antígenos Ia, al activar in vitro con un antígeno células T estimuladas in vivo con el mismo antígeno.

Los macrófagos pueden, asimismo, producir factores capaces de reemplazar a las células T en la estimulación in vitro por antígenos TD (131), como de activar directamente a las células T.

Feldman y col. (137) han estudiado la liberación por los macrófagos de factores capaces de inducir la maduración de células T_H y T_S ; algunos de los cuales poseen antígenos Ia en su estructura.

Sin embargo, las actividades biológicas de los factores producidos por macrófagos son indistinguibles en ciertos aspectos de las actividades de factores producidos por linfocitos T bajo otras condiciones experimentales diferentes.

Igualmente, se ha descrito la existencia de factores supresores (98) capaces de inhibir la activación de las células B. Estos autores demostraron que estos factores supresores presentan determinantes antigénicos codificados por la región I-J (marcadores específicos de las células T_S).

I.5.3. Colaboración entre linfocitos T y macrófagos.

Aunque se acepta generalmente que los macrófagos facilitan muchos de los fenómenos inmunológicos dependientes de las células T (114,138), sólo en los últimos años se ha comenzado a analizar las características moleculares y celulares de las anteriores observaciones. Por ejemplo, en el cobaya, se puede demostrar claramente que el reconocimiento de un antígeno soluble por las células T requiere la presentación de éste en la superficie del macrófago (139).

La interacción entre macrófagos y linfocitos T puede ocurrir bien por contacto directo entre ambas células o por medio de factores solubles producidos por los macrófagos que

se unen al antígeno y que poseen propiedades citofílicas para la célula T. Evidencias a favor de la segunda hipótesis se han descrito por Erb y col. (129) en la generación de los linfocitos T auxiliares en ratón. Sin embargo, estas evidencias no se han encontrado en el cobaya. Sin embargo, en esta especie, se han descrito dos tipos de interacciones macrófago/célula T. La primera ocurre en un tiempo muy corto y es independiente de la presencia del antígeno. Esta etapa requiere metabolismo activo en el macrófago pero no en la célula T. La segunda etapa, dependiente del antígeno, requiere además que ambas células, macrófago y linfocito T, muestren homología en la región I de MHC. Esta segunda etapa conduce a la activación y proliferación de las células T (140).

Basten y col. (108) estudiaron los requerimientos necesarios para la eliminación de células T o B por exposición a antígenos altamente radioactivos observando que no era posible el suicidio de las células T utilizando antígeno soluble, siendo necesaria la presencia de células accesorias (macrófagos o células B). Este suicidio se inhibía por pretratamiento con aloantisueros dirigidos contra el MHC.

Miller y col. (141), igualmente estudiando los mecanismos responsables de la sensibilidad de tipo retardado,

para FGG y DNFB en ratón, encontraron que era necesaria una homología entre los macrófagos y las células T en la región I-A en el caso del primer antígeno y en las regiones I,K, D para el segundo antígeno.

Otros autores (142,143) han encontrado que los macrófagos son necesarios tanto en la primera etapa in vivo de generación de células T activadas para un antígeno como en la segunda etapa in vitro de producción de anticuerpos por parte de las células B. Siendo además necesario que ambos macrófagos sean singénicos, lo que sugiere que en la etapa de activación de las células T por el antígeno, estas células no sólo reconocen dicho antígeno en la superficie del macrófago sino que reconocen también antígenos codificados en el MHC (región I-A).

I.6. REGULACION DEL SISTEMA INMUNE.

I.6.1. Interacciones idiotipo-anti-idiotipo.

La respuesta inmune frente a un estímulo antigénico depende de: a) la frecuencia de células precursoras específicas del correspondiente antígeno, b) número de divisiones que sufre cada clon estimulado y c) eficiencia en la adquisición de funciones efectoras. La frecuencia de precursores específicos para el antígeno SRBC fue primeramente determina



da por Lefkovits (144) correspondiendo a 1 de cada 10^5 linfocitos de bazo de ratón. Experimentos realizados posteriormente con condiciones de cultivo más apropiadas condujeron a Andersson y col. (145) y Schreier (146) a determinar que una de cada 3×10^3 células es capaz de producir anticuerpos anti-SRBC.

El número de divisiones o tamaño del clon específico así como su desarrollo de células efectoras, depende, igualmente, de las condiciones de estudio. Melchers y Andersson (147) han descrito que un precursor específico es capaz de adquirir sus propiedades efectoras sin división celular (tamaño del clon, una célula). Por otra parte, Luzzati y col. (148) demostraron en condiciones de microcultivo que un clon es capaz de producir alrededor de 3×10^2 AFC. Resultados descritos por Askonas y col. (149) sobre la estimulación de clones de células de memoria y su proliferación por transferencias consecutivas a ratones irradiados, demostraron que un precursor es capaz de proliferar durante 50 generaciones originando 2^{50} o 10^{15} linfocitos. En el caso de células neoplásicas (mielomas), el tamaño del clon es limitado.

Burnet (24) postuló en 1959 la existencia de linfocitos específicos para cualquier antígeno previamente al contacto con éste, y que el papel del antígeno sería seleccionar las células con receptores complementarios a sus deter-

minantes antigénicos. La ausencia de clones de células específicas para componentes autólogos se explicaría por eliminación de estos durante períodos críticos en la ontogenia al entrar en contacto con el antígeno.

Si bien la teoría de la selección clonal es admitida actualmente, existen algunos datos experimentales que hacen necesaria su revisión y ampliación: 1) la tolerancia inmunológica puede ser inducida en individuos adultos inmunocompetentes (105); 2) existen autoantígenos que son reconocidos en determinados casos de enfermedades autoinmunes (rotura de tolerancia) (150); 3) asimismo, la estimulación policlonal inducida por LPS (151) pone de manifiesto la presencia de células productoras de autoanticuerpos; 4) constantemente, en la respuesta inmune, se están produciendo anticuerpos contra componentes propios, tales como las moléculas de IgS (152); 5) el control genético de la respuesta inmune a determinados antígenos (153) y 6) la importancia de las interacciones celulares en la regulación de la respuesta inmune así como de las restricciones que gobiernan estas interacciones (154).

El reciente interés en la regulación inmunológica proviene esencialmente del trabajo desarrollado por Jerne (155, 156) que postuló una regulación del SI basada en la existencia de determinantes idiotípicos sobre las moléculas de anti-

cuerpos (teoría de la red reguladora idiotipo-anti-idiotipo). Hay actualmente gran número de datos en apoyo de que ciertas estructuras asociadas con las regiones variables de las IgS (donde se expresa el sitio de unión con el antígeno), pueden comportarse a su vez como determinantes antigénicos (idiotipos) para otras moléculas de anticuerpos producidas por el mismo individuo (152,157). Se ha demostrado que estos anticuerpos anti-idiotipo se forman como consecuencia de la estimulación antigénica y que pueden bien estimular o inhibir la actividad de las células T y/o B que responden al estímulo antigénico específico y que expresan en su membrana receptores portadores del idiotipo (158). La teoría predice que al formarse los primeros anticuerpos, estos generarían anticuerpos anti-idiotipos que a su vez pueden dar origen a nuevos anti-anti-anticuerpos. De esta forma, el sistema podría crecer indefinidamente, siendo evidente la existencia de algún tipo de control que module la magnitud del proceso. En un determinado punto, esta secuencia de interacciones estimuladoras puede producir reacciones que inhiban su continuidad, dejando el sistema en un nuevo estado de equilibrio dinámico.

Existen dos aspectos muy importantes al considerar la teoría de Jerne: 1) la penetración del antígeno provoca la ruptura del equilibrio presente en el sistema, afectando a otras células linfoides además de las que interaccionan di

rectamente con el antígeno y 2) el SI se caracteriza por la existencia por un equilibrio dinámico en el cual lás moléculas de anticuerpo (anticuerpos naturales) reconocen componentes endógenos del sistema de regulación (idiotipos) y que Jerne denominó "imágenes internas del antígeno". De donde se concluía que el universo de idiotipos representa el universo de antígenos (159).

Jerne señaló asimismo la posibilidad de que anticuerpos anti-idiotipo reaccionaran con otros anticuerpos además de con aquellos generados por el antígeno. Estos se producirían como consecuencia del hecho de que los receptores (del sistema de regulación) funcionan por reconocimiento de componentes endógenos (idiotipos) cuya consecuencia es el reconocimiento de antígenos externos. Así, pues, es posible que el antígeno estimule sólo una parte de la población de anticuerpos que poseen la misma especificidad idiográfica. Estos postulados iniciales han sido posteriormente corroborados por datos experimentales (13,14).

Por otra parte, existen sobre las células B otros receptores que ponen de manifiesto las interrelaciones entre los componentes del sistema linfoide. Una vez que el antígeno se une por sus determinantes antigénicos al receptor de una determinada célula B, anticuerpos que reconocen otros determinantes antigénicos de la misma molécula de antígeno pue

den unirse a esta y a través de los receptores Fc de la célula B (que reconocen la porción Fc, C-terminal de las cadenas pesadas) reforzar la unión del antígeno a la célula. De esta forma, determinadas células B pueden producir anticuerpos que afectan la respuesta de otras células B a un determinado antígeno (160).

I.6.2. Restricción H-2.

Otro fenómeno que influye en la respuesta inmune, es el debido a la restricción H-2 que ha puesto de manifiesto la importancia de los antígenos de histocompatibilidad en el reconocimiento de estructuras autólogas y en la generación de la diversidad de reconocimiento del sistema inmune.

El fenómeno de la restricción H-2 consiste en el requerimiento de compatibilidad en los antígenos codificados por el MHC para que pueda llevarse a cabo la cooperación entre las distintas células que intervienen en el SI. Esta compatibilidad se refiere a la región I en las interacciones entre macrófago y célula T, célula B y célula T y célula T_H y T_C , y a las regiones K y D en la interacción entre células T_C y su célula diana.

Recientes experimentos (128,141,161,162) utilizando

quimeras biológicas (producidas reconstituyendo ratones irradiados subletalmente con células de médula ósea), favorecen la idea de que la restricción H-2 es anterior al estímulo antigénico y no se produce como consecuencia de éste. Dicha restricción viene determinada por los antígenos H-2 presentes en la corteza epitelial del timo, cuyo reconocimiento actúa como agente de la diferenciación de las células T inmaduras. El aprendizaje de la restricción H-2 en el timo vendría demostrado por los siguientes hechos: a) las células T de un animal homocigótico aa son, en cuanto a reconocimiento de estructuras, H-2 anti-a y reconocen los antígenos a sobre la superficie de otras células, B, T o macrófagos; b) las células T de un animal heterocigótico (axb) consisten de una mezcla de partes iguales de células T anti-a y anti-b; c) las células T de un animal heterocigótico (axb) pero que han adquirido su diferenciación en un timo de un ratón a (quimera(axb) → a) contienen solamente células funcionales T anti-a y d) células T procedentes de un animal homocigótico aa pero que han adquirido su diferenciación a través de un timo (axb) (quimera a → (axb)) contienen ambas clases de células T, anti-a y anti-b.

A fin de explicar la restricción H-2, han sido propuestos tres modelos: 1) "asociación íntima" (163), según el cual la interacción efectiva entre las células efectora y dia

na debería transcurrir a través de moléculas similares. Este modelo ha sido actualmente descartado al demostrarse el aprendizaje al que las células T están sometidas en el timo;

2) "reconocimiento de la alteración de estructuras autólogas" (164), modelo que postula que las células T poseen un único receptor que reconoce una modificación que los antígenos introducen en el H-2 de las células propias. Si bien existen evidencias en favor de estructuras antigénicas híbridos entre antígenos H-2 y virus, es difícil aplicar esta teoría a ciertas situaciones experimentales: a) es poco probable que muchos antígenos menores de histocompatibilidad puedan modificar el H-2 de igual manera; b) si bien se ha descrito que por infección vírica pueden aparecer nuevas especificidades H-2, esto es difícil de explicar en casos en los que la infección viral (virus influenza) inhibe la síntesis de proteínas de la célula y c) von Boehmer y col. (165) han descrito la diferente segregación de la capacidad de reconocimiento de los antígenos H-2 y de antígenos menores de histocompatibilidad y 3) "sistema de doble reconocimiento" (166,167, 168), según el cual las células T tendrían dos receptores, uno (R_0) específico de estructuras H-2 y el otro (R_1) del antígeno. En las primeras etapas de diferenciación (células pre-T), ambos receptores poseen idénticos sitios de unión. Las células pre- T_H reconocen mediante estos receptores productos de los genes de la región I mientras que las pre- T_C

reconocen los productos de las regiones K y D. Los productos de los genes del MHC en el epitelio del timo, interactúan con los receptores de las células pre-T que reconocen estos antígenos propios (Ia y K ó D). Esta interacción conduce a una proliferación exhaustiva y a la selección de células T que expresan el receptor R_0 inalterado, junto con el receptor R_1 alterado por mutaciones somáticas ocurridas durante la diferenciación. Todas las células T_H así seleccionadas presentan dos clases de receptores: R_0 que reconoce antígenos Ia y R_1 específico para antígenos extraños. De igual forma, los precursores de las células T_C después de su paso por el timo, darían lugar a una población de células T_C con un receptor R_0 que reconoce antígenos K o D y el otro R_1 que reconoce otros antígenos. Por último, en la diferenciación de linfocitos efectores (T_C o células B productoras de anticuerpos), es necesaria la presencia de células T_H . Estas células T_H están sometidas a restricción a nivel del MHC, lo que significa que su receptor R_0 debe reconocer antígenos Ia de las células B o T_C para su inducción a células efectoras.

La regulación del SI aumenta de complejidad al considerar el control genético de la respuesta ejercida por los genes Ir codificados dentro del MHC (153).

I.6.3. Genes Ir.

Como consecuencia de la inmunización con homopolímeros de L aa inmunogénicos, Benacerraf pudo clarificar distintas cepas singeneicas de ratones según su capacidad de responder a dichos antígenos. Esta capacidad de respuesta sigue un tipo de herencia Mendeliana.

Los primeros (169) estudios se llevaron a cabo en el cobaya, determinándose la capacidad de responder a DNP-PLL en cuanto a producción de anticuerpos anti-DNP y al desarrollo de hipersensibilidad de tipo retardada. Pudo demostrarse que la falta de respuesta no era debido a la incapacidad de metabolizar PLL sino que dicha respuesta estaba controlada por un gen dominante que se expresaba en células inmunológicamente competentes (macrófagos y/o linfocitos).

Posteriormente, McDevit y col. (64) localizaron el gen que controla la respuesta al antígeno (T,G)-A-L en la región I del MHC H-2, concluyendo que los genes Ir están correlacionados con el proceso de reconocimiento específico de la molécula portadora del hapteno, esencial en la activación de las células T. Esta conclusión venía apoyada por el hecho de que los genes Ir controlaban únicamente la respuesta a antígenos TD, si bien ha sido descrita la presen-

cia de genes Ir en la respuesta a algún antígeno TI (170).

Igualmente, en el caso de antígenos como (T,G)-A-L que pueden comportarse como TD o TI según la configuración de los aa que lo forman, la respuesta IgM no está bajo el control de los genes Ir, pero sí lo está la respuesta IgG, que es dependiente de la presencia de células T.

Recientemente, Berzofsky y col. (171), estudiando la respuesta a la nucleasa de Staphylococco en las cepas de ratones C57Bl/10 (no respondedora) y B10.A (respondedora), encontraron que ambas cepas producen anticuerpos frente a distintos determinantes del antígeno. Puesto que ambas cepas poseen idéntico repertorio de regiones V, estos autores postularon que los genes Ir pueden controlar la respuesta a diferentes determinantes antigénicos presentes en la misma molécula. Esto sugería una posible participación de los genes Ir en la selección de las células B específicas.

Existen menos datos acerca del control genético por parte de los genes Ir de la inducción de células T_C . Sin embargo, Gordon y Simpson (172) y von Boehmer y col. (166) han detectado genes Ir en el control de las células T_C específicas para los antígenos del cromosoma Y. En cualquier caso, es prematuro concluir que los genes Ir que controlan la respuesta

de las células T citotóxicas operan de igual manera que los genes Ir que controlan la sensibilidad retardada o las actividades auxiliares o supresoras.

Ante las dificultades para definir la naturaleza química del receptor de las células T para el antígeno, McDevit y Benacerraf propusieron que los productos de los genes Ir, de acuerdo con su especificidad podrían actuar como receptores de los linfocitos T (94). Esta hipótesis ha sido actualmente descartada al demostrarse la presencia de idiotipos de las cadenas pesadas sobre las células T (100-105). En cualquier caso, parece que los productos codificados por la región I de MHC poseen distintas y complejas funciones específicas para el antígeno, relacionadas con la respuesta inmune a antígenos TD.

Experimentos muy recientes (133,173-176) han introducido nuevos aspectos en las interacciones celulares que desempeñan importantes papeles en la regulación del SI. La existencia de células T con actividad anti-idiotipo sugiere la posible regulación de las células B por parte de las células T. De esta manera, podría explicarse la regulación que las células T ejercen en la respuesta a antígenos TI, ya que nunca se han detectado la presencia de células T con especificidad para esta clases de antígenos.

Sin embargo, esta nueva posibilidad de regulación abre nuevas incógnitas en la generación de la diversidad de las células T anti-idiotipo. ¿Poseen especificidad para to dos los idiotipos o solamente para una parte de ellos, some tidas a presiones selectivas durante la ontogenia del SI? Se puede predecir que la gran cantidad de material experimen tal sobre este aspecto permita en un futuro próximo el es- clarecimiento de las actuales incógnitas.

Las consideraciones anteriores muestran que el SI es tá constituido no de clones de células aisladas, sino intere lacionados mediante reconocimiento recíprocos con diferentes grados de complementariedad y especificidad que comprenden la totalidad del SI.

Los diferentes tipos de linfocitos y los distintos anticuerpos por ellos producidos, pueden considerarse como la base de las interacciones entre los distintos componentes del SI. Cada componente participa en la interacción con otros com ponentes bien por su capacidad de reconocer o de ser reconoci- do. En tales reconocimientos mútuos, la complementariedad idio típica desempeña, sin lugar a dudas, un papel esencial.

II. MATERIAL Y METODOS

II.1. MATERIAL PARA CULTIVO CELULAR.

Placas estériles de cultivo-Costar, Cambridge, Mass.
Placas estériles microtiter-3040, Falcon, Oxnard, Ca.
Colector de cultivo múltiple-Skatron (Harvester).
Tubos estériles de cultivo-2003, Falcon, Oxnard, Ca.
Frascos estériles de cultivo-3010, idem.

II.2. REACTIVOS.

RPMI 1640-Gibco, Grand Island, N.Y.
IMDEME-obsequio del Dr. Iscove, Basel Institute for Immunology,
Basel.
Suero bovino fetal (FCS)-Gibco, Grand Island, N.Y.
Albúmina bovina-Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.
ConA-Sepharosa-Pharmacia, Uppsala, Suecia.
Ultrogel ACA 54-LKB, Industrie Biologique Francaise.
Ultradex-LKB
Sephadex G-10-Pharmacia, Uppsala, Suecia.
Percoll-idem.
ConA-idem.
WGA-idem.
DEAE-Dextrano-idem.

Agar noble-Difco Lab., Detroit, Mi.

Proteína A-Pharmacia, Uppsala, Suecia.

Suero de conejo anti-IgM de ratón-obsequio del Dr. A. Coutinho,
Basel Institute for Immunology, Basel.

Complemento-Gibco, Grand Island, N.Y.

Lipopolisacárido (LPS)-obsequio del Dr. A. Coutinho, Basel In-
stitute for Immunology, Basel.

Mitomicina C-Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.

L-Glutamina-Gibco, Grand Island, N.Y.

Antibióticos-idem.

Hepes-idem.

N-Acetyl-D-glucosamina (NAGA)-Fluka AG, Buchs SG, Suiza.

II.3. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

En el presente trabajo se han utilizado los siguientes medios del cultivo:

1) RPMI 1640 suplementado con distintas concentraciones de suero bovino fetal (SFC), glutamina 2mM, 2-ME 5×10^{-5} M, Hepes 10mM, 100U.I. de penicilina y 100µg/ml de streptomina. El medio se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore de 0,45µ.

2) IMDME (Iscove modified, Dulbecco modified Eagles) (177,178) suplementado por litro de medio con 10 ml de antibióticos,

3.024 gr NaHCO_3 , 0,65 ml de α -TG 1%, 2,75 ml de albumina bovina 20%, 0,33 ml de una solución de transferina humana (270 mg de transferrina en 2,79 ml de Dulbecco-Hepes y 0,228 ml de $8,8 \times 10^{-3} \text{M}$ FeCl_3) y 25 ml de una solución de lecitina/colesterol (200 mg lecitina, 60 mg colesterol en 47,5 ml de Dulbecco 1x y 2,5 ml de BSA). El medio se sonicó en hielo por una hora y posteriormente se esterilizó por filtración. Este medio se usa en cultivos realizados en ausencia de FCS.

II.4. ANIMALES.

Se utilizaron ratones de las siguientes cepas singeneicas: C57 Bl/6J normales y atímicos; C3H/Tif normales atímicos y gnotobióticos y Balb/c normales y atímicos.

Todas estas cepas proceden de Bomholtgard, Ry, Denmark o del Institut fur Biologisch-Medizinsche Faschung AG, Fullinsdorf, Suiza. Se usaron ratones de edades inferiores a un año.

Las ratas utilizadas fueron de la cepa Lewis de 1 a 3 meses de edad.

II.5. ANTIGENOS.

Se han utilizado como antígenos hematíes de carnero

(SRBC) o de caballo (HRBC), conservándose en condiciones estériles en solución Alserier con antibióticos hasta su uso. Siempre se utilizaron hematíes del mismo animal previamente seleccionados por su óptima inmunogenicidad.

II.6. PREPARACION DE ANTISUEROS.

II.6.1. In vivo.

Grupos de ratones de la cepa C57Bl/6 se inyectaron con 10^8 SRBC o HRBC previamente lavados tres veces con BSS. La inyección se llevó a cabo por vía intravenosa. Los correspondientes antisueros se obtuvieron a los días 3,4 y 5 de inmunización.

II.6.2. In vitro.

Anticuerpos monoclonales del isotipo IgM, con actividad anti-SRBC, se obtuvieron del sobrenadante de híbrido mas específicos (clon Sp6) producidos mediante fusión celular por el Dr. G. Kohler (Basel Institute for Immunology) y mantenidos in vitro en medio de cultivo.

II.7. PREPARACION DE COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO.

Los complejos SRBC-anti-SRBC y HRBC-anti-HRBC se pre-

pararon incubando dichos hematíes con volúmenes iguales de sus correspondientes antisueros durante 30 minutos en hielo. Después de este tiempo, se lavaron exhaustivamente para eliminar los anticuerpos libres. Los antisueros se sometieron previamente a 56°C durante 30 minutos a fin de inactivar el complemento.

II.8. DETERMINACION DE PROPIEDADES QUIMICAS DE LOS FACTORES SOLUBLES.

II.8.1. Cromatografía de afinidad.

La afinidad por residuos glicosídicos de los factores obtenidos por estimulación con ConA (ConA-TRF) se determinó por cromatografía de afinidad sobre ConA-Sepharosa. Una columna de 5 ml de ConA-Sepharosa se lavó con buffer Tris-HCl 0,05M, pH=7,2, 0,5M NaCl, 10^{-4} M $MnCl_2$ y 10^{-4} M $MgCl_2$ a fin de eluir los preservativos de la columna. A continuación se equilibró con 25 ml de medio de cultivo. 5 ml de TRF (previamente concentrado por ultrafiltración) se aplicaron a la columna, incubándose a 4°C durante 15 minutos. Después de eluir las fracciones de TRF no retenidas en la columna, ésta se eluyó con una solución 0,1M de α -Metil-manóximo en medio de cultivo.

II.8.2. Filtración en gel.

La determinación del peso molecular se llevó a cabo por filtración a través de una columna (100 ml) de Ultrogel ACA 54, previamente equilibrada con Tris 0,1M, pH=8, 0,2M NaCl. Una muestra de 2ml de TRF concentrado 10 veces se aplicó a la columna, siendo posteriormente eluida con el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 3 ml monitorizándose el efluente en una célula LKB Unicord II a 280nm. Las fracciones recogidas se dializaron frente a medio de cultivo, siendo suplementadas con FCS (concentración final de 5%). Todas las operaciones descritas se realizaron a 4°C.

La columna de ACA se calibró con los siguientes patrones de PM conocido: albúmina de huevo (PM 45.000), inhibidor de la tripsina (PM 24.000) y citocromo C (PM 12.400).

II.8.3. Electroenfoque.

Se llevó a cabo en una placa horizontal (LKB 2117 Multiphor), utilizando un rango de pH de 3 a 10 (ampholine LKB) y un soporte de Ultrodex (LKB). La muestra (40 ml), previamente dializada frente a glicina 1% se incluyó en el gel (4 gr) junto con 2% de ampholinas en un volumen final de 100 ml. El electroenfoque se llevó a cabo a 10°C durante 14 horas con un voltaje inicial de 600 voltios (12mA) y final de 1200 V (6mA).

Después de determinar el gradiente de pH, las diferentes fracciones (aproximadamente 30) se eluyeron del gel y se dializaron frente a NH_4HCO_3 0,1M para eliminar las amfólinas y posteriormente frente a RPMI 1640, añadiéndose finalmente FCS hasta una concentración del 5%.

II.9. PREPARACION DE LINFOCITOS.

Se obtuvieron a partir de los siguientes órganos linfoides: bazo, timo, médula ósea, ganglios linfáticos, ganglios mesentéricos y ganglios periféricos y placas de Peyer. Las células se dispersaron en BSS, descartándose el sedimento depositado a 1xg durante 5 minutos. La suspensión celular así obtenida se lavó tres veces con BSS a 4°C y se resuspendieron finalmente en medio de cultivo.

La concentración celular se determinó en un hemocitómetro Neubauer, usándose el colorante vital azul tripan al 0,02% para la determinación de la viabilidad celular.

II.10. SEPARACION DE DISTINTAS POBLACIONES CELULARES.

II.10.1. Linfocitos B.

Se obtuvieron de bazos de ratones atímicos. En al-

gunos experimentos se eliminaron los macrófagos (II.10.3.).

II.10.2. Linfocitos T.

Poblaciones de células T sin una contaminación detectable de células B, se obtuvieron mediante dos filtraciones sucesivas a través de columnas de nylon, según el método descrito por Julius y col. (179). Se prepararon columnas de 20 ml en jeringas de plástico rellenas con fibra de nylon de forma estéril, lavándose con 20 ml de medio RPMI conteniendo 5% de FCS. Después de incubarse las columnas a 37°C durante 45 minutos, se pasaron 20 ml de medio por la columna. Entre 100 y 120 x 10⁶ células de bazo resuspendidas en 1-2 ml de medio, se aplicaron a la columna incubándose durante 45 minutos a 37°C. Las células no adherentes (linfocitos T) se eluyeron con 20 ml de medio y se lavaron dos veces por centrifugación. El mismo proceso se repitió dos veces para conseguir una población purificada de linfocitos T.

II.10.3. Macrófagos.

Los macrófagos se obtuvieron por lavado de la cavidad peritoneal con medio RPMI suplementado con 10 U. de heparina por ml y 5% de FCS. Después de lavar las células dos veces por centrifugación, se descartaron las células que no se

adhieren a placas de plástico después de incubar la preparación anterior dos horas a 37°C.

En aquellos experimentos que requerían ausencia de macrófagos, estos se eliminaron por uno de los siguientes procedimientos: 1) células de bazo de ratones normales o atímicos se pasaron a través de columnas de Sephadex G-10 previamente esterilizado en autoclave (114,180). 10×10^7 células en 2-4 ml de BSS conteniendo 10% de FCS se aplicaron a una columna de 15 ml de Sephadex G-10 previamente lavado con 40 ml del mismo medio, recolectándose las células eluidas con 20-30 ml de dicho medio. El rendimiento osciló entre 50-60% y la eliminación de macrófagos fue superior al 99,5% y 2) 20 ml de una suspensión de células de bazo 5×10^6 células por ml, en medio RPMI suplementado con 1% glutamina y 10% FCS se incubaron con 25 mg de Fe-carbonilo estéril a 37°C durante 40-45 minutos agitando periódicamente. El Fe-carbonilo libre o el fagocitado por los macrófagos se eliminó mediante un imán (181). El proceso se repitió 4-5 veces. Finalmente, las células se lavaron varias veces y se resuspendieron en medio de cultivo. La eliminación de macrófagos conseguido por este método fue superior al 99%.

II.11. SEPARACION DE BLASTOS Y PEQUEÑOS LINFOCITOS.

Se llevó a cabo a partir de células de bazo de rato-

nes normales (que contienen aproximadamente un 1% de blastos B) o de células estimuladas in vitro con LPS (II.24.).

II.11.1. Gradientes de albúmina.

40×10^6 células se depositaron sobre un gradiente continuo entre 0,2 y 2% de BSA en EBSS en una cámara especialmente diseñada (182). Las células se dejaron sedimentar (1xg) durante 3-4 horas a 4°C, recogiendo posteriormente fracciones de 10 ml.

II.11.2. Gradientes de Percoll.

Para obtener una solución isotónica de Percoll, se mezclaron 9 volúmenes de la preparación comercial con un volumen de PBS hipertónico (10x). Esta solución isotónica se considera "Percoll 100%". Las sucesivas diluciones se realizaron con PBS isotónico.

Entre $50-100 \times 10^6$ células (183,184) se resuspendieron en un ml de la primera fracción del gradiente Percoll 100%; sucesivas fracciones de 2 ml conteniendo Percoll 70,60, 40,30, y 20% se depositaron sucesivamente sobre la primera fracción conteniendo las células en tubos Falcon de 15 ml. El gradiente discontinuo se centrifugó a 3000 r.p.m., 10 minutos, recogiendo las células depositadas en cada interfase del gradiente; tras varios lavados con BSS a 4°C, las células se

ajustaron a la concentración requerida.

II.12. CANULACION DEL CONDUCTO TORACICO.

A cada ratón se le administraron 0,2 ml de crema de leche vía oral, 20 minutos antes de la operación, con el objeto de visualizar fácilmente el conducto torácico. Como anestésico, se utilizó 10 gr de tribromometanol disuelto en 10 ml de alcohol amílico, inyectándose cada ratón con 0,01 ml por gramo de peso de una dilución 1:50 de dicho anestésico.

La canulación se llevó a cabo según el método descrito por Sprent (185), introduciendo una cánula en el conducto torácico que permita el libre flujo de linfa. Una vez cerrada la cavidad peritoneal, los animales se mantuvieron durante el período de canulización (18-24 horas) con una perfusión de BSS intravenosa a una velocidad de 0,5-0,75 ml por hora. Las células procedentes de la canulación se van recogiendo a 4°C en RPMI suplementado con 5-10% de FCS y antibióticos.

El número de linfocitos obtenidos en un período de canulación de 18-24 horas oscila entre $2-10 \times 10^7$ células/ratón dependiendo de la edad. Tanto el flujo como el rendimiento en el número de linfocitos obtenidos, aumentó significativamente permitiendo el movimiento de los animales du-

rante el período de canulación, lo que se consigue restringiendo el movimiento del animal sobre unas ruedas verticales en un aparato especialmente diseñado.

II.13. SELECCION NEGATIVA DE CELULAS T.

Células T negativamente seleccionadas para el antígeno se obtuvieron por el método de Sprent (186). Grupos de cuatro ratones se inyectaron con 10^8 SRBC o HRBC (controles sin inyectar). Veinticuatro horas después se procedió a canular el conducto torácico durante 18-24 horas. Los linfocitos obtenidos tanto de los ratones inyectados como de los controles sin inmunizar, se utilizaron posteriormente en cultivo in vitro.

II.14. OBTENCION DE CELULAS T ESPECIFICAS PARA EL ANTIGENO IN VIVO.

Para la obtención de linfocitos T específicamente activados se siguió el método descrito por Hartmann (187). Los animales receptores se irradiaron con 800 Rads y al día siguiente se inyectaron por vía endovenosa con 5×10^7 timocitos procedentes de ratones singeneicos sin o con 10^8 SRBC o HRBC. Seis días después de la inyección se recogieron los bazo, realizándose las correspondientes suspensiones celulares para el posterior cultivo.

II.15. OBTENCION DE FACTORES SOLUBLES IN VITRO.

ConA-TRFs se prepararon incubando 5×10^6 células por ml procedentes de varios órganos de ratón (bazo, conducto torácico, etc.) con 2,5 μ g de ConA durante distintos tiempos (12-72 horas) en presencia de RPMI suplementado con 5% de FCS, utilizándose bien placas de cultivo (1 ml por pocillo) o frascos de cultivo estériles (5-20 ml/frasco) (130). Después de este período de incubación a 37°C en atmósfera de CO₂, los sobrenadantes se recogieron por centrifugación, siendo esterilizados por filtración. La actividad de dichos sobrenadantes se mantiene inalterada después del almacenamiento durante un mes a 4°C o a -20°C.

En idénticas condiciones se produjeron ConA-TRFs utilizando bazo de rata.

Los sobrenadantes resultantes de la estimulación de linfocitos por otras lectinas (WGA) se obtuvieron en iguales condiciones de cultivo. Las concentraciones de WGA utilizadas oscilaron entre 0,5-50 μ g/ml.

II.16. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AUXILIAR DE SOBRENADANTES OBTENIDOS IN VITRO.

Se determinó estudiando la respuesta de células de bazo de ratones atímicos a antígenos TD (SRBC y HRBC), según una

modificación de la técnica descrita por Mishell y Dutton (188), utilizándose medio RPMI 1640 suplementado con FCS en placas microtiter. Se prepararon por triplicado cultivos conteniendo 10^6 células en 0,2 ml de medio y distintas concentraciones de los sobrenadantes obtenidos in vitro, bien por estimulación con ConA o con WGA (ésta última lectina también se añadió directamente al cultivo in vitro). Como antígenos, se utilizaron 10^6 SRBC o HRBC por cultivo. Los cultivos se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a $37^\circ C$ durante 5 días. Durante los tres primeros días, todos los cultivos se alimentaron con 40λ de la mezcla de nutrientes descrita por Dutton (188).

En paralelo, se montaron cultivos con células de bazo de ratones normales en los que se omitió la presencia de sobrenadantes obtenidos in vitro.

II.17. DETERMINACION DEL NUMERO DE AFC.

Se realizó enumerando el número de células formadoras de placas (PFC) siguiendo el método de Coutinho y col. (145).

0,3 ml de bacto-agar al 0,5% en BSS, conteniendo 0,75 mg/ml de DEAE-dextrano, mantenidos a $46^\circ C$, se añadieron a una mezcla de 0,02 de suero de cobaya (fuente de complemento) y 0,02 ml de células indicadoras (SRBC, HRBC, TNP-SRBC, NIP-SRBC

o proteína A-SRBC) diluidas 1:4 en BSS. Entre 10-100 μ l de la suspensión celular (según la concentración), se añadieron a la mezcla anterior, exteniéndose sobre una placa de Petri de plástico (100x90mm). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda durante 3-5 horas, al cabo de las cuales se determinó el número de placas de hemólisis (PFC) utilizando una fuente de luz indirecta.

II.17.1. AFC específicas anti-antígeno.

SRBC y HRBC se utilizaron como células indicadoras una vez lavadas tres veces con BSS y resuspendidas a la dilución 1:4.

TNP₃₀-SRBC se preparó de acuerdo a una modificación del método descrito por Rittenberg y Pratt (189). Treinta mg de ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico se disolvieron en 7 ml de buffer cacodilato 0,28M, pH=7,2. A esta solución se añadió un ml de SRBC previamente lavados una vez con el mismo buffer. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación suave durante 10 minutos. Después de este tiempo los hematíes se centrifugaron (10 minutos, 1800 r.p.m.) después de añadir 40 ml de BSS frío. Posteriormente se lavaron una vez con una solución de glicil-glicina 2 mg/ml en BSS y cuatro veces con BSS.

NIP-SRBC se prepararon según el método de Pasanen y Makela (190). A una suspensión de SRBC (1:5 en buffer bicarbonato 0,12M, pH=9,2) se añadieron 50 μ l de NIP-azida en 5 ml del mismo buffer. Después de 40 minutos de reacción, los hematíes se lavaron cuatro veces con BSS a 4°C.

II.17.2. Determinación del número total de AFC.

Se siguió el método descrito por Gronowicz y col. (191) utilizándose como células indicadoras hematíes de carnero recubiertos con proteína A de Staphilococcus aureus. El método se basa en la capacidad de esta proteína de fijarse al fragmento Fc de la IgG de distintas especies. De esta forma, IgG de estas especies pueden unirse al complejo proteína A-SRBC y usándose antisueros IgG-anti-IgM, anti-IgA o anti-IgG de ratón se pueden detectar las células secretoras de IgM, de IgA o de IgG.

Dos ml de SRBC previamente lavados cuatro veces con solución salina, se añadieron a 20 ml de solución salina conteniendo 0,1 ml de CrCl₃ (0,05M en solución salina) y 2 ml de proteína A (0,5mg/ml en solución salina). Después de 60 minutos de incubación a 30°C, los hematíes se lavaron con solución salina (dos veces) y con BSS (3 veces) a 4°C.

Para determinar el número total de PFC IgM, IgA o

IgG, se añadieron a la mezcla descrita en el apartado II.17. 0,02 ml de suero de conejo anti-IgM, IgA o IgM de ratón diluido 1:60 en BSS.

La determinación del número de PFC se realizó siempre por triplicado y en cada experimento se representan la media aritmética de los valores obtenidos.

II.18. ABSORCION DE LOS FACTORES SOLUBLES INDUCIDOS POR ConA.

II.18.1. Absorción sobre el antígeno.

Se llevó a cabo incubando durante 30 minutos a 4°C, volúmenes iguales de antígeno (SRBC o HIRBC) y de sobrenadante producido por estimulación con ConA. Después de este tiempo, el sobrenadante absorbido se separó por centrifugación.

II.18.2. Absorción sobre complejos antígeno-anticuerpo.

Se utilizaron complejos preparados como se describe en el apartado II.7. Las correspondientes absorciones se llevaron a cabo en idénticas condiciones que las descritas en el apartado anterior.

En experimentos control, se llevaron a cabo las mismas absorciones pero utilizando medio de cultivo en lugar de

ConA-TRF.

II.18.3. Absorción sobre distintos tipos de células.

Los ConA-TRFs también se absorbieron sobre las si guientes células:

- timocitos de ratón y de rata
- células de bazo de ratón
- blastos T producidos por ConA
- blastos B producidos por estimulación con LPS sobre células de ratones normales y atímicos.

En todos los casos, se utilizaron 10^8 - 10^9 células/ml de ConA-TRF y las absorciones se llevaron a cabo durante 30 mi autos a 0°C.

II.19. INHIBICION DE LA SINTESIS DE DNA.

Para estudiar si la producción de ConA-TRF era de pendiente o no de la síntesis de DNA, 5×10^6 células de ba zo/ml se incubaron con distintas concentraciones de mitomicina C (25-200 μ g/ml) a 37°C durante 30 minutos. Las células, posteriormente, se lavaron en BSS y resuspendieron en medio de cultivo .

II.20. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD AUXILIAR DEPENDIENTE DE WGA.

Se llevó a cabo utilizando distintas concentraciones de N-acetil-glucosamina (NAGA) (192). La concentración óptima no tóxica en una serie de experimentos resultó ser de un 1%.

II.21. PRODUCCION DE SOBRENADANTES DE WGA A PARTIR DE LINEAS DE MACROFAGOS CULTIVADAS IN VITRO.

Se utilizaron varias líneas de macrófagos (A-3, Row8 y 2-2) cedidas por la Dra. Larsson (Basel Institute for Immunology) así como macrófagos obtenidos a partir de exudados peritoneales. Concentraciones entre 1 y 5×10^6 células por ml se incubaron con $5 \mu\text{g/ml}$ de WGA durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron por centrifugación y se esterilizaron por filtración.

II.22. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE CELULAS T IN VITRO.

El crecimiento de linfocitos T in vitro durante largo tiempo, ha sido posible mediante la adición al cultivo de factores (TGF) contenidos en sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados por mitógenos (ConA) en idénticas condiciones a los de producción de los ConA-TRFs (117).

Células de bazo de ratón, o linfocitos T previamente

aislados mediante columnas de nylon (II.10.2.) se cultivaron in vitro (5×10^6 células/ml) en presencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de ConA durante 6-12 horas. Al final de este tiempo se eliminó el mitógeno por varios lavados con BSS y las células así estimuladas se resuspendieron a una concentración de 5×10^4 células/ml en medio de cultivo suplementado con 40-70% de sobrenadantes de ConA.

Los cultivos se prepararon en frascos de cultivo y el crecimiento celular se controló diariamente por observación microscópica. Aproximadamente cada tres días se hicieron subcultivos a la concentración celular inicial de 5×10^4 células/ml.

En estas condiciones de cultivo, se seleccionan específicamente linfocitos T, de forma que a los 15-20 días de la iniciación del cultivo, más de un 95% de las células son blastos T.

II.23. ACTIVACION DE CELULAS T POR FACTORES INDUCIDOS POR ConA.

Para estudiar la actividad que los sobrenadantes obtenidos por estimulación con ConA tienen sobre el crecimiento in vitro de linfocitos T (actividad TGF), se determinó la



proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina.

5×10^4 blastos T/ml se cultivaron por triplicado en placas microtiter (0,2 ml/cultivo) en medio suplementado con 10% de FCS y 70% de factores inducidos por ConA. Tres horas antes del final de los cultivos (1,2 ó 3 días) se añadieron $5\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina determinándose la cantidad de radioactividad por cultivo. Para ello, las células se recogieron en filtros de 25mm^2 (Whatman) utilizando un colector múltiple de cultivos (Skatron). Los filtros se dejaron secar a 40°C y se transfirieron a viales apropiados y se contaron en un espectrómetro de centilleo líquido (Intertechnique SL-300).

II.24. ESTIMULACION POR LPS.

La obtención de blastos B por estimulación in vitro con LPS se realizó incubando 5×10^5 células/ml con $50 \mu\text{g/ml}$ de LPS en frascos de cultivo estériles (20 ml durante 24-48 horas). Al final de dicho período, las células se lavaron por centrifugación varias veces para eliminar el mitógeno y se resuspendieron en medio de cultivo.

II.25. CALCULO DE FRECUENCIA DE PRECURSORES.

El cálculo de la frecuencia de precursores específi-

cos para distintos antígenos (SRBC,HRBC,TNP-SRBC y NIP-SRBC) tanto en animales no inmunizados como en gnotobióticos, se determinó por la relación entre el número de PFC IgM (independientes de la especificidad) y el número de PFC específicas para cada antígeno (60).

Los experimentos descritos en el presente trabajo se repitieron un mínimo de 4 veces, empleándose triplicados en cada determinación. En cada tabla o figura se representa la media aritmética de uno o varios experimentos representativos.

III. RESULTADOS

III.1. CARACTERIZACION DEL SISTEMA EXPERIMENTAL.

La respuesta in vitro de células de bazo de ratones atímicos (C57Bl/6j nude) a antígenos TD (SRBC y HRBC) puede reestablecerse mediante la adición al cultivo de factores que reemplazan a las células T (TRF) (132).

En el presente trabajo, los TRF se obtuvieron por estimulación in vitro con ConA (ConA-TRF's) de distintas poblaciones celulares. La actividad auxiliar de dichos factores se ha determinado en cultivos in vitro de alta densidad celular (Mishell-Dutton) en presencia de antígeno y de distintas concentraciones de ConA-TRF's.

Según se muestra en la tabla 1, los ConA-TRF sustituyen a las células T en la respuesta in vitro a ambos antígenos SRBC y HRBC. La respuesta se midió por el número de PFC específicas de cada antígeno en el día 5 de cultivo. La especificidad de la respuesta viene determinada por la presencia del antígeno en el medio de cultivo. La actividad auxiliar de los factores inducidos por ConA depende de la concentración de factor utilizado en el cultivo, observándose que el máximo de eficiencia en la respuesta antígeno-es-

TABLA 1

CARACTERISTICAS DE LA ACTIVIDAD AUXILIAR MEDIADA POR ConA-TRF

ANTIGENO EN CULTIVO in vitro	CONCENTRACION ConA-TRF en cultivo (%)	PFC/CULTIVO	
		anti-SRBC	anti-HRBC
—	—	120	46
SRBC	—	220	—
HRBC	—	—	60
—	30	180	80
SRBC	30	3430	—
HRBC	30	—	840
—	60	346	113
SRBC	60	7026	—
HRBC	60	—	1540
—	90	500	160
SRBC	90	9086	85
HRBC	90	482	2300

10^6 células de bazo de ratones atímicos C57Bl/6J se cultivaron durante 5 días en presencia de antígeno y distintas concentraciones de TRF.

pecífica se obtiene utilizando un 90% de TRF en los cultivos. Esta concentración óptima es la utilizada en los cultivos, salvo en las excepciones que se indican.

Según el método de dilución límite, la frecuencia de precursores específicos para SRBC es de uno por cada 2000 linfocitos B (145,146); por lo tanto 10^6 células presentes en el cultivo deberán de contener aproximadamente 500 precursores para SRBC. En condiciones de máxima eficiencia, con un tiempo de división celular de 18 horas (193) y máxima tasa de maduración a células secretoras de anticuerpos, el número de PFC específicas por cultivo debería ser de 12.000 al cabo de 4,5 días de cultivo. Como puede observarse en los distintos experimentos, éste fue el número de PFC que normalmente se obtuvieron en los cultivos (tabla 1).

III.2. PRODUCCION IN VITRO DE TRF EN CULTIVOS ESTIMULADOS POR ConA.

III.2.1. Cinética.

Dado que la producción del factor se induce por estimulación con ConA y este mitógeno activa distintas subpoblaciones de células T (auxiliares y supresoras) (113), es necesario conseguir las condiciones óptimas de producción

del factor, ya que tanto aumentando la dosis de ConA como el tiempo de estimulación aumenta el número de células supresoras activadas por dicho mitógeno (y por tanto, de factores supresores en el sobrenadante de cultivo in vitro).

Por este motivo, se obtuvieron factores variando el tiempo de exposición al mitógeno ConA (2,5 µg/ml) desde 12-72 horas. Como puede observarse en la figura 1, el máximo de actividad auxiliar se encuentra en los sobrenadantes recogidos a las 24 horas de estimulación por ConA, disminuyendo progresivamente según aumenta el tiempo de estimulación. A las 72 horas, la actividad auxiliar está por debajo de los valores control (en ausencia de TRF), lo que de alguna forma sugiere la presencia en el cultivo de factores supresores estimulados por ConA a tiempos más largos que los factores auxiliares.

En todos los experimentos posteriores, se utilizaron factores producidos a las 24 horas de estimulación.

III.2.2. Estudio de la influencia de distintas concentraciones de FCS.

El cultivo in vitro de linfocitos, requiere la presencia de suero bovino fetal a fin de mantener el crecimiento y el desarrollo a células formadoras de anticuerpos (AFC).

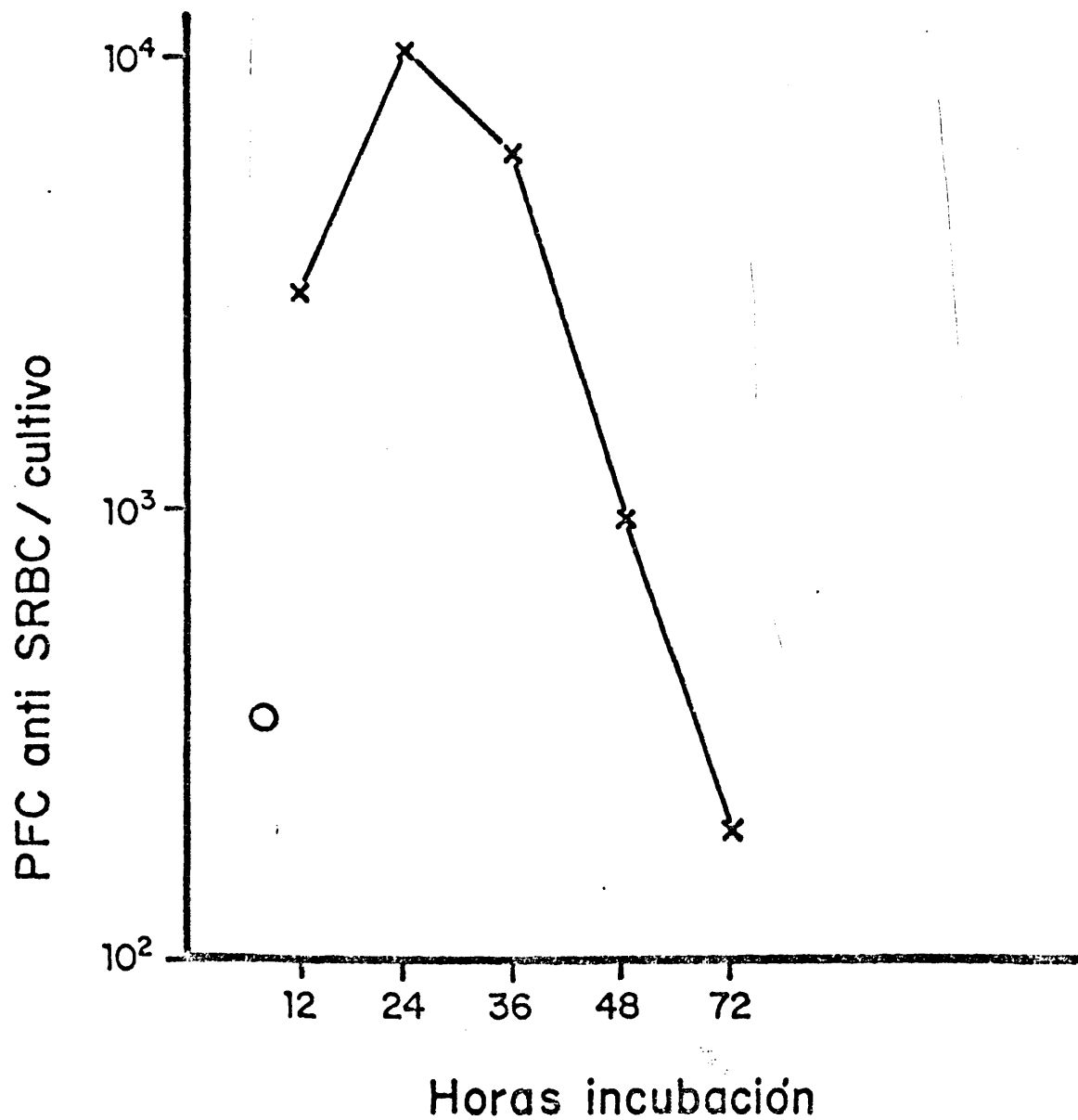


Figura 1. 5×10^6 células de bazo de ratones normales se estimularon con $2,5 \mu\text{g/ml}$ de ConA durante los tiempos indicados. La actividad auxiliar de los sobrenadantes se determinó en cultivos de células de ratones atímicos en presencia de antígeno (SRBC). Se incluye un control de medio de cultivo sin suplementar con TRF (o).

Siendo la producción de TRF consecuencia de la activación celular, su preparación se lleva a cabo en presencia de de terminadas concentraciones de FCS (5%). En el presente trabajo, hemos estudiado la producción de TRF en presencia de distintas concentraciones de FCS (0,10%). Igualmente, estudiamos la producción de TRF sustituyendo el medio RPMI por IMDME (177,178) que permite establecer cultivos celulares in vitro en ausencia de FCS, debido a la composición controlada de sus componentes. Como puede verse en la tabla 2, la actividad del factor queda reducida a un 25% en ausencia total de FCS o en medio IMDME, mientras que reaparece en presencia de pequeñas concentraciones de FCS. Así, utilizando concentraciones de 1% de FCS, la actividad obtenida es casi del 100% respecto a la actividad del TRF preparado en condiciones standar (5% de FCS). No se encuentra ningún aumento significativo elevando esta concentración hasta el 10%. Por ello, en los siguientes experimentos, se utilizarán TRF producidos en presencia del 50% de FCS, salvo en determinados momentos de su purificación química que exijan la ausencia de proteínas presentes en el FCS.

III.2.3. Influencia del tratamiento previo con mitomicina C en la producción del TRF.

La estimulación mitogénica de linfocitos normales in

TABLA 2

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE FCS SOBRE LA ACTIVIDAD AUXILIAR
DE ConA-TRF.

<u>ConA-TRF PRODUCIDO</u> <u>EN PRESENCIA DE :</u>	<u>PFC / CULTIVO</u> <u>anti - SRBC</u>
sin TRF	540
0% FCS	2193
0,1% FCS	7040
1% FCS	9386
10% FCS	10400
IMDME	2300

5×10^6 células de bazo de ratón se estimularon con 2,5 μ g de ConA en presencia de distintas concentraciones de FCS (medio RPMI) o en medio IMDME (en ausencia de FCS). La actividad auxiliar de los sobrenadantes se determinó según se describe en II.16.

duce en estos la síntesis de DNA, parámetro que se utiliza para determinar el grado de mitogenicidad de estos compuestos. Así pues, es de esperar que durante la producción de TRF por estimulación mitogénica, se induzca síntesis de DNA. Dichos TRFs podrían bien ser una consecuencia de dicha síntesis de DNA (y posterior síntesis de proteínas) o bien no requerir el primer proceso de síntesis de DNA (aunque sí, el de proteínas). Para estudiar esta posibilidad, se incubaron células de bazo de ratón con distintas concentraciones de mitomicina C (25,50,100,200 $\mu\text{g/ml}$) previo a la estimulación con ConA para la producción de los ConA-TRFs.

Como puede observarse en la tabla 3, la producción de los factores no resulta afectada por la incubación con dosis de mitomicina C que inhiben la síntesis de DNA. Puede observarse que con 100 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C, la actividad auxiliar de los sobrenadantes es igual o incluso superior a la del control. Sin embargo, dicha actividad desaparece por incubación con 200 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C, posiblemente por inhibición de la síntesis de proteína. La posibilidad de que a estas altas dosis la droga resultase tóxica para las células provocando su muerte o la liberación de sustancias inhibitoras, quedó descartada con experimentos en los que la actividad auxiliar provenía de una mezcla de TRFs normales y de aquéllos producidos tras incubación con mitomicina C. Así, puede observarse que la acti-

vidad de los TRFs normales no es inhibida en absoluto, por la presencia de factores inhibidores producidos al incubar las células con altas concentraciones de mitomicina C.

El hecho de que no se requiera síntesis de DNA para la producción de los ConA TRFs y la diversidad de agentes que inducen la producción del factor (estimulación alogenica, PHA, ConA, etc.), hablan en favor de que éste es un constituyente habitual de la célula. La activación mitogénica sería solamente requerida para aumentar su tasa de producción.

III.3. CELULA RESPONSABLE DE LA PRODUCCION DE TRF.

Dado que habitualmente los TRFs se producen por estimulación por ConA (130) de células de bazo de ratones normales, donde están representadas distintas poblaciones celulares (células T, células B y macrófagos), se estudió en primer lugar cual o cuales eran las células responsables de su producción.

III.3.1. Producción de TRFs en ausencia de células T.

En la figura 2, se muestra que células de bazo de ratones atímicos estimuladas en iguales condiciones con ConA, no producen ninguna actividad auxiliar, lo que indica la de-

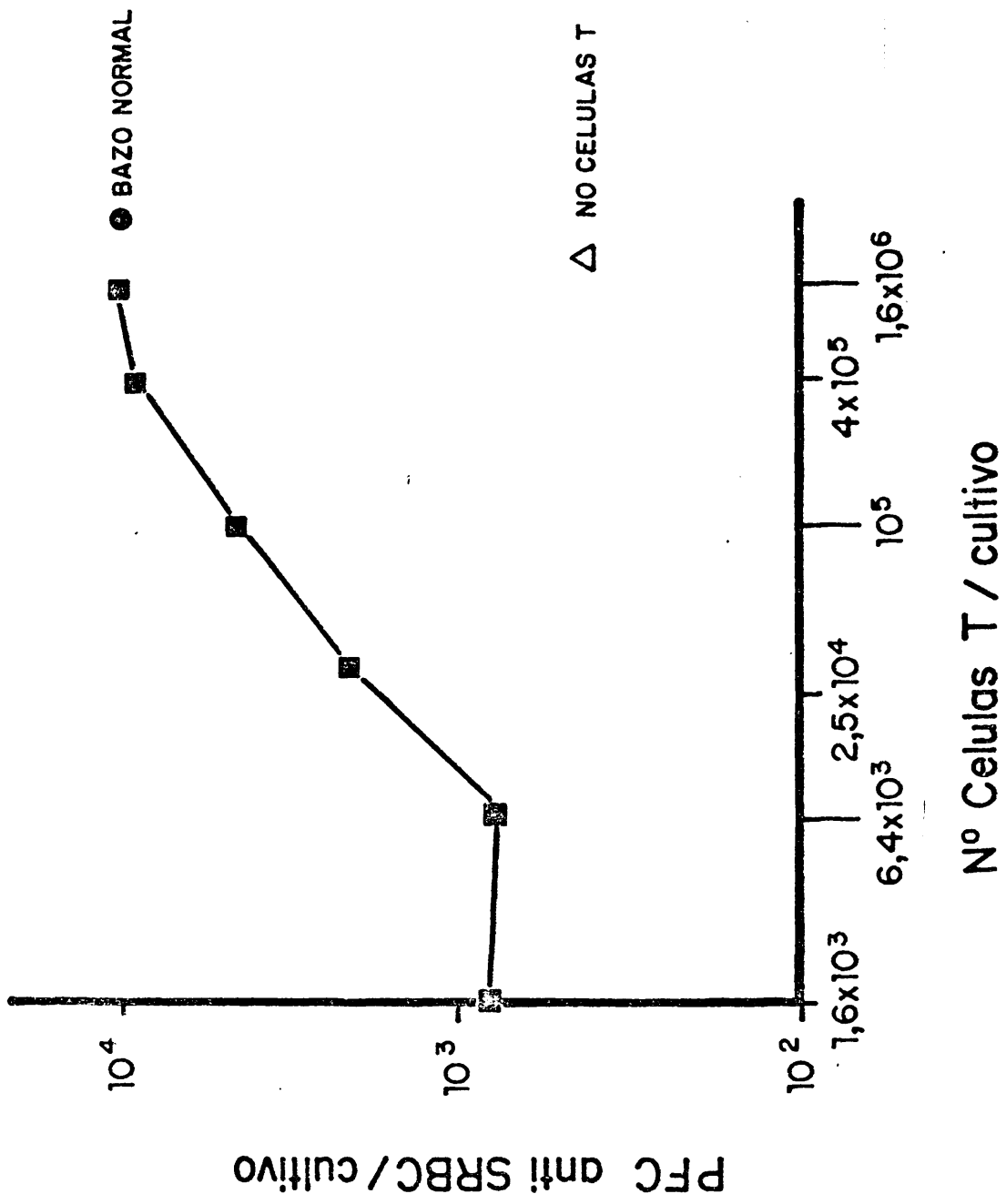


Figura 2. Producción de TRF por células de bazo de ratones atímicos en función del número de células T de bazo de ratones normales añadidas al cultivo.

pendencia de células T en la producción de los TRFs. Puede igualmente observarse que dicha actividad queda restaurada al añadir linfocitos T al cultivo. La actividad producida es dependiente de la concentración de células T presentes en el mismo. La adición de $1,6 \times 10^6$ células T por cultivo indujo igual actividad auxiliar que la producida por células de bazo de ratones normales.

Estos datos indican que son las células T reactivas a ConA las responsables de la producción de TRF. Sin embargo, es importante considerar que estas células representan sólo un 20% del número total de células T en el bazo (111). Por otra parte, parece claramente establecido que la activación de linfocitos T por ConA al igual que otros procesos de inducción de células T y B requiere la presencia de otras células accesorias (114,138).

III.3.2. Producción de los TRFs en ausencia de macrófagos.

La utilización de columnas de Sephadex G-10 se ha utilizado tanto en ratón como en el hombre para la eliminación de macrófagos a partir de distintas poblaciones celulares (114,180). Aunque con este método se llega a eliminar prácticamente el 100% de los macrófagos presentes, también va

acompañado de una pequeña eliminación inespecífica de otras poblaciones de linfocitos (114).

Aplicando este método a las células de bazo previamente a su estimulación con ConA y comparando la actividad auxiliar de los correspondientes factores en el posterior cultivo in vitro, pudo demostrarse que la ausencia total de macrófagos no afecta significativamente la producción de dichos TRFs (tabla 4a).

Dado que por este método se consigue una ausencia total de macrófagos, las diferencias encontradas podrían explicarse mejor por la pérdida inespecífica de otras poblaciones celulares, incluyendo algunas células Y reactivas a ConA, que por la participación de los macrófagos en la producción de los ConA-TRFs.

En la tabla 4b se incluyen igualmente resultados de experimentos en los que se demuestra la ausencia de macrófagos en la población celular eluida de la columna del Sephadex G-10. Para ello, se estimularon células de bazo de ratones normales (C57Bl/6J) con SRBC en cultivo a alta densidad (Mishell-Dutton) antes y después del tratamiento con Sephadex G-10. La ausencia de macrófagos (necesarios en la respuesta in vitro a antígenos TD) reduce la respuesta anti-SRBC a valores control (en ausencia de antígeno). Asimismo,

TABLA 4

a. ACTIVIDAD AUXILIAR DE ConA-TRFs PRODUCIDOS EN AUSENCIA DE MACROFAGOS.

Células de ratones atímicos suplementadas con:	PFC anti-SRBC/cultivo
---	-----------------------

—	220
TRF de células normales	8480
TRF de células filtradas por Sephadex G-10	6946

b. INFLUENCIA DE LA ELIMINACION DE MACROFAGOS POR FILTRACION EN SEPHADEX G-10 EN LA RESPUESTA A SRBC.

	Adición de macrófagos peritoneales (%)	PFC anti-SRBC/ cultivo
Células normales	—	13.773
Células filtradas por Sephadex G-10	—	146
"	0,1	2453
"	1	3926
"	10	9373

puede comprobarse que esta respuesta alcanza de nuevo los valores iniciales al añadir al cultivo diferentes concentraciones de macrófagos obtenidos a partir del exudado peritoneal de ratones normales (tabla 4b).

III.3.3. Producción de los TRFs en ausencia de células B.

La propiedad de las células B (y de los macrófagos) de adherirse a fibras de nylon (179), permite el aislamiento de poblaciones de células T sin aparente contaminación de linfocitos B.

En la tabla 5 se muestra la actividad auxiliar de ConA-TRF producido por estimulación de células de bazo pasadas por una columna de nylon. Como puede observarse, la actividad auxiliar ha disminuido casi en un 90% al producirse en condiciones de ausencia de células B.

III.3.4. Requerimiento de células accesorias en la producción de ConA-TRF.

Para demostrar si las células T pueden producir TRFs al estimularse por ConA sin la ayuda de ninguna otra célula accesoria, comparamos la actividad auxiliar de sobrenadantes obtenidos por estimulación de linfocitos T purificados por fibra de nylon, así como la de células T suplementadas con

TABLA 5

ACTIVIDAD AUXILIAR DE ConA-TRFs PRODUCIDAS EN AUSENCIA DE
CELULAS B.

<u>Células de ratones atímicos suplementadas con:</u>	<u>PFC anti-SRBC / cultivo</u>
—	340
TRF de células normales	12500
TRF de células filtradas por nylon	2200

10^7 células de bazo de ratones normales se filtraron por una columna de nylon a fin de obtener una población purificada de células T (98%). La actividad de los ConA-TRF producidos por esta población celular se determinó posteriormente en presencia del antígeno (SRBC).

células B o con macrófagos. Las células B se obtuvieron a partir de células de bazo de ratones atímicos en las que se eliminaron los macrófagos mediante Fe-carbonilo. Los macrófagos se purificaron a partir de células de exudado peritoneal descartando las células no adherentes al plástico.

En la tabla 6, se muestran los resultados de tales experimentos. Se comprueba que la población de células T purificadas por nylon producen mucha menos actividad TRF que la población original. La adición de macrófagos a dicha población de células T no aumenta significativamente la capacidad de producir dichos ConA-TRFs. Sin embargo, la adición de células B purificadas, reestablece hasta valores normales la actividad auxiliar de los sobrenadantes recogidos del cultivo in vitro.

El papel de estas células B y del factor que en su presencia se produce, se volverá a discutir más adelante por su significado en las absorciones específicas de dicho factor.

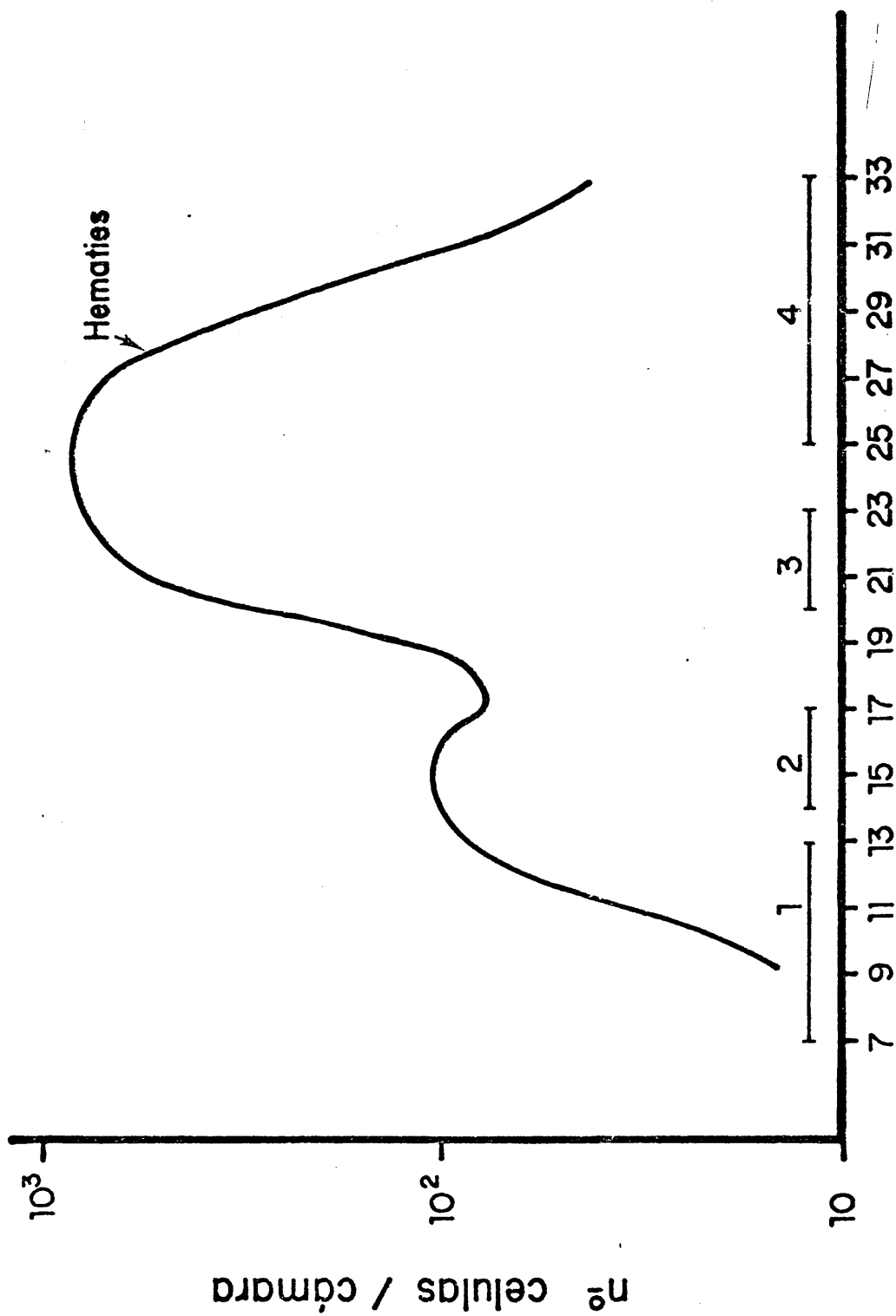
Como ya quedó demostrado en los experimentos representados en la figura 2, la presencia de células T es necesaria para la producción de TRF; sin embargo, no parece suficiente en cuanto que en ausencia de células B la producción de TRF se reduce significativamente.

TABLA 6

INFLUENCIA DE CELULAS AUXILIARES EN LA ACTIVIDAD AUXILIAR
DE ConA-TRFs.

ConA-TRF Producido por células T suplementadas con:	PFC anti-SRBC / cultivo
—	1966
Células B de bazo	11839
Células peritoneales (macrófagos)	2699

10^6 células T purificadas en columnas de nylon (2 veces) se cultivaron in vitro con 2,5 μ g de ConA en 1 ml de medio. En los casos indicados se adicionaron al cultivo 10^6 células B (procedentes de bazo de ratones atómicos tratados con Fe-carbonilo) o 5×10^4 macrófagos peritoneales (después de eliminar las células no adherentes).



Fracciones

Figura 3. Perfil de sedimentación 1xg durante 4 horas de células de bazo de ratones normales en gradiente continuo de albúmina bovina (0,2-2%). Fracciones de 10 ml se recogieron del fondo del recipiente. Las fracciones más densas corresponden a la izquierda de la figura.

III.3.5. Producción de ConA-TRF por distintas poblaciones celulares separadas en gradientes de albúmina.

Las células de bazo de ratón pueden separarse en distintas subpoblaciones según su sedimentación (1xg) en gradientes continuos de densidad (182). La migración en dichos gradientes viene determinada por su densidad, así, linfocitos en estado de blastos sedimentan a una velocidad de aproximadamente 6-8 mm/hora mientras que los pequeños linfocitos lo hacen a aproximadamente 3 mm/hora.

En la figura 3 se muestra el perfil de sedimentación de células de bazo de ratones normales (C57Bl/6J) sometidos a este tipo de gradientes. Según se indica en la figura 3, se obtienen dos subpoblaciones separadas que se recogieron en cuatro fracciones distintas. Tanto por observación directa al microscopio como por el número de AFC determinadas en cada fracción, se demostró (datos no indicados en la figura) que la primera fracción corresponde a blastos productores de anticuerpos. Esta fracción corresponde a la región de mayor densidad en el gradiente. Tanto el tamaño celular como el número de AFC disminuyeron al recoger fracciones de menor densidad en el gradiente, donde aparecen junto con hematíes, linfocitos pequeños no secretores de IgS.

Las subpoblaciones celulares así obtenidas (1-4 de la

figura 3) se estimularon con ConA para la producción de TRF, estudiándose posteriormente la actividad auxiliar de los distintos factores obtenidos. Esto permitiría determinar qué tipo de células (blastos o pequeños linfocitos) están implicados en la producción de los ConA-TRFs.

En la tabla 7 aparece el número de PFC anti-SRBC in ducidos en bazo de ratones atímicos por los TRFs producidos por las distintas subpoblaciones celulares. Se incluyen en esta tabla la actividad de los factores producidos al activar con ConA la población inicial de células no pasadas por el gradiente. Puede así comprobarse que los ConA-TRFs producidos por las fracciones 1 y 2 presentan actividad auxiliar muy pequeña en comparación con la actividad de la población original, mientras que dicha actividad de los TRFs producidos por la fracción 3 es muy similar a la de la población original e incluso aumenta ligeramente con las obtenidas de la población celular de la fracción 4.

Estos resultados indican, por una parte que las células productoras de TRF son linfocitos pequeños (la mayor parte de las células T de bazo pertenecen a este tipo de células). Por otro lado, el aumento de actividad auxiliar en los TRFs de la fracción 4 podrían indicar la ausencia en esta fracción de otros tipos de células presentes en la población inicial

TABLA 7

ACTIVIDAD AUXILIAR DE ConA-TRFs PRODUCIDOS POR DISTINTAS FRACCIONES DE LINFOCITOS DESPUES DE SEDIMENTACION (1xg).

Procedencia de las células productoras de ConA - TRFs (5 x 10 ⁶ células/ml)	PFC anti-SRBC / cultivo	
	Exp. 1	Exp. 2
bazo normal	9546	13439
Fracción 1	1680	2010
Fracción 2	7906	—
Fracción 3	9413	12500
Fracción, 4	10280	13466
Fracción 1 + 3	7413	—

4 x 10⁷ células se sedimentaron a 1xg en un gradiente continuo de albúmina bovina. Las fracciones recogidas se utilizaron para la producción de TRF.

con alguna actividad supresora.

III.3.6. Producción de TRF por distintas poblaciones celulares separadas mediante gradientes de Percoll.

La población celular de bazo de ratones C57Bl/6J se sometió a centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll (entre 100% y 20%) recogiendo las células depositadas en las distintas interfases de gradiente (183,184). Igual que en el apartado III.3.5., la composición celular de cada interfase se determinó tanto por su observación al microscopio como por evaluación del número de AFC de cada fracción. Pudo así comprobarse que las células recogidas en las interfases correspondientes al 20-30% y 30-40% de Percoll contienen fundamentalmente blastos (pureza mayor del 95%) mientras que las células presentes en las interfases entre fracciones de mayor densidad, corresponden a linfocitos pequeños que no contienen AFC.

Todas las poblaciones celulares así recogidas, se estimularon con ConA en condiciones normales, determinándose la actividad auxiliar de los correspondientes sobrenadantes mediante cultivos in vitro en presencia de antígeno (SRBC) y evaluando el número de PFC anti-SRBC a los cinco días de cultivo. Comparando con la población inicial, puede observarse

que la actividad auxiliar inicial se recupera casi en un 100% en los sobrenadantes recogidos por estimulación de las fracciones del gradiente de mayor densidad (tabla 8), que corresponden a linfocitos pequeños. Estos resultados concuerdan con los obtenidos utilizando gradientes de albúmina (III.3.5.).

III.4. ACTIVIDAD POLICLONAL DE LOS ConA-TRFs.

Los TRFs han sido tradicionalmente considerados como inespecíficos (130,132) bien porque la especificidad de las reacciones en que se producen (estimulación alogénica o mitogénica) no guarda ninguna relación con la especificidad de la respuesta en la que colaboran o bien, debido a su actividad auxiliar en la respuesta a distintos antígenos. Estas mismas conclusiones podrían derivarse de los experimentos presentados en la tabla 1 en la que el mismo factor presenta actividad auxiliar para los dos antígenos utilizados (SRBC y HRBC). Sin embargo, puede considerarse otra hipótesis alternativa: los TRFs podrían ser una mezcla policlonal de distintos factores específicos, producidos por la estimulación policlonal de las células T, en los que los receptores antigénicos aparecen clonalmente distribuidos (194). La forma de clarificar si se trataba de un factor inespecífico o de una mezcla de factores específicos, sería produ-

TABLA 8

ACTIVIDAD AUXILIAR DE ConA-TRFs PRODUCIDOS POR DISTINTAS SUB-
POBLACIONES DE LINFOCITOS SEPARADAS EN GRADIENTES DE PERCOLL.

Procedencia de las células productoras de ConA-TRFs (5 x 10 ⁶ células / ml)	PFC anti-SRBC / cultivo
---	-------------------------

bazo normal	12013
interfase 20-30%	340
interfase 30-40%	800
interfase 40-50%	6500
interfase 50-60%	10813
interfase 60-70%	9653

8 x 10⁷ células de bazo de ratones normales se centrifugaron en un gradiente discontinuo de Percoll. Las células recogidas de cada interfase se estimularon con ConA para la obtención de los correspondientes TRFs.

cir ConA-TRFs a partir de poblaciones de linfocitos positiva o negativamente seleccionadas para células específicas de cualquiera de los antígenos utilizados. En este tipo de experimentos, estudiaremos como influye la selección de linfocitos específicos para un antígeno en la actividad auxiliar para otro antígeno.

III.4.1. Selección positiva de células T específicas para el antígeno.

Se siguió el método de Hartman (187), inyectando timocitos con o sin antígeno en un receptor singeneico irradiado y recogiendo los bazo 5-7 días después de la reconstitución. Así pudieron obtenerse TRFs producidos por células T específicas para SRBC (TRF-SRBC) o específicas para HRBC (TRF-HRBC). La actividad auxiliar de estos TRFs se determinó midiendo la respuesta de células de bazo de ratones atímicos a ambos antígenos. En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos en uno de estos experimentos. Los timocitos inyectados sin antígeno, que permanecen en el bazo del animal receptor después de 6 días, produjeron una actividad auxiliar muy pequeña tras su estimulación con ConA. Sin embargo, los timocitos que se inyectaron con el antígeno, muestran una respuesta normal en cuanto a su intensidad, pero esta respuesta es totalmente específica para el antígeno.

TABLA 9



ACTIVIDAD AUXILIAR DE ConA-TRFs PREPARADOS A PARTIR DE CELULAS
T ACTIVADAS IN VIVO PARA EL ANTIGENO.

ConA-TRF preparado con células de bazo de receptores de:	PFC / cultivo	
	anti-SRBC	anti-HRBC
timocitos	740	340
timocitos + SRBC	6833	760
timocitos + HRBC	860	3500
no TRF	220	40

5×10^7 timocitos de ratón se inyectaron en receptores irradiados con o sin los antígenos indicados. A los seis días, los bazos de estos animales se utilizaron para la producción de ConA-TRF.

no con el cual se inmunizaron dichos timocitos, mientras que la actividad auxiliar para el otro antígeno es prácticamente igual a la del control (timocitos inyectados en el receptor en ausencia de antígeno).

Al inyectar timocitos junto con el antígeno, en un animal irradiado se generan células T específicamente dirigidos hacia dicho antígeno, que al ser estimulados por ConA, producen un TRF que es mayoritariamente específico para dicho antígeno, resultados que apoyan la hipótesis de que los TRFs son una mezcla de distintos factores específicos.

III.4.2. Selección negativa de células T específicas para el antígeno.

Resultados muy similares a los expresados en el apartado anterior, se obtuvieron al estudiar la actividad auxiliar de TRFs producidos por poblaciones celulares que no contienen células T específicas para un determinado antígeno. Para eliminar específicamente linfocitos T específicos para SRBC o HRBC, se utilizó el método de Sprent (186), quien demostró que después de la inyección de un antígeno *in vivo*, las células T específicas abandonan la circulación linfática durante 24-48 horas. Durante esta etapa de selección negativa, estas células son secuestradas en determinadas regiones de los órganos linfoides secundarios donde se concentra el an-

tígeno, experimentando proliferación y diferenciación antes de aparecer de nuevo en la circulación a los 4-5 días después de la inyección de antígeno. Así, pues, la población celular que se recoge por canulación del conducto torácico a las 24 horas de inmunización, está constituida en un 97% por linfocitos T no específicos para el antígeno inyectado (lo que puede demostrarse inyectando estas células junto con linfocitos B y el antígeno en un receptor irradiado y determinando el número de AFC con especificidad para dicho antígeno).

En el presente trabajo utilizamos para producir TRF linfocitos procedentes del conducto torácico (TDL) de animales inyectados 24 horas antes con SRBC (TDL-SRBC) o con HRBC (TDL-HRBC). Los resultados que se muestran en la tabla 10 indican una reducción específica en la actividad auxiliar de los ConA-TRFs obtenidos con células seleccionadas negativamente para el antígeno. Así, TDL-HRBC no son capaces de producir ConA-TRF con actividad auxiliar en la respuesta a HRBC, mientras mantienen la capacidad de producir TRFs que son activos en la respuesta a SRBC. Por el contrario, la selección negativa para el antígeno SRBC produce unos TDL-SRBC con capacidad escasa para producir TRFs específicos para SRBC sin que se altere la actividad auxiliar para HRBC.

TABLA 10

ACTIVIDAD AUXILIAR DE ConA-TRFs PREPARADOS CON LINFOCITOS DEL
CONDUCTO TORACICO (TDL) NORMALES O SELECCIONADOS NEGATIVAMENTE

Origen de ConA-TRFs	PFC / cultivo	
	anti-SRBC	anti-HRBC
TDL normal	6626	2160
TDL (-SRBC)	2133	2040
TDL (-HRBC)	5000	306
No TRF	540	110

Las células recogidas durante 24 horas de canulación del conducto toracico de ratones normales o inyectados con el antígeno, se emplearon para la producción de ConA-TRFs.

III.5. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ConA-TRFs.

Los experimentos anteriormente descritos, indicaban que los ConA-TRFs podían estar constituidos por una mezcla de distintos factores específicos. Esta hipótesis puede demostrarse más directamente estudiando la absorción sobre el antígeno de la actividad auxiliar de los ConA-TRFs preparados a partir de células de bazo de ratones normales. Sin embargo, en distintos experimentos, no se obtuvo ninguna indicación positiva de que la actividad auxiliar de los TRFs pudiera absorberse con el antígeno, SRBC o HRBC (tabla 11). Si bien en algunos experimentos se observó una pequeña reducción en la actividad de los sobrenadantes, ésta no pudo ser reproducida en la mayoría de los casos, incluso en otros experimentos, se obtuvo un aumento de la actividad después de la absorción con el antígeno. Sin embargo, la imposibilidad de absorber los ConA-TRFs con el antígeno, no debería necesariamente implicar una falta de especificidad por el mismo.

Han sido descritas varias observaciones que podrían esclarecer el problema, por ejemplo la existencia de células T auxiliares idiotípico específicas (195). Recientes experimentos de distintos laboratorios han sugerido que las células T auxiliares convencionales producidas por inmuniza

ABSORCIÓN DE LA ACTIVIDAD AUXILIAR DE LOS ConA-TRFs SOBRE COMPLEJOS

ANTIGENO-ANTICUERPO

P F C / c u l t i v o

ConA-TRF	Absorción sobre	anti - SRBC					anti - HRBC	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 1	Exp. 2
—	—	82	70	110	180	220	55	40
+	—	2212	3877	2460	5500	9086	1104	2286
+	SRBC	2252	2853	—	—	—	780	—
+	SRBC anti-SRBC	534	1260	420	900	1900	961	—
+	HRBC	2322	2917	—	—	—	634	—
+	HRBC anti-HRBC	2300	3373	—	—	—	272	540

ConA-TRFs obtenidos en la forma habitual se absorbieron sobre antígeno o sobre complejos antígeno-anticuerpo, ensayándose a continuación su actividad auxiliar en células de bazo de ratones atímicos. Se emplearon distintas preparaciones de TRF en cada experimento. En la preparación de los complejos antígeno-anticuerpo, se emplearon 3 lotes distintos de antisueros anti-SRBC (Exp. 1 y 2, Exp. 3 y Exp. 4 y 5) y dos lotes anti-HRBC.

ción con el antígeno, podrían contener células con especificidad para el idiotipo característico de los anticuerpos dirigidos hacia dicho antígeno (196-198). Estas células aparecerían como antígeno-específica en los ensayos convencionales siendo sólo reveladas en situaciones particulares, diseñadas directamente para este propósito. Igualmente, sería posible que los TRFs compuestos de distintas especificidades contuvieran factores auxiliares específicos para el idiotipo. Para comprobar esta posibilidad, repetimos los anteriores experimentos de absorción, utilizando complejos antígeno-anticuerpo para eliminar la actividad auxiliar que los TRFs presentan para el antígeno. Todos los anticuerpos utilizados para la formación de complejos se obtuvieron de animales sinogéneos 3 y 4 días después de la inmunización con el antígeno (anticuerpos fundamentalmente del isotipo IgM), con el objeto de reproducir lo más fielmente posible los complejos entre antígeno y anticuerpos naturales a los que las células T vírgenes deben estar expuestas in vivo.

Los ConA-TRFs absorbidos con los complejos SRBC-anti-SRBC y HRBC-anti-HRBC se testaron posteriormente en cultivos *in vitro* frente a SRBC y HRBC. Los resultados obtenidos de dichos experimentos se muestran en la tabla 11, donde puede observarse que los complejos antígeno-anticuerpos tempranos, eliminan específicamente la actividad auxiliar de los TRFs.

Así, después de la absorción en el complejo SRBC-anti-SRBC, la actividad auxiliar para SRBC disminuye alrededor de un 90% (dependiendo de cada experimento) mientras no resulta afectada la actividad auxiliar para el antígeno HRBC, que sólo es capaz de absorberse sobre los complejos específicos HRBC-anti-HRBC.

Esta disminución específica de la actividad auxiliar observada después de las absorciones con complejos, se ha podido también comprobar utilizando in vitro distintas concentraciones de TRF absorbido, 10, 30 y 90% (tabla 12). Las absorciones que se hicieron en paralelo con el antígeno, no disminuyeron la actividad auxiliar.

III.6. LA AUSENCIA DE ACTIVIDAD AUXILIAR DE LOS ConA-TRFs ABSORBIDOS EN COMPLEJOS NO ES DEBIDO A LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS LIBRES.

La falta de actividad auxiliar observada en los ConA-TRFs tras su absorción en complejos antígeno-anticuerpo, podría ser debida a la presencia de anticuerpos específicos libres en los sobrenadantes absorbidos que pudieran inhibir la respuesta específicamente. Esta posibilidad parece muy poco probable, ya que todos los complejos están formados por anticiuerpos del isotipo IgM, que específicamente aumenta la res-

TABLA 12

TITULACION DE LA ACTIVIDAD AUXILIAR DE ConA-TRF ABSORBIDA SOBRE
EL ANTIGENO O SOBRE COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO.

Concentración de ConA-TRF en el cultivo (%)	P F C anti - S R B C / c u l t i v o		
	SRBC	SRBC anti-SRBC	HRBC anti-HRBC
0	82	—	—
10	584	86	—
30	838	146	—
90	2252	534	2300

Condiciones experimentales como se describe en la tabla 11.

puesta específica (199), a diferencia del isotipo IgG presente en anticuerpos más tardíos, que produce inhibición de la respuesta. Sin embargo, para descartar esta posibilidad, realizamos los siguientes experimentos:

1) Los ConA-TRFs absorbidos en complejos fueron reabsorbidos de nuevo en el antígeno. De esta forma, eliminaríamos tanto los posibles anticuerpos específicos presentes en el sobrenadante inicial como la disminución de la actividad auxiliar específica provocada por estos. Como puede observarse en la tabla 13a, la actividad auxiliar de los ConA-TRFs no varían después de la segunda absorción sobre el antígeno, indicando pues, que la inhibición no es debida a la presencia de anticuerpos sino a su absorción específica en complejos antígeno-anticuerpo. Los resultados obtenidos apoyan las mismas conclusiones para ambos antígenos y de nuevo las absorciones realizadas con uno de ellos no afectan en absoluto la actividad auxiliar para el otro.

2) Si la incubación de TRF con los complejos lleva consigo la transferencia pasiva de anticuerpos libres al sobrenadante absorbido, debería ocurrir igual si la incubación se llevara a cabo con medio de cultivo. Para ello, dicho medio se incubó con complejos antígeno-anticuerpo en idénticas condiciones a las utilizadas para absorber los TRFs y se añadió a

LA AUSENCIA DE ACTIVIDAD AUXILIAR EN LOS CONA-TRFs ABSORBIDOS EN COMPLEJOS NO ES

DEBIDO A LA TRANSFERENCIA PASIVA DE ANTICUERPOS

Absorción secuencial de los TRFs en complejos y en antígeno P F C / c u l t i v o

1 ^a absorción Complejos	2 ^a absorción Antígeno	anti-SRBC	anti-HRBC
no	no	3877	1104
no	sí	2855	734
sí	no	1200	272
sí	sí	1080	263
sí (en complejos irrelevantes)	sí (en complejos irrelevantes)	3666	1050

ConA-TRFs obtenidos en la forma usual se absorbieron secuencialmente en complejos antígeno-anticuerpo y antígeno, determinándose a continuación su actividad auxiliar en células de bazo de ratón atímico. La absorción en complejos formados por antígenos distintos al utilizado en la estimulación in vitro se denomina absorción en complejos irrelevantes.

cultivos in vitro junto con TRF no absorbido. La presencia de anticuerpos en el medio absorbido con complejos, debería inhibir la actividad auxiliar del TRF no absorbido (células + TRF normal + medio absorbido en complejos + antígeno). Como se muestra en la tabla 13^b, el número de PFC anti-antígeno de los cultivos a los que se añadió medio incubado con complejos es igual que en aquéllos donde se añadió medio no incubado. La incubación del medio en el complejo HRBC-anti-HRBC no correspondiente al antígeno(SRBC) utilizado in vitro (complejos irrevelantes) no afectó la respuesta específica para SRBC.

3) Igualmente, la adición de ConA-TRFs absorbidos sobre complejos a cultivos estimulados con antígeno en presencia de TRFs normales, no suprimió la actividad auxiliar de estos TRFs (tabla 13b).

De los puntos 2 y 3 se desprende que tanto los TRFs como el medio, no son capaces de transferir anticuerpos libres por su incubación con los complejos que pudieran ser los responsables de la inhibición de la actividad auxiliar de los TRFs absorbidos en complejos específicos.

4) Los complejos antígeno-anticuerpo preparados con anticuerpos monoclonales producidos in vitro por hibridomas (donde sólo estaría expresada una única estructura idiotípica), fuere

LA AUSENCIA DE ACTIVIDAD AUXILIAR EN LOS ConA-TRFs ABSORBIDOS EN COMPLEJOS NO ES DE-
BIDO A LA TRANSFERENCIA PASIVA DE ANTICUERPOS

Mezcla de TRFs con medio o TRF incubados con complejos:	<u>TRF</u>	<u>medio</u>	P F C / c u l t i v o		
			<u>anti-SRBC</u>	<u>anti-HRBC</u>	
			<u>Exp.1</u>	<u>Exp.2</u>	<u>Exp.1</u>
no absorbido	no	incubado	4400	7026	1540
sí / "	no	"	560	760	380
no "	sí	"	3909	5900	1320
no	sí	(en complejos irrelevantes)	—	6373	1400
absorbido + no absorbido		—	—	6473	1440

ConA-TRFs se mezclaron con medio normal o incubado con complejos antígeno-anticuerpo, determinándose actividad auxiliar en la forma habitual. La última línea indica la actividad auxiliar de una mezcla de TRF normal y TRF absorbido sobre complejos (1:1).

ron incapaces de absorber la actividad auxiliar de los ConA-TRFs, así como de producir una inhibición en la respuesta es pecífica anti-antígeno (tabla 14).

III.7. EL RECEPTOR PARA LOS ConA-TRFs ESTA EN LOS LINFOCITOS B.

De los experimentos anteriores, podría deducirse que los ConA-TRFs actuarían sobre las células B. En primer lugar, porque dado que se han utilizado antígenos TD (SRBC o HRBC), es necesaria la colaboración entre linfocitos T y B pa ra la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos. Puesto que en nuestro sistema reemplazamos a las células T por los ConA-TRFs, estos deberían activar a las células B. Además, siendo las células B las que presentan idiotipos en sus receptores antigénicos específicos, sería de esperar que la actividad anti-idiotípica de los TRFs (III.5.) se manifestara por su interacción con dichas células B. Sin embargo, no puede descartarse a priori la interacción de los ConA-TRFs con otras células, tales como los macrófagos, al igual que para otros factores (200,201).

Para clarificar estas dos posibilidades, realizamos experimentos en los que la actividad auxiliar de los factores TRFs se determinó in vitro con células de bazo de ratones atímicos de las que se eliminaron los macrófagos mediante filtración en columnas de Sephadex G-10.

TABLA 14

ABSORCION DE LOS ConA-TRFs SOBRE COMPLEJOS FORMADOS CON ANTIGENO
Y DISTINTOS TIPOS DE ANTICUERPOS

ConA-TRF	Absorción sobre complejos formados con anticuerpos	PFC anti-SRBC / cultivo	
		Exp. 1	Exp. 2
—	—	250	386
+	—	9180	10847
+	monoclonales (hibridomas)	8900	10358
+	policlonales (sueros)	1800	2000

ConA-TRFs se absorbieron en complejos antígeno-anticuerpo utilizando anticuerpos mono o policlonales y su actividad auxiliar se determinó en la forma habitual.

El número de PFC anti-SRBC obtenido después de cinco días de cultivo in vitro no se alteró al eliminar los macrófagos (tabla 15).

Estos datos demuestran que la célula diana de los ConA-TRFs no son los macrófagos sino las células B, única población celular responsable de la respuesta inmune de células de bazo de ratones atímicos al eliminarse los macrófagos.

III.8. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION DE TRFs EN LA FRACCION DE ACTIVIDAD AUXILIAR QUE SE ABSORBE EN COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO.

Mencionábamos en III.3.4. la posible necesidad de células accesorias en la producción de TRF, asumiendo que las células T que reaccionan con ConA son el origen celular del TRF y que dicho proceso requiere la presencia de células B pero no la presencia de otras células auxiliares (macrófagos).

El diferente papel que las células B y los macrófagos desempeñan en la producción de TRF nos llevó a considerar la posibilidad de que ConA-TRFs producidos en presencia de células que presentan idiotipos en su membrana (células B) pudieu

TABLA 15

ACTIVIDAD DE ConA-TRF SOBRE CELULAS DE BAZO DE RATONES ATIMICOS.
INFLUENCIA DE LA ELIMINACION DE MACROFAGOS POR FILTRACION EN
SEPHADEX G-10.

<u>Células de bazo de ratones</u> <u>atímicos</u>	<u>ConA-TRF (%)</u>	<u>PFC anti-SRBC /</u> <u>cultivo</u>
normales (B + macrófagos)	—	400
"	60	7840
"	90	10826
·filtrados por Sephadex G-10(B)	—	380
"	60	7206
"	90	8606

ran contener proporcionalmente mayor actividad (anti-idiotípica según demostramos en el apartado III.5.) que TRFs preparados en presencia de células que no presentan idiotipos en su superficie (macrófagos). Los resultados de estos experimentos (tabla 16) favorecen esta posibilidad. Así, cuando los TRFs se preparan por activación de células T puras con ConA en presencia de células B purificadas, su actividad auxiliar anti-idiotípica es mucho mayor (70% de absorción sobre complejos) que los de TRFs preparados en presencia de macrófagos (26%). Igualmente, se realizaron experimentos similares en los que se incluyó antígeno en la etapa de producción del factor. Como se demuestra en la tabla 16, la actividad de dichos factores continúa sin absorberse sobre el antígeno. Por otra parte, la adición de antígeno a los cultivos de células T + B claramente reduce la fracción de la actividad que puede absorberse en complejos antígeno-anticuerpo (56%).

Este tipo de experimentos pone de manifiesto que la absorción de los ConA-TRFs sobre complejos antígeno-anticuerpo produce una disminución de la actividad auxiliar que no es debida a la transferencia pasiva de anticuerpos, ya que absorciones realizadas sobre el mismo complejo de los TRFs producidos en distintas condiciones no producen la misma pér

INFLUENCIA DE LAS CELULAS ACCESORIAS EN LA ESPECIFICIDAD DE LOS ConA-TRFs.

ConA-TRFs producidos por células T suplementados con:	PFC anti-SRBC/cultivo		absorbido secuencialmente sobre complejos y antígenos
	no absorbido	absorbido sobre antígeno	
—	1966	1997	1305
células B	11839	10021	3429
células peritoneales (macrófagos)	2699	3116	2094
células B + antígeno (SRBC)	11258	8239	5379
células peritoneales + antígenos (SRBC)	4858	6065	4133

ConA-TRFs se produjeron estimulando con ConA las poblaciones celulares indicadas en presencia o ausencia de SRBC y se sometieron a las correspondientes absorciones. La actividad auxiliar se determinó en cultivos in vitro en presencia de antígeno, en la forma habitual.

dida de actividad auxiliar.

Otra observación que se desprende de dichos experimentos es que la actividad auxiliar de los TRFs preparados en ausencia de células B no se absorbe sobre complejos antígeno-anticuerpo.

III.9. EVALUACION DEL NUMERO DE CELULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS NATURALES.

Los experimentos anteriores donde se demostró que los ConA-TRFs producidos por células T no tienen actividad anti-antígeno pero sí actividad anti-idiotípica, favorece la hipótesis de que las células T in vivo no reconocen el antígeno directamente, sino formando complejos con anticuerpos específicos en el animal antes de la administración del antígeno (anticuerpos naturales). Estos anticuerpos estarían presentes en suficiente cantidad para poder formar complejos con el antígeno al entrar éste en el sistema linfático. Este proceso sería previo al contacto con la célula T y necesario para la inducción de células T activadas específicamente.

Aunque no existían estudios concretos sobre la cuantificación y evaluación de los anticuerpos naturales, su existencia se aceptaba debido a: 1) en experimentos simples de

respuesta a un antígeno in vivo o in vitro, los controles (sin inmunizar) presentaban siempre un determinado número de PFC, que variaba según la cepa y edad del animal (202) y 2) la teoría de Jerne sobre la regulación del SI mediante una "red de interacciones idiotipo-anti-idiotipo" presuponia la existencia de dichos anticuerpos, que regularían el estado del SI previo al contacto con el antígeno (155,156,157,159). Todas estas premisas y la importancia de los anticuerpos naturales en nuestro sistema, nos condujeron a iniciar un estudio sobre la existencia y cuantificación de estos anticuerpos naturales en distintos órganos del ratón, su evolución con la edad del animal y la frecuencia de las células formadoras de anticuerpos naturales para distintos antígenos. Para ello, utilizamos distintas cepas de ratones, incluyendo ratones normales de distintas edades, ratones atímicos y ratones gnotobióticos.

El número total de células formadoras de anticuerpos naturales de las clases IgM, IgG (IgG₁ + IgG₂) e IgA, se determinó mediante el método de la proteína A. Asimismo, se determinó el número de PFC específicas para los antígenos SRBC, HRBC, NIP-SRBC y TNP-SRBC, calculándose posteriormente la frecuencia de precursores para estos antígenos.



En las tablas 17 y 18 se muestra una relación del número total de AFC productoras de anticuerpos naturales de las clases IgM, IgG e IgA en distintos órganos: bazo, timo, medula osea, placas de Peyer, ganglios periféricos y mesentéricos de ratones normales y atímicos (Balb/c , tabla 17) y gnotobióticos (C3H/Tif, tabla 18).

Es interesante destacar los siguientes puntos: 1) en todos los órganos testados, existen células formadoras de anticuerpos naturales, aunque son más abundantes en bazo y medula osea, órganos donde predominantemente residen células B; 2) el número de PFC aumenta con la edad en todos los órganos, fundamentalmente los de la clase IgG, lo que explicaría que en animales adultos la cantidad de anticuerpos IgG son más abundante en el torrente circulatorio que los IgM. Este aumento del número de PFC totales, podría ser debido tanto a la estimulación antigénica continuada durante la vida del animal (lo que aumentaría el número de clones específicos y su estadio de diferenciación) como a la disminución de los mecanismos supresores en la vida adulta; 3) en algunos órganos como placas de Peyer y ganglios mesentéricos y periféricos, el número de PFC IgG es mayor que el de PFC IgM; 4) la existencia de PFC en timo, órgano que normalmente se considera constituido únicamente

DETERMINACION DEL NUMERO TOTAL DE CELULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS NATURALES EN DISTINTOS ORGANOS.

Organo	Igs	BALB / C				BALB / C ATIMICOS	
		10-12 semanas		1 año		6-8 semanas	
		PFC/10 ⁶	PFC/Órgano	PFC/10 ⁶	PFC/Órgano	PFC/10 ⁶	PFC/Órgano
Bazo	M	2542	200695	9740	1249000	6585	629250
	G	1053	81428	10025	1294000	3109	426000
	A	783	70534				
Timo	M	149	2987	490	2775		
	G	65	1308	400	2275		
	A	61	1033				
Medula osea	M	521	6185	4775	148688	442	9776
	G	268	3109	4187	133375	339	7641
	A	76	1022				
Gánglios mesenté- ricos	M	352	6022	2025	24906	895	5297
	G	563	7322	3741	48637	809	5525
	A	273	8010				
Gánglios periféri- cos	M	34	158	288	1919	134	731
	G	66	280	1436	9809	275	2047
	A	32	185				
Placas de Peyer	M	755	3489	1154	2881	690	1387
	G	1282	5182	1849	4819	821	1650
		84	401				

La determinación del número total de AFC se llevó a cabo por el método de la proteína A empleando anti-
ti-cuerpos específicos para detectar los anticuerpos de las clases IgM, IgG y IgA.

TABLA 18

DETERMINACION DEL NUMERO TOTAL DE CELULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS NATURALES EN DISTINTOS ORGANOS.

RAFONES C3H/TIF GNOTOBIOTICOS

Organo	Igs	3-4 semanas		8-10 semanas	
		PFC/10 ⁶	PFC/órgano	PFC/10 ⁶	PFC/órgano
Bazo	M	2817	1179	5768	210750
	G	62	268	74	2330
	A	100	903	22	593
Timo	M	23	1097	119	2719
	G	20	957	10	506
	A	27	693	12	323
Medula osea	M	412	5780	2486	26923
	G	20	263	242	2336
	A				
Ganglios mesentéri- cos	M			5	264
	G			7	340
	A			3	140
Ganglios periféri- cos	M			46	780
	G			47	636
	A			7	92

La determinación del número total de AFC se llevó a cabo por el método de la proteína A empleando anti-sueros específicos para detectar los anticuerpos de las clases IgM, IgG y IgA. En los animales de 3-4 semanas, no fue posible detectar ganglios linfáticos (mesentéricos o periféricos).

de células T, indicaría la presencia simultánea de células B, posiblemente en pequeño número pero en un estadio de diferenciación de células plasmáticas (formadoras de anticuerpo; 5) no se observan grandes indiferencias entre ratones normales y atímicos, lo que indicaría que la existencia de células formadoras de anticuerpos naturales no está sometida al control de las células T y 6) asimismo, las células formadoras de anticuerpos naturales son independientes de la presencia del antígeno, ya que están igualmente presentes en los distintos órganos de los ratones gnotobióticos (tabla 18). Es de destacar en estos animales el poco desarrollo alcanzado por algunos órganos linfoides, así el bazo de ratones jóvenes (3-4 semanas) contiene un número de células 50-100 veces menor que el de los animales normales. Del mismo modo ocurre con los gánglios linfáticos, órganos donde preferentemente tiene lugar el reconocimiento antigénico. Inversamente, ocurre con la médula ósea, donde el número de PFC es mayor que en animales normales.

III.9.1. Cálculo de la frecuencia de precursores específicos.

Como ya se ha descrito en II.25., la frecuencia de precursores para los antígenos SRBC, HRBC, NIP-SRBC y TNP-SRBC, se determinó mediante el cociente entre el número de

PFC totales detectadas mediante el método de la proteína A (proteína A-SRBC), y el número de PFC específicas para el antígeno (60).

En la tabla 19 se muestran las frecuencias obtenidas en animales normales para los distintos antígenos y en distintos órganos: bazo, timo y médula ósea. Las frecuencias así obtenidas se corresponden con bastante exactitud con las descritas por Andersson y col. (145) mediante estimulación mitogénica con LPS o LP bajo condiciones de dilución límite.

Es de destacar el hecho de que estas frecuencias son muy similares a las encontradas en animales gnotobióticos (tabla 20), lo que demuestra que la existencia de células formadoras de anticuerpos es independiente de la presencia del antígeno. Esta observación corrobora la hipótesis de la existencia de un control interno (interacciones idiotipo-anti-idiotipo) en la diversificación ontogénica de las células B y por tanto del Sistema Inmune (A. Coutinho, comunicación personal).

III.10. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ACTIVIDADES TRF Y TGF DE FACTORES INDUCIDOS POR ConA.

Ya hemos descrito anteriormente experimentos donde

CALCULO DE FRECUENCIAS DE PRECURSORES ESPECIFICOS EN DISTINTOS ORGANOS LINFOIDES DE RATONES BALB/C NORMALES.

<u>Antígeno</u>	<u>Bazo</u>	<u>Timo</u>	<u>Medula Osea</u>
SRBC	1/1580	1/1700	1/1200
NIP ₄ -SRBC	1/105	1/153	1/120
TNP ₃₀ -SRBC	1/150	1/147	1/194
HRBC	1/825	1/795	1/920

La frecuencia de precursores específicos para cada uno de los antígenos indicados se determinó en los distintos órganos por la relación entre el número de PFC específicos para cada antígeno y el número total de PFC IgM.

TABLA 20

CALCULO DE LA FRECUENCIA DE PRECURSORES ESPECIFICOS EN CELULAS
DE BAZO DE RATONES C3H/TIF GNOTOBIOTICOS.

<u>Antígeno</u>	<u>Frecuencia</u>
SRBC	1/1276
HRBC	1/896
TNP ₃₀ -SRBC	1/162
NIP ₄ -SRBC	1/130

demostrábamos que los ConA-TRFs actúan sobre los linfocitos B, reemplazando a las células T en la colaboración necesaria para la respuesta a antígenos TD (SRBC, HRBC).

Recientemente, se ha descrito (203) la producción bajo condiciones experimentales muy similares de otro tipo de factores que actúan sobre las células T induciendo su diferenciación a blastos y manteniendo su crecimiento *in vitro* indefinidamente. Este tipo de factores, se ha utilizado tanto para la activación de linfocitos de ratón (204) como de humanos (205), produciéndose el factor en este último caso por estimulación de linfocitos de sangre periférica con PHA, mitógeno que induce en células T de humanos una mayor proliferación que ConA.

Sin embargo, es de destacar el hecho de que la activación de linfocitos T con estos factores, requiere la presencia inicial en el cultivo de otro mitógeno, PHA en humanos o ConA en ratón, siendo después suficiente la adición al cultivo de los sobrenadantes de los que previamente se elimina mediante distintos procedimientos el mitógeno que indujo su producción (117).

La presencia inicial del mitógeno puede sustituirse en células humanas por otros métodos que modifiquen la mem-

brana de las células T (por ejemplo la interacción con SRBC, marcador específico de los linfocitos T humanos). Esto se ha interpretado (115) en el sentido de que los receptores de las células T para estos factores no están expuestos en la membrana cuando los linfocitos están en estado de reposo, siendo necesaria una modificación previa de la membrana para que la célula sea susceptible de estimulación posterior por estos factores. Como se discutió en I.4.3., la producción de estos factores es dependiente también de la presencia de linfocitos T.

En este sentido, decidimos estudiar si la actividad de estos factores producidos en condiciones similares pero que actúan sobre dos tipos diferentes de linfocitos (B los TRFs y T los TGFs), residen en la misma o distintas moléculas. Se obtuvieron sobrenadantes inducidos por ConA en las condiciones descritas y se determinó su actividad en dos sistemas: 1) en cultivo (Mishell-Dutton) con células de bazo de ratones atímicos en presencia del antígeno, evaluando después el número de PFC específicas para el antígeno (actividad TRF y 2) en cultivos a baja densidad de células T y midiendo la síntesis de DNA (actividad TGF).

Puede verse en la tabla 21 que los factores producidos por estimulación con ConA son activos en ambos sistemas.

ACTIVIDAD TRF Y TGF DE SOBRENADANTES INDUCIDOS POR ConA.A) Actividad TGF.

	c p m / c u l t i v o			
	Exp. 1		Exp. 2	
	<u>medio</u>	<u>sobrenadante</u>	<u>medio</u>	<u>sobrenadante</u>
Día 1	1400	13000	780	7500
Día 2	220	42000	190	18000
Día 3	120	48600	203	35000
Día 4	280	55000	125	30000

B) Actividad TRF.

	P F C a n t i - S R B C / c u l t i v o	
	<u>Exp. 1</u>	<u>Exp. 2</u>
Medio	400	350
Sobrenadante	12013	11300

La actividad TGF se determinó cultivando 5×10^4 blastos T (II.22) en presencia de medio de cultivo o de sobrenadantes inducidos por ConA. A los días señalados se valoró la incorporación de ^3H -timidina por el cultivo. La actividad TRF se estudió en la forma habitual.

Las pequeñas diferencias observadas pueden ser debidas a los diferentes lotes de suero bovino fetal utilizado para su producción in vitro. Mientras que el FCS utilizado para la producción de TRF debe de poseer ciertas propiedades necesarias para el cultivo in vitro a alta densidad (Mishell-Dutton), el que se utiliza para producir el factor que estimula el crecimiento a baja densidad de las células T, se seleccionó específicamente para este fin, no resultando adecuado para el cultivo Mishell-Dutton.

Dado que el sobrenadante que se obtiene en las condiciones standar tras 24 horas de estimulación por ConA de células de bazo de ratones, contiene factores con actividad en ambos sistemas, es decir actividad TRF y actividad TGF, llevamos a cabo los siguientes experimentos para tratar de concluir si se trataba del mismo o distintos factores presentes en el mismo sobrenadante.

III.10.1. Absorción de los sobrenadantes de ConA sobre timocitos.

Puesto que el TGF actúa directamente sobre las células T mientras que el TRF lo hace sobre las B, decidimos absorber el sobrenadante producido por ConA sobre linfocitos T procedentes del timo de ratón, testando dicho sobrenadante

absorbido en ambos sistemas. Como se muestra en la tabla 22, la actividad no se ha modificado tras la absorción en ninguno de los dos sistemas. Estos resultados son de esperar por cuanto el TRF ejerce su actividad sobre células B. Sin embargo, en el caso del TGF, estos datos podrían explicarse por el hecho de que el TGF no es capaz de inducir la proliferación de linfocitos T en reposo (estado en el que se encuentran los linfocitos en el timo).

III.10.2. Absorción de los sobrenadantes de ConA sobre células de bazo.

A idénticos resultados se llegó absorbiendo los sobrenadantes, producidos por estimulación con ConA, sobre células de bazo antes de probar su actividad. En ninguno de los dos sistemas se observó disminución en la actividad ni de TRF ni de TGF (tabla 22).

III.10.3. Absorción de los sobrenadantes de ConA sobre blastos T.

Ya que el TGF induce proliferación de linfocitos T previamente estimulados por ConA y los mantiene en crecimiento por tiempo indefinido con el único requerimiento de añadir nuevos sobrenadantes cuando se incremento la densidad celular,

TABLA 22

ABSORCION DE LOS SOBRENADANTES DE ConA EN TIMOCITOS Y CELULAS DE BAZO.

Sobrenadante añadido de cultivo	Absorción previa	PFC	cpm
medio	no	432	850
SN ConA 90%	no	10586	25700
SN ConA 90%	10 ⁹ timocitos	13013	23850
SN ConA 90%	3x10 ⁶ células de bazo	10160	19250
SN ConA 50%	no	5800	
SN ConA 50% +	no	5933	
Medio	10 ⁹ timocitos		
SN ConA 50% +	no		
Medio	3x10 ⁶ células de bazo	5426	

Sobrenadantes (SN) obtenidos de células estimuladas con ConA se absorbieron con las células que se indican determinándose su actividad TRF y TGF.

puede suponerse que el TGF se absorbe sobre linfocitos T en estado de blasto, ya que es necesaria la adición consecutiva de nuevo TGF para mantener su proliferación. Experimentos como el que figura en la tabla 23, confirman esta hipótesis. Puede así observarse que el sobrenadante absorbido sobre blastos T pierde su actividad como TGF, mientras que la actividad TRF se mantiene inalterada o incluso incrementada, lo que indicaría la eliminación tras la absorción de algún factor que inhibe en el cultivo Mishell-Dutton.

Este tipo de resultados, junto con otros que describiremos posteriormente, nos indujo a pensar en la posibilidad de que estas dos actividades del mismo sobrenadante eran debidas a dos factores distintos.

III.10.4. Absorción de los sobrenadantes de ConA sobre blastos B.

Tratando de conseguir resultados similares en la absorción de la actividad TRF, llevamos a cabo experimentos similares pero utilizando blastos B producidos por estimulación con LPS, tanto de células de bazo de ratones normales como atímicos. Sin embargo, según se muestra en la tabla 24, la actividad auxiliar de los ConA-TRF no pudo absorberse en este sistema. Esta falta de absorción de la actividad TRF

ABSORCION DEL SOBRENADANTE DE ConA EN BLASTOS T.

<u>Sobrenadante añadido al cultivo</u>	<u>Absorción previa</u>	<u>PFC</u>	<u>CPM</u>
medio	no	500	1335
SN ConA 90%	no	9086	9968
SN ConA 90%	1,5x10 ⁸ blastos T	11120	1488
SN ConA 90%	3,5x10 ⁸ blastos T	10532	917
medio	3,5x10 ⁸ blastos T	653	999
SN ConA 50%	no	4880	9869
+ medio	3,5x10 ⁸ blastos T		
SN ConA 50%	no	5500	—

Sobrenadantes(SN) obtenidos de células estimuladas con ConA se absorbieron con las células que se indican determinándose su actividad TRF y TGF.

TABLA 24

ABSORCION DEL ConA-TRF EN BLASTOS B.

Sobrenadante añadido al cultivo	Absorción previa	PFC anti-SRBC/cultivo
medio	no	248
TRF	no	4773
TRF	2×10^8 blastos B ^{a)}	5568
TRF	2×10^8 blastos B ^{b)}	3829

a) Blastos B inducidos por LPS (50µg/ml) en cultivos de células de bazo de ratones C57Bl/6J.

b) Blastos B inducidos por LPS (50µg/ml) en cultivos de células de bazo de ratones C57Bl/6J atímicos.



podría explicarse en función de los resultados presentados en la tabla 11, donde la actividad TRF se eliminaba absorbiendo los ConA-TRF en complejos antígeno-anticuerpo. La ausencia del antígeno en las absorciones con blastos B, explicaría los resultados negativos obtenidos en este experimento.

III.10.5. Propiedades fisicoquímicas de los factores TRF y TGF.

Teniendo en cuenta que de todas las absorciones expuestas anteriormente solamente la realizada con blastos T se obtuvo una indicación positiva de la posible diferencia entre ambos factores, iniciamos el estudio de sus propiedades fisicoquímicas a fin de dilucidar la presencia de una o varias especies moleculares en los sobrenadantes de ConA con las distintas actividades estudiadas.

III.10.5.1. Determinación del pI por electroenfoque. Según se ha descrito en II.8.3., el sobrenadante obtenido por estimulación con ConA se dializó y concentró antes de someterse a electroenfoque durante 24 horas en un gradiente de pH de 3-10. Las fracciones eluidas del gel se dializaron frente a medio de cultivo suplementándose finalmente con FCS. La actividad de cada fracción se determinó en ambos sistemas.

En la figura 4 se indica el gradiente de pH formado, la absorción a 280nm y las actividades TRF y TGF de cada fracción. La actividad TRF aparece mayoritariamente en la fracción correspondiente a un pI 6.7-6.9, aunque se encuentra alguna pequeña actividad en el rango de pI 8-9 (fig. 4). Igualmente, puede comprobarse que la actividad TGF aparece en dos picos; el máximo de actividad aparece a pI 6-6,5, mientras que el segundo pico de actividad aparece a pI 5,8. Puede observarse asimismo que los dos picos de la actividad TGF corresponden con dos hombros del pico de mayor actividad TRF.

A pesar del solapamiento de los pI de ambas actividades, la diferencia de perfil de ambas actividades (TRF y TGF) permite afirmar que éstas son llevadas a cabo por especies moleculares diferentes. Sería importante la combinación de técnicas de absorción y electroenfoque para la completa separación de ambas actividades.

Es también importante destacar que las dos actividades estudiadas se encuentran en fracciones diferentes a aquéllas en las que se concentra la mayoría de las proteínas presentes en el sobrenadante, descartándose así la posible objeción de que la activación fuese debida a otros componentes (IgS o proteínas presentes en el FCS), presentes en dicho sobrenadante.

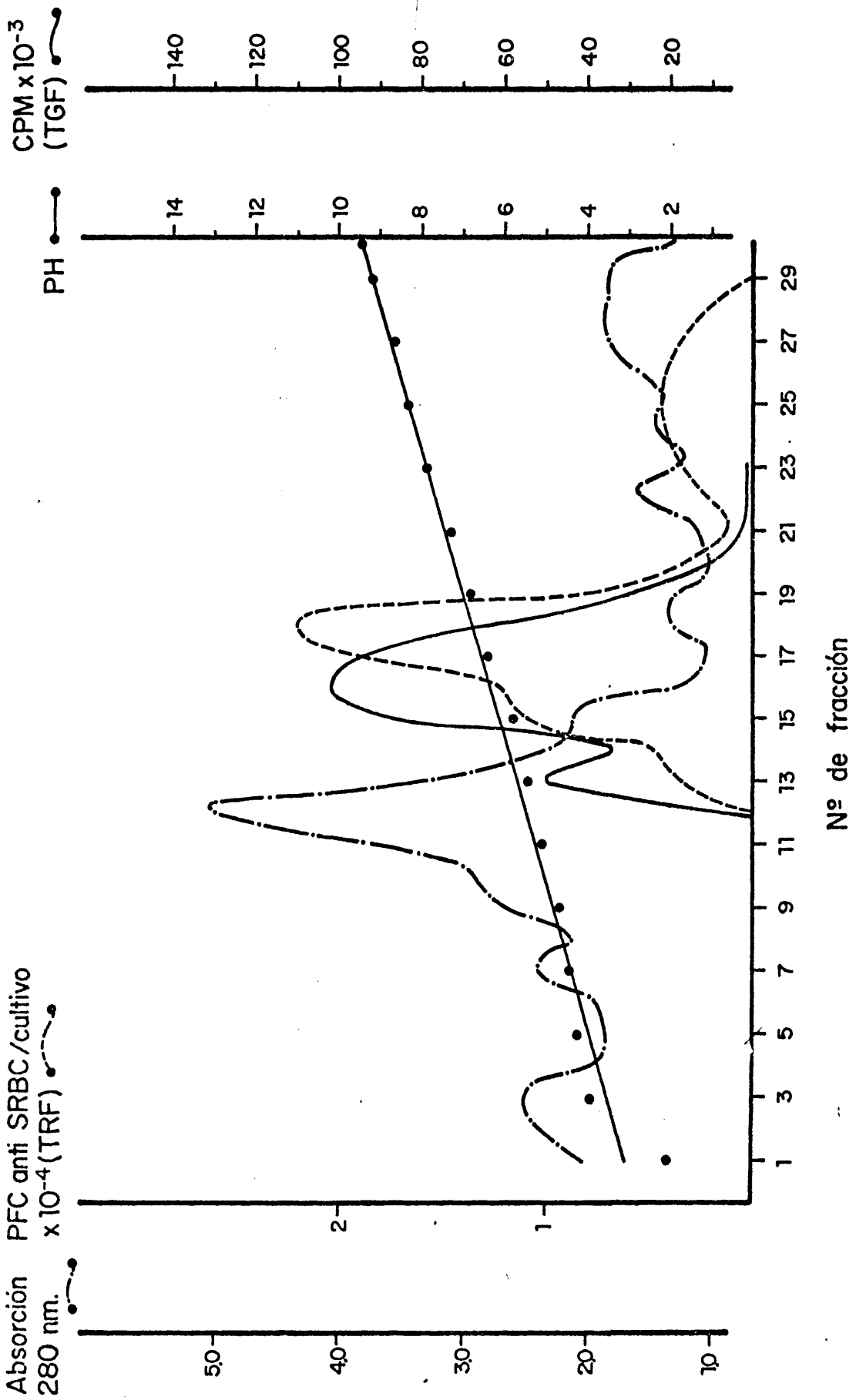


Figura 4. Electroenfoque de sobrenadantes de ConA sobre un soporte de gel (Ultradex) en un gradiente de pH 3-10. Las distintas fracciones se testaron en los sistemas habituales de actividad TRF y TGF.

III.10.5.2. Cromatografía de afinidad en columnas de ConA-Sepharosa. Se ha comprobado que la mayoría de los factores solubles que interviene en la respuesta inmune son glicoproteínas (206). Schimpl y Wecker (207) han descrito el TRF como una glicoproteína, no existiendo datos al respecto sobre el TGF.

En la tabla 25 se muestra la cromatografía de afinidad sobre ConA-Sepharosa (un método de absorber gran parte de las glicoproteínas a matrices sólidas) de sobrenadantes de ConA. Puede observarse que ninguna de las dos actividades TRF y TGF se absorbe en la columna de ConA-Sepharosa. En cualquier caso, el método no resulta válido para separar las dos actividades TRF y TGF.

III.10.5.3. Determinación de pesos moleculares. Como puede observarse en la figura 5, tanto la actividad TRF como la TGF presentes en los sobrenadantes de ConA se eluyen de una columna de Ultragel ACA 54 en la fracción correspondiente a un PM de 20-30.000 dalton. La presencia de un pico con actividad TRF en el volumen de exclusión de la columna, puede indicar bien la presencia de formas poliméricas de dicho factor o bien puede ser el resultado de la asociación del factor con otras moléculas desprovistas de actividad TRF. La ausencia de actividad TGF en la fracción correspondiente al

TABLA 25

CROMATOGRAFIA SOBRE ConA-SEPHAROSA.

<u>Factor añadido al cultivo</u>	<u>PFC anti-SRBC/ cultivo (TRF)</u>	<u>cpm (TGF)</u>
medio	350	950
SN de ConA 90%	8600	15000
No absorbido a ConA-Sepharosa	8581	13820
Eluido de ConA-Sepharosa	355	1450

5 ml de sobrenadantes de cultivos estimulados por ConA se cromatografiaron en una columna (5 ml) de ConA-Sepharosa. La fracción no absorbida y la eluida de la columna con α -metil-mannosido 0,1M se testaron en la forma habitual.

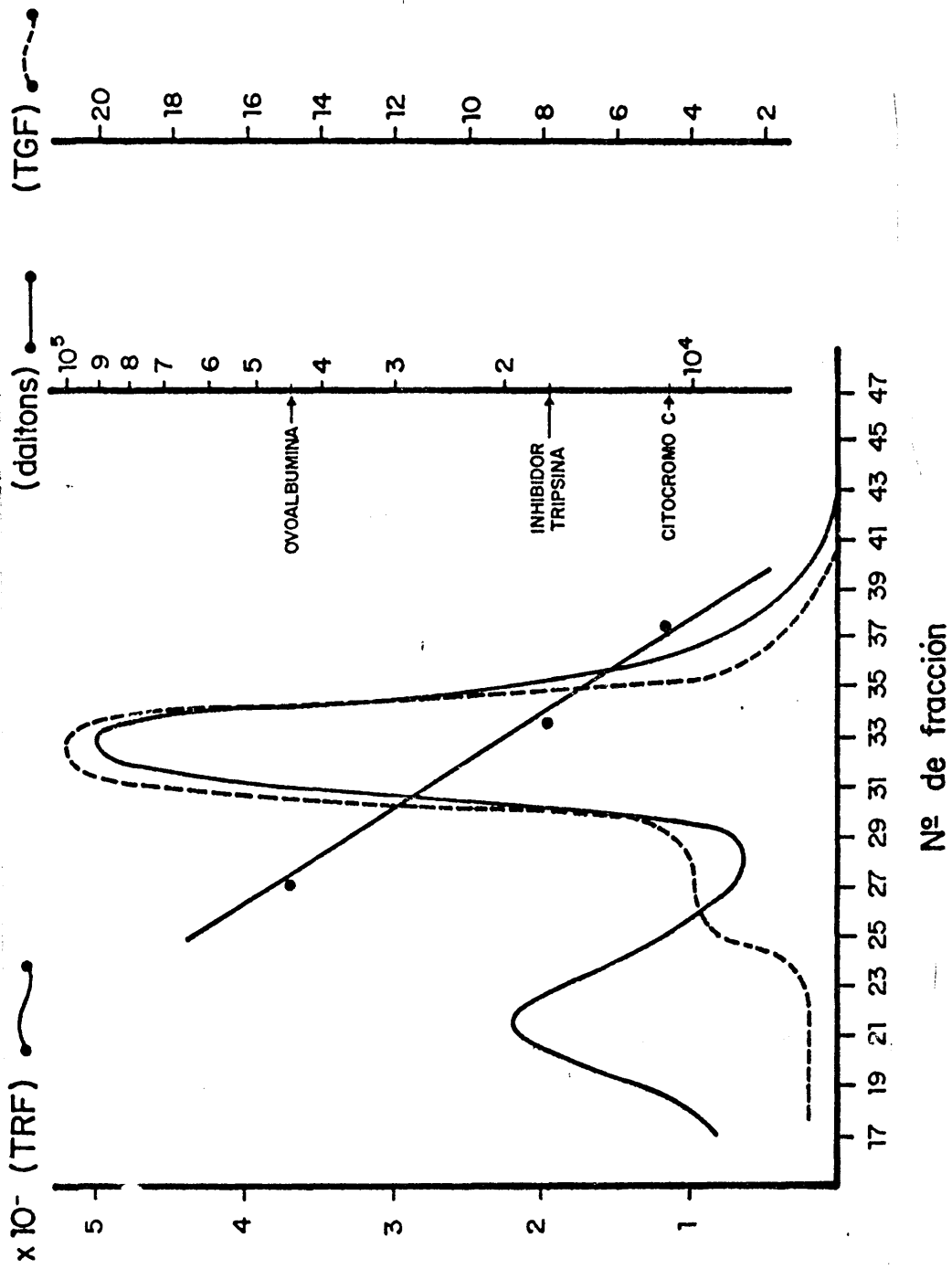


Figura 5. Cromatografía en Ultragel ACA 54 de sobrenadantes inducidos por ConA. La columna se calibró previamente con ovoalbúmina, inhibidor de la tripsina y citocromo C. Las actividades TRF y TGF de cada fracción se determinaron en la forma habitual.

volumen de exclusión sugiere, aunque no prueba, la existencia de moléculas distintas portadoras de las actividades TRF y TGF.

III.11. ACTIVIDAD AUXILIAR INDUCIDA POR WGA.

Han sido descritos factores de actividad TRF producidos por estimulación alogénica o mitogénica (ConA) de células T de bazo de ratón (130,132). Sin embargo, dicha estimulación también induce la activación de otro tipo de células cuyo papel es la inhibición de la respuesta antigénica en los fenómenos de cooperación entre linfocitos (113). Estas células supresoras (Ts) activadas por ConA, liberan factores que son supresores en el sistema Mishell-Dutton, aunque la aparición de Ts ocurre solamente si la estimulación mitogénica se prolonga más de 24 horas. En estas condiciones de estimulación también se produce otro tipo de factores (III.10.) que inducen la proliferación de las células T, factores que según los anteriores experimentos, parecen constituir estructuras moleculares diferentes a las ConA-TRFs.

La estimulación mitogénica necesaria para la producción de TRF, al ir acompañada de otras interacciones celulares que originan otro tipo de factores con distinta actividad, dificulta el estudio directo de la actividad auxiliar

de las células T o de sus factores en la respuesta inmune de las células B a antígenos TD. Por este motivo, es importante el desarrollo de otro sistema de inducción de actividad auxiliar in vitro en el que fuera más sencillo abordar el tipo de interacción factor-célula B.

En este sentido, decidimos analizar la posibilidad de inducción de actividad auxiliar por otras lectinas. La lectina más utilizada en la interacción mitogénica, de células T es (después de ConA), PHA. Sin embargo, esta lectina induce bajos niveles de la actividad TRF (J. Andersson, comunicación personal) por lo que no se utilizó en el presente estudio.

Además, existen otras lectinas, WGA, SBA, LA, sin aparente actividad mitogénica sobre linfocitos, pero que presentan ciertas ventajas en la producción de TRF: 1) no inducen actividad supresora y 2) no inducen actividad TGF en células de bazo de ratón (E.L. Larson, comunicación personal, 117).

Para comprobar el posible papel en la inducción de actividad auxiliar, se incubaron células de bazo de ratón con distintas concentraciones de dichas lectinas y los sobrenadantes recogidos a las 24 horas de cultivo se añadieron a células de ratones atímicos en presencia de antígeno

en cultivos Mishell-Dutton. A los cinco días de cultivo, *in vitro*, se determinó el número de PFC anti-antígeno. Como puede verse en la tabla 26, solamente los sobrenadantes del cultivo estimulado con WGA indujeron un número de PFC similar al producido por los factores auxiliares presentes en los sobrenadantes obtenidos por ConA. Las otras lectinas, no inducen actividad auxiliar detectable.

Este experimento indica que el WGA induce una actividad auxiliar bien actuando directamente sobre las células B en el segundo cultivo Mishell-Dutton o a través de otras células, T o macrófagos, presentes en las células de bazo del primer cultivo.

III.11.1. Actividad policlonal de los sobrenadantes inducidos por WGA.

Para demostrar si al igual que los ConA-TRFs, los sobrenadantes inducidos por WGA presentan actividad policlonal sobre las células B, se llevaron a cabo experimentos donde se estimularon células B con distintos antígenos. En la tabla 27, se muestra el número de PFC anti-SRBC y anti-HRBC obtenidos en cultivo Mishell-Dutton utilizando sobrenadantes inducidos por distintas concentraciones de WGA en cultivos de células de bazo. Puede, además, comprobarse que, al igual que

TABLA 26

INDUCCION DE ACTIVIDAD AUXILIAR POR DISTINTAS LECTINAS.

Lectina	PFC anti-SRBC/cultivo
—	220
ConA (TRF)	11500
LA 0,5µg/ml	340
" 1,5 "	440
" 4,5 "	226
" 13,5 "	293
WGA 0,5µg/ml	160
" 1,5 "	286
" 4,5 "	1306
" 13,5 "	14000
SBA 0,5µg/ml	200
" 1,5 "	820
" 4,5 "	286
" 13,5 "	413

Los sobrenadantes recogidos de la estimulación de células de bazo de ratones C57Bl/6J con las concentraciones indicadas de cada lectina, se testaron en cultivo Mishell-Dutton con antígeno en la forma habitual.

TABLA 27

ACTIVIDAD POLICLONAL DE SN INDUCIDO POR WGA.

Antígeno (SRBC o HRBC)	Actividad Auxiliar	PFC / cultivo	
		anti-SRBC	anti-HRBC
+	—	200	60
+	SN WGA 4,5µg/ml	1760	100
+	SN WGA 13,5µg/ml (90%)	10329	3873
+	SN WGA 13,5µg/ml (60%)	8833	2153
+	SN WGA 13,5µg/ml (30%)	6040	606
-	SN WGA 13,5µg/ml (90%)	280	63

Los sobrenadantes de cultivos estimulados en presencia de distintas concentraciones de WGA se utilizaron para estudiar la respuesta in vitro a SRBC o HRBC de células de bazo de ratones atímicos. La respuesta se midió por el número de PFC específicas para el antígeno utilizado en el cultivo.

ocurría con los ConA-TRFs, la especificidad de la respuesta viene determinada por la presencia del antígeno, siendo la magnitud de dicha respuesta dependiente de la concentración del sobrenadante de WGA añadido al cultivo.

III.11.2. Actividad auxiliar de WGA en la respuesta de células de ratones atímicos a antígenos TD.

A fin de dilucidar si la actividad auxiliar observada en los sobrenadantes de los cultivos estimulados por WGA se debía a la producción de factores auxiliares o a la posible actividad auxiliar del WGA presente en los sobrenadantes de dichos cultivos; se añadió WGA a cultivos in vitro de células de bazo de ratones atímicos (Mishell-Dutton) para determinar la respuesta específica anti-SRBC.

En la tabla 28, puede observarse que la lectina WGA en presencia de antígeno es capaz de inducir un número de PFC anti-SRBC similar al obtenido utilizando sobrenadantes de cultivos estimulados con WGA. Hay que destacar que la diferencia entre las dosis óptimas de WGA en un y otro sistema, puede explicarse tanto por efecto de la dilución del sobrenadante al pasar al segundo cultivo como por la posible absorción de la WGA sobre las células del primer cultivo.

TABLA 28

ACTIVACION DE CELULAS DE RATONES ATIMICAS POR WGA.

<u>Antígeno (SRBC)</u>	<u>Origen de la actividad auxiliar</u>	<u>PFC anti-SRBC/cultivo</u>
+	medio	300
+	SN WGA 4,5µg/ml	1760
+	SN WGA 13,5µg/ml	9206
-	SN WGA 13,5µg/ml	280
+	WGA 0,5µg/ml	493
+	WGA 1,5µg/ml	440
+	WGA 4,5µg/ml	8900
+	WGA 13,5µg/ml	3666
+	WGA 40µg/ml	273
-	WGA 4,5µg/ml	350

Células de bazo de ratones atímicos se cultivaron durante 5 días en presencia de antígeno (SRBC) y de WGA o de sobrenadantes de cultivos estimulados con WGA.

Los resultados de estos experimentos indican que la WGA no induce la producción de TRF por las células T del primer cultivo sino que actúa conjuntamente con el antígeno en la estimulación de las células B directamente o a través de los macrófagos. En este sentido, sería posible que la cooperación entre los distintos componentes del SI (B, T y macrófagos) para la activación de las células B frente a antígenos TD podría realizarse en ausencia de células T o productos derivados de ella, bien debido a que los macrófagos reemplacen su papel en dicha colaboración o mediante factores directamente mitogénicos para las células B.

III.11.3. Inhibición de la actividad auxiliar de WGA por N-acetil-glucosamina (NAGA).

El grupo receptor para WGA en la membrana celular está compuesto principalmente por restos de NAGA (192). La presencia en el cultivo in vitro de este compuesto bloquea la interacción entre WGA y su receptor en la membrana celular. Para analizar esta posibilidad, evaluamos la actividad auxiliar de WGA utilizando distintas concentraciones de NAGA en cultivos Mishell-Dutton.

Los resultados de la tabla 29 demuestran que a una concentración del 1% de NAGA en el cultivo se obtiene una reduc-

TABLA 29

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE NAGA EN LA ACTIVIDAD AUXILIAR
DE WGA.

<u>ACTIVIDAD AUXILIAR</u>	<u>% NAGA en CULTIVO</u>	<u>PFC anti-SRBC/ CULTIVO</u>
WGA 4,5 µg/ml	—	8820
WGA 4,5 µg/ml	0,5	550
WGA 4,5 µg/ml.	1	346
WGA 4,5 µg/ml	2	133
WGA 4,5 µg/ml	3	20

Células de bazo de ratones atímicos se cultivaron en presencia de SRBC y concentraciones óptimas (4,5µg/ml) de WGA, añadiéndose distintas cantidades de N-acetil-glucosamina.

ción del 97% de la actividad auxiliar, respecto a cultivos control.

En paralelo, se hicieron experimentos para determinar si esta reducción de la actividad auxiliar podría deberse a que las concentraciones utilizadas de NAGA resultasen tóxicas para las células. La posible toxicidad de NAGA se comprobó en dos sistemas: 1) la estimulación de células de ratones atímicos por LPS y 2) en cultivos Mishell-Dutton se células de ratones normales en presencia de antígeno.

En ninguno de los dos sistemas (tabla 30) resultaron ser tóxicas las concentraciones de NAGA utilizadas para inhibir un 97% de la actividad WGA (1%). Sin embargo, una concentración de NAGA de 2,5% inhibió totalmente la estimulación en ambos sistemas. En los siguientes experimentos se utilizó siempre una concentración de 1% de NAGA para inhibir la actividad auxiliar del WGA.

III.11.4. Influencia de NAGA en la actividad auxiliar de los ConA-TRFs.

Como ya describimos anteriormente, los factores producidos por células T estimuladas por ConA (ConA-TRF) actúan sobre receptores de las células B, induciendo su diferenciación y proliferación en presencia de antígeno.

TABLA 30

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NAGA EN LA ESTIMULACION MITOGENICA Y ANTIGENICA DE CELULAS B.

A. Activación mitogénica

<u>Células en cultivo</u>	<u>Mitógeno</u>	<u>% NAGA</u>	<u>PFC IgM/cultivo</u>
C57Bl/6J atímicos	LPS	—	35333
"	"	0,5	32420
"	"	1	31833
"	"	2,5	2746
"	"	5	0

B. Activación antigénica

<u>Células en cultivo</u>	<u>Antígeno</u>	<u>% NAGA</u>	<u>PFC anti-SRBC/cultivo</u>
C57Bl/6J	SRBC	—	13773
"	"	0,1	13500
"	"	0,5	13620
"	"	1	12083
"	"	2,5	313
"	"	5	53

Células de bazo de ratones atímicos (A) o normales (B) se cultivaron en presencia de LPS (50µg/ml) o SRBC, respectivamente. La respuesta inducida se midió por el número de PFC-IgM (A) o PFC anti-SRBC (B).

La actividad de la lectina WGA presenta características similares a las de los ConA-TRFs en cuanto a su actividad policlonal, al menos para los antígenos testados (SRBC y HRBC). La posibilidad de que el WGA activase a las células B a través del mismo receptor que los ConA-TRFs, podría explicar la actividad de WGA en cultivos de células B. En este caso, la actividad de los factores producidos por ConA, debería inhibirse en presencia de NAGA. En la tabla 31, se muestran resultados de tales experimentos, en los que claramente se demuestra que las concentraciones no tóxicas de NAGA no afectan en absoluto la actividad del TRF sobre células B en presencia del antígeno. En los controles en los que se utilizó WGA, la actividad se inhibió en un 96%.

Así pues, de los resultados obtenidos puede deducirse que la lectina WGA y los ConA-TRFs actúan sobre las células B bien a través de distintos receptores o a través de distintas regiones del mismo receptor.

III.11.5. Requerimiento de macrófagos en la actividad auxiliar del WGA.

En la tabla 32, se observa que tras la eliminación de los macrófagos por adherencia a Sephadex G-10, la lectina WGA no es capaz de activar las células B en presencia de

TABLA 31

INFLUENCIA DEL NAGA EN LA ACTIVIDAD DE LOS ConA-TRFs.

<u>Actividad auxiliar</u>	<u>% NAGA</u>	<u>PFC anti-SRBC/ cultivo</u>
—	—	280
ConA-TRF 60%	—	10840
ConA-TRF 60%	0,5	11926
ConA-TRF 60%	1	10026
ConA-TRF 60%	2	300
WGA 4,5µg/ml	—	8673
WGA 4,5µg/ml	1	346

Células de bazo de ratones atímicos se estimularon en presencia de SRBC con WGA o ConA-TRF, añadiéndose al cultivo distintas cantidades de N-acetil-glucosamina.

TABLA 32

ACTIVIDAD DE LA LECTINA WGA EN CULTIVOS EN AUSENCIA DE MACROFAGO.

<u>Actividad auxiliar</u>	<u>Sephadex G-10</u>	<u>PFC anti-SRBC/ cultivo</u>
—	—	420
WGA 4,5 µg/ml	—	8673
WGA 13,5 µg/ml	—	6500
WGA 4,5 µg/ml	+	180
WGA 13,5 µg/ml	+	100
ConA-TRF 60%	—	7840
ConA-TRF 90%	—	10826
ConA-TRF 60%	+	7206
ConA-TRF 90%	+	9666

Células de bazo de ratones se filtraron por Sephadex G-10 antes de cultivarse en presencia de antígeno y WGA o ConA-TRF.

antígeno. Como control, se determinó la respuesta al mismo antígeno en presencia de ConA-TRF, no observándose ninguna reducción en dicha respuesta, como ya se había demostrado en III.7. La ausencia de actividad mitogénica de WGA sobre células B en presencia de macrófagos (208), apoya los datos referentes al requerimiento de macrófagos en la actividad auxiliar de WGA, puesto que dicha actividad auxiliar no sería mediada por señales mitogénicas derivadas del macrófago o del WGA sino por la interacción de macrófagos y células B en presencia de WGA. Las diferencias en el requerimiento de macrófagos de las actividades auxiliares de los ConA-TRFs y WGA puede explicar la distinta capacidad de la NAGA para inhibir dichas actividades.

III.11.6. Caracterización de la actividad auxiliar de los sobrenadantes inducidos por WGA.

La estimulación de linfocitos B por WGA requiere, además la presencia en el cultivo de macrófagos. Puede suponerse que los macrófagos son activados por WGA, liberando factores que, a su vez, activen a las células B en presencia del antígeno, o por el contrario, que la lectina WGA y los macrófagos actúen conjuntamente en la activación de las células B.

III.11.6.1. Inhibición por NAGA. En la tabla 33a puede observarse que al contrario de la inhibición por NAGA de la actividad de la WGA en cultivos Mishell-Dutton, solamente parte (40%) de la actividad auxiliar de sobrenadantes de WGA (obtenidos de cultivos de células de ratones atímicos), es inhibida por 1% de NAGA. La fracción de actividad auxiliar inhibida puede deberse al bloqueo de la lectina WGA presente en el primer cultivo y que es transferida al segundo cultivo. La actividad auxiliar no inhibida por NAGA sería debida a la inducción en el primer cultivo de factores liberados por macrófagos que activan a las células B en presencia de antígeno.

III.11.6.2. Cinética de inducción de la actividad auxiliar. La tabla 33b muestra la actividad de distintos sobrenadantes inducidos por WGA después de 12, 24, 36, 48 y 72 horas de incubación en cultivos de células de bazo de ratones atímicos. Como puede observarse, la actividad auxiliar aumenta con el tiempo de incubación, lo que indicaría que dicha actividad no es debida solamente a una simple transferencia de la WGA al segundo cultivo, sino que dicha lectina interacciona con los macrófagos del primer cultivo y facilita la producción de factores que activan a las células B en el segundo cultivo. Asimismo, se realizaron experimentos mezclando sobrenadantes obtenidos a distintas horas, en los

TABLA 33

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SOBRENADANTES PRODUCIDOS
POR WGA.

A. Inhibición por NAGA.

<u>Actividad auxiliar</u> <u>(24 horas cultivo)</u>	<u>% NAGA</u>	<u>PFC anti-SRBC/</u> <u>cultivo</u>
—	—	500
SN de células de ratones atímicos WGA 13,5	—	5700
"	1	3800
"	2,5	86

B. Cinética de producción.

<u>Actividad auxiliar</u>	<u>PFC anti-SRBC/</u> <u>cultivo</u>
—	300
SN WGA 13,5 a 22 horas	5306
" 24 horas	5346
" 36 horas	7880
" 48 horas	7786
" 72 horas	8320
" 72/36 horas	5093
" 72/36 horas	8080

Células de bazo de ratones atímicos se estimularon con sobrenadantes (SN) de WGA producidos en células de ratones atímicos en las condiciones que se señalan. La actividad auxiliar se comprobó en el segundo cultivo (con la adición de NAGA en la tabla A) en la forma habitual.

que se llegó a iguales resultados.

III.11.6.3. Activación de las células B por sobrenadantes de líneas de macrófagos estimulados por WGA.

Diferentes líneas de macrófagos cultivadas in vitro se estimularon con WGA y los sobrenadantes obtenidos se añadieron (con o sin 1% de NAGA) a cultivos Mishell-Dutton con SRBC. La tabla 34 muestra que solamente algunas líneas de macrófagos (2-2) y macrófagos peritoneales producen factores capaces de activar a las células B del segundo cultivo, lo que se demuestra por la actividad residual al añadir un 1% de NAGA a los segundos cultivos.

Estos resultados y los señalados en III.11.6.1., indican que la liberación de factores por parte de macrófagos activados por WGA que pueden estimular células B junto con el antígeno. De los experimentos reseñados, no puede descartarse la posibilidad de que las células B se activen directamente por WGA en presencia de macrófagos.

TABLA 34

ACTIVIDAD AUXILIAR DE SOBRENADANTES DE MACROFAGOS ESTIMULADOS
POR WGA.

<u>Actividad auxiliar</u>	<u>% NAGA</u>	<u>PFC anti-SRBC/ cultivo</u>
—	—	373
SN línea A-3 WGA	—	480
SN línea A-3 WGA	1%	140
SN línea Row 8 WGA	—	1880
SN línea Row 8 WGA	1%	220
SN línea 2-2 WGA	—	7280
SN línea 2-2 WGA	1%	1330
SN macrófagos de exu- dado peritoneal WGA	—	4160
SN macrófagos de exu- dado peritoneal WGA	1%	2620
WGA	—	8500

IV. DISCUSION

La respuesta inmune a antígenos TD requiere la colaboración entre distintos componentes celulares del SI (linfocitos B, linfocitos T y macrófagos). El reconocimiento del antígeno por la célula T, el papel de los macrófagos en dicho proceso y la señal (o señales) que inducen la activación de la célula B productora de anticuerpos, son los puntos básicos de dicha cooperación. Ha sido ampliamente demostrado que la colaboración entre distintas células no requiere su contacto físico, sino que puede llevarse a cabo por factores solubles liberados por las células activadas.

En el presente trabajo hemos estudiado la actividad y especificidad de factores que son producidos por estimulación policlonal (ConA) de linfocitos T y que son capaces de reemplazar a estas células en la respuesta a antígenos TD. Igualmente, se han comparado las propiedades de los factores TRF y TGF presentes en los sobrenadantes de células estimuladas con ConA, a fin de determinar si sus actividades residen en la misma o distinta molécula. Por último, hemos estudiado la capacidad de la lectina WGA para reemplazar a las células T en la respuesta de las células B a antígenos TD.

Los ConA-TRFs son producidos por linfocitos T (T_H) al ser activados policlonalmente por ConA (III.3.). Estos facto

res son capaces de restituir la respuesta de células de ratones atímicos a antígenos TD al comunicar a la célula B la señal necesaria para su activación en presencia del antígeno, proceso que en ratones normales llevan a cabo los linfocitos T. La especificidad antigénica viene determinada por la presencia del antígeno en el cultivo, siendo la magnitud de la respuesta dependiente de la cantidad de ConA-TRF añadida al cultivo. Según la teoría de Coutinho y Moller (44, 45) para la activación de los linfocitos B, se requiere que estos reconozcan el antígeno por su receptor específico (Ig) y al mismo tiempo que reciban un estímulo mitogénico (receptor mitogénico) que en nuestro sistema es proporcionado por los ConA-TRFs. En el presente trabajo se ha demostrado que el receptor para los ConA-TRFs se encuentra en las células B, no siendo necesaria la presencia de otras células accesorias (macrófagos) para la estimulación de las células B por dichos factores (III.7.).

Los ConA-TRFs se han considerado tradicionalmente como factores inespecíficos, al revelarse su actividad auxiliar en la respuesta a distintos antígenos. Los datos presentados en el presente trabajo demuestran que los sobrenadantes de células T estimuladas con ConA son una mezcla policlonal de actividades auxiliares individuales con distinta especificidad.

La especificidad antigénica de la actividad auxiliar de

los ConA-TRFs puede demostrarse enriqueciendo o eliminando las células T específicas para el antígeno en la población celular utilizada para producir los ConA-TRFs (III.4.), aunque no mediante absorción de dicha actividad en el antígeno (III.5.). Así, la estimulación con ConA de células T activadas específicamente con un determinado antígeno, induce la producción de un TRF que presenta actividad auxiliar específica para la anterior antígeno. Por el contrario, cuando se estimula con ConA células específicamente seleccionadas por la ausencia de linfocitos T específicos para un antígeno, el TRF producido no es capaz de restituir la respuesta de ratones atímicos para dicho antígeno (III.4.).

Watson, Aarden y Lefkovits (comunicación personal) han obtenido igualmente resultados que favorecen la hipótesis de la mezcla policlonal de actividades específicas de los ConA-TRFs. Estos autores, limitando el número de células T en cultivo para producir TRFs, han demostrado que la actividad auxiliar de tales sobrenadantes, segrega independientemente para los antígenos SRBC y HRBC.

Todos los datos mostrados parecen indicar la existencia de una estrecha relación entre el receptor antigénico de los linfocitos T y los ConA-TRFs. La distribución clonal de dichos receptores (194) y la mezcla policlonal de distintas

especificidades encontradas en los TRFs, constituyen la base de dicha relación. Así, los ConA-TRFs podrían representar los receptores antigénicos de las células T que son liberados al medio de cultivo al ser dichas células activadas policlonalmente por ConA.

La especificidad antigénica de los ConA-TRFs ha podido demostrarse con los experimentos de absorción (III.5.). Así, una fracción importante (70-90%) de la actividad auxiliar de los TRFs preparados a partir de células T no seleccionadas, presenta especificidad por complejos antígeno-anticuerpo. Dicho fenómeno, no puede reflejar simplemente algún tipo de afinidad de las moléculas de TRF por dichos complejos, ya que la absorción es específica no pudiendo ser absorbida sobre complejos irrelevantes. La especificidad de los TRFs debe estar dirigida hacia determinantes antigénicos presentes en los complejos antígeno-anticuerpo, posiblemente hacia determinantes idiotípicos de las moléculas de anticuerpo. Las pequeñas e inconsistentes reducciones no específicas de la actividad auxiliar observada en algunos experimentos puede ser reflejo de reactividad cruzada a nivel idiotípico entre anticuerpos anti-SRBC y anti-HRBC. Esta interpretación también se correlaciona con la aparente especificidad observada en nuestros experimentos, ya que la especificidad por un idiotipo debería necesariamente reflejarse como especificidad para el antígeno reconocido

por los correspondientes anticuerpos.

La posibilidad de que la disminución de la actividad auxiliar observada después de la absorción sobre complejos antígeno-anticuerpo no fuera debida a una eliminación específica de la actividad para dicho antígeno, sino a la transferencia de anticuerpo IgM que inhibiera el cultivo Mishell-Dutton, parece muy improbablemente ya que ha sido descrito que dicha Ig aumenta la respuesta específica (209). Por otra parte, esta propiedad puede excluirse de acuerdo con distintos experimentos (III.6.). En particular, aquellos en los que una mezcla de sobrenadantes absorbidos y no absorbidos no indujo ninguna reducción en la actividad auxiliar del TRF no absorbido. Fueron igualmente concluyentes los experimentos en los que se utilizaron anticuerpos monoclonales para la formación de complejos. Dichos complejos no fueron capaces de absorber la actividad auxiliar de los TRFs, no observándose en este caso ningún tipo de inhibición por los anticuerpos. La incapacidad de los complejos formados por anticuerpos monoclonales de absorber la actividad de los factores puede explicarse por el hecho de que la respuesta anti-SRF no está restringida a una única especificidad idiotípica.

Debe, sin embargo, destacarse que tanto la actividad

auxiliar de los ConA-TRFs como la fracción de esta actividad que pueda absorberse en complejos, es dependiente de las condiciones de preparación de dichos factores. Así, dicha fracción es más alta cuando la activación de las células T con ConA se lleva a cabo en presencia de linfocitos B (III.8.) Estos datos indicarían la existencia de algún tipo de interacción entre las células T con actividad antiidiotípica y las células B portadoras de dichas estructuras idiotípica.

Es importante destacar que en casi todos los experimentos realizados, una fracción de la actividad auxiliar permanece en los sobrenadantes después de las absorciones sobre el antígeno y sobre los complejos (III.5.). Esta actividad podría reflejar la presencia en los sobrenadantes de algún factor no específico, que sería producido al mismo tiempo (¿Por una célula distinta?) que los ConA-TRFs. En este sentido, también sería posible que nuestras condiciones de absorción no fueran lo suficientemente efectivas como para eliminar todas las actividades específicas. En cualquier caso, la gran variedad en cuanto a características moleculares y origen celular asignadas a los distintos factores que son capaces de activar las células B, permite considerar como muy probable la coexistencia de productos específicos y no específicos (206).

Por otra parte, junto a los ConA-TRFs se producen otros factores, cuyo papel no es de activación de las células B, si-

no de los linfocitos T (III.10). Estos factores denominados TGF, son capaces de mantener el crecimiento de las células T in vitro indefinidamente y son producidos en idénticas condiciones que los ConA-TRF. Sin embargo, en los experimentos anteriores (III.10) se demuestra que ambas actividades, TRF y TGF, pueden identificarse sobre moléculas distintas. Si bien ambas poseen un peso molecular comprendido entre 20-30.000 daltons, existen diferencias en cuanto a sus pI, y además, la actividad TGF es absorbida sobre blastos T, mientras que dicho proceso no altera la actividad TRF.

La actividad anti-idiotípica demostrada para los ConA-TRF in vitro, se correspondería in vivo con el hecho de que las células T reconocerían el antígeno formando complejos con anticuerpos específicos. Esta premisa exige la existencia en el animal de anticuerpos específicos producidos con anterioridad al contacto con el antígeno externo. Este tipo de anticuerpos ha sido denominado anticuerpos naturales, y aunque su existencia se acepta generalmente, no se habían realizado anteriormente análisis cualitativos o cuantitativos de tales anticuerpos. Los experimentos aquí descritos demuestran que la existencia de anticuerpos naturales es independiente de la presencia de estímulos antigénicos, ya que dichos anticuerpos pudieron cuantificarse en distintos órganos linfoides de ratones gnotobióticos. Del mismo modo, la frecuencia de precursores específicos para distintos antígenos resultó ser muy similar en rato-

nes gnotobióticos y en ratones mantenidos en condiciones normales. Si bien el origen de células productoras de anticuerpos naturales no ha podido ser determinado, se podrían considerar al menos dos mecanismos que dieran cuenta tanto de su origen como de su control. De una parte estas AFC naturales podrían ser debidas a la activación de células B por mitógenos endógenos a través del receptor mitogénico. En este sentido, son importantes las observaciones descritas por Andersson y col. (210) acerca de las propiedades mitogénicas de moléculas de IgG sobre células B, aisladas de suero de ratones normales. La existencia de estos anticuerpos con propiedades estimuladoras, podrían ser un mecanismo por el cual las células B podrían autoestimularse y así controlar el desarrollo de los distintos clones que forman la población de linfocitos B. Otra posibilidad sería que las células productoras de anticuerpos naturales se originasen como consecuencia de la propia regulación del SI por las interacciones idiotipo-anti-idiotipo propuestas por Jerne (155,156,159). Así, los anticuerpos naturales reconocerían determinantes antigénicos endógenos en otras moléculas de anticuerpo (idiotipo) lo que conduciría a la activación de las células B por su receptor específico (Ig) estableciéndose un equilibrio dinámico entre los distintos clones de linfocitos B. Este proceso es independiente de la presencia de antígenos externos, lo que se pone de manifiesto al comprobar que la frecuencia de precursores para dichos an-

tígenos es igual en animales normales que en gnotobióticos.

Si bien el estudio de la actividad de los ConA-TRFs en la cooperación entre linfocitos T y B in vivo presenta dificultades, al no estar estos factores sometidos a restricción H-2, la determinación tanto de sus especificidades como de su actividad anti-idiotípica, puede ayudar al esclarecimiento de dichas interacciones T-B, así como plantear nuevas cuestiones acerca del reconocimiento antigénico de las células T y del conjunto de sus especificidades. De acuerdo con los resultados obtenidos, puede asumirse que la especificidad de las células T_H es debida al reconocimiento no de la molécula del antígeno sino de idiotipos en los complejos antígeno-anticuerpo específicos. La inmunización de las células T y la fase efectora del proceso de colaboración ocurren necesariamente en presencia de anticuerpos, al menos de aquellos presentes en la membrana de la célula B. Aceptando además, el hecho de que en cualquier momento los anticuerpos naturales circulantes son una representación de la diversidad y frecuencia de células precursoras, puede calcularse que para cualquier especificidad antigénica los anticuerpos circulantes están siempre en gran exceso sobre los que aparecen como receptores específicos de la célula B.

Distintos autores (211) han establecido que las células

T no reconocen al antígeno en forma soluble. En este sentido, podría pensarse que las células T reconocen bien el antígeno unido a la célula B por los receptores específicos (Ig) o sobre la superficie de los macrófagos, donde el antígeno aparece con mayor frecuencia unido en forma de complejos. Estos argumentos podrían sugerir que, en efecto, las células T reconocen complejos antígeno-anticuerpo específico (idiotipos) como forma de reconocimiento específico. Debe, sin embargo, destacarse que la relación entre idiotipos y sitios de unión del antígeno no aparece ser perfecta. Así, desde la descripción original por Oudin y Cazenave (13), otras observaciones han confirmado que el idiotipo de un determinado anticuerpo puede encontrarse en otras moléculas de Ig con distinta especificidad. Sin embargo, la mayoría de los experimentos llevados a cabo con células T_H , no están realizados de forma que pudieran permitir poner de manifiesto dichas moléculas. De hecho, en la mayor parte de los experimentos sobre reconocimiento antigénico de las células T_H , con excepción de los descritos por Ward y col. (82) y recientemente por Woodlan y Cantor (174), la especificidad de tales células para el antígeno, no puede separarse de una posible especificidad por complejos formados por antígeno y anticuerpos específicos. Recientemente, Eichman y col. (175,176), han realizado un análisis exhaustivo del problema del reconocimiento de las células

T, concluyendo que la actividad auxiliar anti-idiotípica es un requerimiento necesario en la colaboración entre las células T y B que reconocen el mismo determinante antigénico.

El reconocimiento de idiotipos específicos por parte de las células T, apoyaría un gran número de observaciones. Por ejemplo, la existencia de células T que reconocen idiotipos propios (212) y otros experimentos recientes realizados bajo condiciones particulares que demuestran la existencia de una proporción extremadamente alta de células T con aparente especificidad para un idiotipo (213). Del mismo modo, la demostración de células T_H restringidas para el idiotipo (82) así como el hecho de que un clon de células T colabore exclusivamente con un único clon de células B, incluso en presencia de otras células B precursoras con la misma especificidad (125,197), podrían explicarse sobre la base de una especificidad anti-idiotípica en las células T_H .

De otro lado, parece posible que las células T_H con especificidad anti-idiotípica coexistieran con otras antígeno-específicas, según puede desprenderse de los experimentos de Janaway y col. (196). Las condiciones particulares de cada experimento, junto con el estado fisiológico del SI en el momento de la inmunización, determinarían que tipo de especificidad debe predominar en la respuesta de las células T_H .

Si, como propuso Jerne (156), el universo de antígenos es igual al universo de idiotipos, las hipótesis anteriores no plantean nuevos requerimientos en el repertorio del reconocimiento de las células T, aunque sí se alterarían algunos postulados sobre los mecanismos de cooperación celular. Las dificultades en conseguir tanto el "suicidio antigénico" como la absorción de poblaciones puras de células T_H a inmunoabsorbentes conteniendo el antígeno, podrían deberse a no considerar las especificidades adecuadas, ya que dichas células T_H tendrían especificidad anti-idiotípica. Así, las células T_H capaces de "suicidarse" en presencia del antígeno A, reconocerían los idiotipos X e Y que no son anti-A. De aquí se desprende que un suicidio antigénico efectivo ocurriría sólo en la respuesta a los antígenos reconocidos por los anticuerpos X e Y, ya que la actividad auxiliar es de hecho anti-idiotípica. De acuerdo a esta hipótesis, debería ser posible "suicidar" o eliminar a las células T_H usando anticuerpos específicos (o complejos) para dicho antígeno, en lugar del propio antígeno. Han sido ya descritas algunas observaciones que confirman esta predicción (108,174, Loblay y Basten, comunicación personal).

De acuerdo con los postulados descritos, referente a la posible existencia de células T anti-idiotipo y células T anti-antígeno, sería de esperar en un sistema de activación policlonal de las células T, que los productos derivados de

estas fueran una mezcla de especificidades anti-idiotípicas y antígeno-específicas. La imposibilidad de demostrar en el presente trabajo la absorción en el antígeno de la actividad TRF puede explicarse por: 1) dichos productos específicos para el antígeno, existen en los sobrenadantes inducidos por ConA pero no desempeñan ningún papel demostrable en nuestro sistema; 2) como indican los experimentos de la tabla 16, las condiciones del cultivo y el tipo de células accesorias presentes en la estimulación por ConA, podrían determinar la activación de un determinado tipo de células. Esto significaría que, en nuestras condiciones, las células T_H específicas para el antígeno no son activadas por ConA y 3) es posible que las células T_H no reconozcan todo el universo de idiotipos, y consecuentemente de antígenos, sino solamente una fracción. Esto podría deberse a la continua estimulación de las células T_H por idiotipos propios y, por tanto, no ser debida ni a restricciones a nivel genético ni a la generación de diversidad de las células T_H , sino más bien a la selección de los clones generados al azar. Alternativamente, los idiotipos propios más relevantes podrían influenciar la generación del conjunto de especificidades de las células T, ya que este proceso parece evolucionar mediante el reconocimiento de estructuras propias en un determinado momento de la ontogenia celular (166,167).

Los resultados expuestos en la tabla 28 indican que no sólo los TRFs producidos por estimulación con ConA de los linfocitos T son capaces de reemplazar a estas células en la respuesta in vitro a antígenos TD, sino que la lectina WGA también presenta la capacidad de sustituir a las células T induciendo la producción de anticuerpos específicos por parte de las células B en presencia de antígeno. Se ha demostrado (III.11.4.) que la actividad auxiliar de la lectina WGA no es debida a su interacción con el receptor de los TRFs en las células B. Sin embargo, dicha actividad es dependiente de la presencia de macrófagos en el cultivo in vitro (Mishell-Dutton), situación que no es requerida en el caso de los TRFs, capaces de interaccionar directamente con la célula B. De estos resultados, podemos concluir que la interacción de la lectina WGA con sitios específicos en la superficie de los macrófagos, permite a las células B específicas para el antígeno, presentes en el mismo cultivo, proliferar y diferenciarse a células productoras de anticuerpos.

Han sido descritos factores liberados por los macrófagos con actividad auxiliar en la respuesta primaria anti-SRBC de cultivos celulares en ausencia de este tipo de células (214,215). Además, se ha demostrado que algunos productos liberados por los macrófagos presentan propiedades mitogénicas siendo capaces de activar directamente linfocitos T

y B (131,215,216). Es posible que la actividad WGA sea mediada por algún tipo de moléculas liberadas por los macrófagos. En este sentido se han presentado resultados que apuntan esta posibilidad: presencia en sobrenadantes de células de ratones atímicos o de líneas de macrófagos estimuladas por WGA de actividad auxiliar que no puede ser inhibida por N-acetil-glucosamina, azúcar que específicamente interacciona con los sitios activos de la lectina WGA. Sin embargo, esta posibilidad no puede disociarse de la actividad directa ejercida por la propia lectina.

Puede resultar contradictorio que mientras la lectina WGA no es un mitógeno (208), algunos resultados indican que la mayor parte de las PFC-IgM inducidas por WGA no son específicas para el antígeno presente en el cultivo. Sin embargo, esta estimulación policlonal es sólo aparente en condiciones de Mishell-Dutton (cultivos de alta densidad celular). Estos datos podrían explicarse si estas moléculas no fuesen mitógenos policlonales de células B sino que únicamente actuaran sobre aquellas células B que han reconocido el antígeno (217,218).

Es importante destacar el hecho de que la actividad TRF puede generarse en ausencia completa de células T por la interacción de la lectina WGA con los macrófagos. Los resul

tados presentados (III.11.6.) indican la necesidad de interpretar con precaución los datos obtenidos sobre el origen celular de los distintos factores auxiliares descritos, ya que normalmente estos mediadores solubles se preparan en condiciones en los que tanto las células T como los macrófagos pueden activarse. Hay que señalar, sin embargo, que la producción de TRF por estimulación policlonal de células T no se vio afectada después de eliminar los macrófagos de la población celular utilizada para la producción de dicho factor (III.3.2.).

Es necesario destacar la complejidad de las interacciones celulares que tienen lugar en el sistema in vitro de inducción de células B que se ha usado en el presente trabajo (Mishell-Dutton). Debido a que tantos factores liberados por las células T como por los macrófagos, así como otras moléculas que son capaces de activar directamente a las células B (mitógenos), pueden reconstituir la respuesta de células de bazo de ratones atímicos a SRBC, se hace necesario el estudio individual de cada uno de estos procesos de activación.

El hecho de que la lectina WGA estimule directamente a los macrófagos para cooperar con las células B, podría utilizarse tanto para estudiar la activación de los macrófagos como los mecanismos de cooperación que inducen la diferenciación de las células B. Por otra parte, la actividad anti-idío



típica descrita para los ConA-TRFs permite el estudio de la especificidad de la cooperación entre linfocitos T_H y linfocitos B.

En este sentido, existen evidencias que indican que los procesos de cooperación que inducen activación, crecimiento y maduración de las células B, dependen de dos grupos de señales que provienen de células accesorias (219). Las células T o productos derivados de ellas, parecen mediar actuando directamente sobre las células B, una fase posterior a la iniciación de la expansión y maduración clonal. La iniciación de estas respuestas, requiere sin embargo, el reconocimiento de los macrófagos por las células T, no habiendo aun sido demostrado cual de los dos tipos de células proporciona la señal capaz de activar a las células B.

Por último, hay que destacar el hecho de que la actividad anti-idiotípica del receptor de las células T supone un nuevo enfoque en el estudio de los sistemas de reconocimiento entre células T y B, así como en la autoregulación del SI por interacciones idiotipo anti-idiotipo. El reconocimiento de los idiotipos como forma de control de las interacciones entre células del SI, puede representar la base evolutiva sobre la que se apoya la generación y mantenimiento de la diversidad del SI durante su evolución.

V. CONCLUSIONES

- 1) La estimulación de células de bazo de ratón con ConA provoca la liberación por parte de las células T de factores (ConA-TRFs) que son capaces de reemplazar a dichas células T en la respuesta in vitro a antígenos TD.
- 2) Los ConA-TRFs son producidos por células T en estadio de pequeños linfocitos (no activadas), si bien dicha producción requiere la presencia simultánea de células B, siendo independiente de otras células accesorias (macrófagos).
- 3) La producción de ConA-TRFs no requiere división celular, lo que, junto a la especificidad que muestran, sugiere que son un componente habitual de la membrana celular de los linfocitos T, actuando posiblemente como receptor específico para el antígeno en dichas células.
- 4) La célula diana de la actividad TRF es el linfocito B, que es activado por dichos factores a través de receptores mitogénicos.
- 5) Los TRFs son una mezcla policlonal de distintas actividades con especificidad para las regiones variables de las Igs (especificidad anti-idiotípica).

6) La producción de TRFs con actividad anti-idiotípica requiere además de las células T la presencia en el cultivo de células que presentan idiotipos en la superficie celular (linfocitos B). Posiblemente se requiera la interacción entre ambas poblaciones celulares para la secreción del TRF al sobrenadante del cultivo.

7) Tanto en ratones normales como en atímicos y gnotobióticos, alrededor de un 1% de las células B se encuentran en estadios de maduración correspondiente a células plasmáticas productoras de anticuerpo. Estas AFC originadas en ausencia de estímulo antigénico externo dan cuenta de la existencia de los anticuerpos naturales.

8) La frecuencia de precursores específicos para distintos antígenos encontrada en ratones gnotobióticos coincide con la calculada en ratones normales, lo que sugiere un mecanismo interno de control independiente del antígeno.

9) La importancia de estos anticuerpos naturales viene determinada por la especificidad de los linfocitos T para reconocer el antígeno unido a anticuerpos específicos (idiotipos), bien sobre la superficie del macrófago o como complejos circulantes.

10) La estimulación de células de bazo de ratón con ConA, induce igualmente la producción de un factor (TGF) que induce la proliferación indefinida de linfocitos T previamente activados.

11) Las actividades TRF y TGF parecen recibir sobre entidades moleculares distintas. Si bien ambas moléculas poseen muy parecido peso molecular, pueden distinguirse por su pI y sus diferentes absorciones sobre distintas subpoblaciones. Así, la actividad TGF se absorbe en un 90% sobre blastos T, mientras que dicha absorción no modifica la actividad TRF.

12) La lectina WGA bien directamente o a través de su interacción con los macrófagos, es capaz de inducir la proliferación de las células B en presencia de antígeno, reemplazando así la necesidad de la presencia de las células T en dicho proceso.

13) La cooperación celular en la respuesta inmune a antígenos TD es un proceso complejo, que requiere la interacción directa o a través de factores solubles entre distintas poblaciones celulares en las que si bien macrófagos o sus productos pueden activar a las células B, la especificidad de las interacciones entre dichas células y los linfocitos T ha de estudiarse a traves de factores liberados por estos (TRFs).

VI. BIBLIOGRAFIA

1. J. SPRENT (1977) En: "The Lymphocyte: Structure and Function". Ed. J.M. Marchalonis, Marcel Dekker, Inc., N.Y.
2. J.L. GOWANS y D.D. McGregor (1965) Progr. Allergy 9,1.
3. J.F.A.P. MILLER, A. BASTEN, J. SPRENT y C. CHEERS (1971) Cell. Immunol. 2, 469.
4. M.C. RAFF (1971) Transplant. Rev. 6, 52.
5. A. BASTEN, J.F.A.P. MILLER, J. SPRENT y J. PYE (1972) J. Exp. Med. 135, 610.
6. N.R. KLINMAN y J.L. PRESS (1975) Transplant. Rev. 24, 41.
7. A. NISSONOFF, J.E. HOPPER y J.B. SPRING (1975) Eds. En: "The Antibody Molecule" Acad. Press, N.Y.
8. J.A. GALLY (1973) En: "The Antigens" Vol. I. pp. 162, Ed. M. Sela, Acad. Press, N.Y.
9. D.R. STANWORTH y M.W. TURNER (1978) En: "Handbook of Experimental Immunology" Ed. D.M. Weir, Blackwell Scientific Publications.
10. L.A. HERZENBERG y L.A. HERZENBERG (1978) En: "Handbook of Experimental Immunology" Ed. D.M. Weir, Blackwell Pub.
11. G.M. EDELMAN y W.E. GALLY (1969) Ann. Rev. Biochem. 38, 415.
12. J. OUDIN (1966) Proc. Roy. Soc. Ser. B166, 207.
13. J. OUDIN y P.A. CAZENAVE (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2616.
14. R. KAROL, M. REICHLIN y R.W. NOBLE (1978) J. Exp. Med. 148, 1488.

15. G. MOLLER (1977) Ed. Immunol. Rev. 34.
16. J.D. CAPRA, C. BEREK y K. EICHMAN (1976) J. Immunol. 117,
7.
17. S. RUDIHOFF y J.L. CLAFLIN (1976) J. Exp. Med. 144, 1.
18. H. HENGARTNER y T. MEO (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
75, 4494.
19. S. TONEGAWA, C. BRACK, N. HOZUMI y V. PIRROTTA (1978)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., en prensa.
20. G. MOLLER (1978) Ed. Immunological Rev. 36.
21. A.J. CUNNINGHAM (1976) En: "Generation of Antibody Diver-
sity, Acad. Press.
22. M. COHN (1974) Progress. Immunology II.261
23. G. L. ADA y P. L. EY (1975)En : "The Antigens". Vol.III
pp. 190. Ed. M. Sela. Acad. Press. N.Y.
- 24 M. BURNET (1959) " The Clonal Selection Theory of Acquired
Immunity ". University Press.
25. B. PERNIS, L.FORNI y L. AMANTE(1970) J. Exp. Med.132,1001.
26. O. TONDER, B. LARSEN, D. AORSKOG y B. HANEBERG (1978)
Scand. J. Immunol. 7, 245.
27. C. MARTINEZ ALONSO, R. R. BERNABE, F. MELCHERS y A. COUTINHO,
(1979) sometido a publicación.
28. B. PERNIS, L. FORNI y A.L. LUZZATI (1977) Cold Spring Har-
bor Symp. Quant. Biol. 41, 175.
29. E.S. VITETTA y J.W. UHR (1975) En: "Membrane Receptor of
Lymphocytes" pp. 27, Ed. M. Seligman, J.L. Pred'home y
Kourilsky.

30. D.E. SCOTT, J.E. LAYTON y G.J.V. NOSSAL (1977) J. Exp. Med. 146, 1473.
31. J. ANDERSSON, O. SJOBERG y G. MOLLER (1972) Transp. Rev. 11, 131,
32. L.FORNI y A. COUTINHO (1978) Eur. J. Immunol. 8, 56.
33. A. COUTINHO, L. FORNI y T. WATANABE (1978) Eur. J. Immunol. 8, 63.
34. J.S. TUNG, J. MICHAELSON, H. STATO, E.S. VITETTA y E.A. BOYSE (1977) Immunog. 5, 485.
35. A. COUTINHO, B. BLOMBERG y L. FORNI (1978) J. Exp. Med. 148, 862.
36. J. ANDERSSON, A. COUTINHO y F. MERCHERS (1978) Eur. J. Immunol. 8,
37. J. ANDERSSON y F. MELCHERS (1977) En: "Dynamic Aspects of Cell Surface Organization" Ed. G. Poste y G.L. Nicolson, North Holland.
38. L. FORNI y A. COUTINHO (1978) Nature 273, 304.
39. G. MOLLER (1975) Ed. Transpl. Rev. 23.
40. P.A. BRETSCHER y M. COHN (1970) Science 169 1042.
41. P.A. BRETSCHER (1977) En: "B and T Cells in Immune Recognition" pp. 457, Ed. F. Loor y G.E. Roelants, John Willey and Sons.
42. R. EPSTEIN y M. COHN (1978) Cell. Immunol. 39, 110.
43. M. COHN y R. EPSTEIN (1978) Cell. Immunol. 39, 125.
44. A. COUTINHO, E. GRONOWICZ, W.W. BULLOCK y G. MOLLER (1974) J. Exp. Med. 139, 74.

45. A. COUTINHO y G. MOLLER (1973) Nature 245, 12.
46. D.H. ZIMMERMAN, S. GREGORY y M. KERN (1977) J. Immunol. 119, 1018.
47. A. COUTINHO, G. MOLLER y G. GRONOWICZ (1975) J. Exp. Med. 142, 253.
48. G. MOLLER (1978) Scand. J. Immunol.
49. T. DIAMANSTEIN, E. BLITSTEIN-WILLINGER y G. SCHULZ (1974) Nature 250, 596.
50. E. GRONOWICZ y A. COUTINHO (1974) Eur. J. Immunol. 4, 771.
51. F. MELCHERS, H. VON BOEHMER y R.A. PHILLIPS (1975) Transp. Rev. 25, 26.
52. J.J. JENNINGS y M.B. RITTENBERG (1976) J. Immunol 117, 1749.
53. D.E. MOSIER, J.J. MOND y E.A. GOLDINGS (1977) J. Immunol. 119, 1974.
54. J.H.L. PLAYFAIR y E.C. PURVES (1971) Nature 231, 149.
55. R.K. GERSHON (1974) Contemp. Topics in Immunobiol. 3, 1.
56. G.K. LEWIS, R. RANKEN, D.E. NITECKI y J.W. GOODMAN (1976) J. Exp. Med. 144, 382.
57. G.K. LEWIS y J.W. GOODMAN (1977) J. Exp. Med. 146, 1.
58. B. HURDY, E. MOZES y D. DANON (1976) Immunology 30, 261.
59. F. DIAZ DE ESPADA, C. MARTINES ALONSO y R. R. BERNABE (1978) J. Immunol. 121, 13.
60. C. MARTINEZ ALONSO, R.R. BERNABE y F. DIAZ DE ESPADA (1979) Cell. Immunol., en prensa.
61. I. LEFKOVITS y H. WALDMAN (1977) Immunol 32, 915.

62. J. KLEIN (1975) En: "Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex, Springer Verlag, Berlin.
63. D.C. SHREFFLER (1977) Prog. Immunol. III, 311.
64. M.O. McDEVITT, B.D. DEAK, D.C. SHREFFLER, J. KLEIN, J.H. STIMPFLING y G.D. SNELL (1972) J. Exp. Med. 135, 1259.
65. T. MEO, T. KRASTEFF and D.C. SHREFFLER (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4536.
66. J. KLEIN, V. HAUPTFELD y M. HAUPTFELD (1975) Immunogenetics 2, 141.
67. J. MILLER (1978) Adv. Canc. Research 29.
68. E.A. BOYSE y D. BENNETT (1974) En " Cellular Selection and Regulation in the Immune Response. Ed. G.M. Edelman, Raven, N.Y.
69. H. CANTOR y E.A. BOYSE (1977) Contemp. topics Immunobiol. 7.
70. A.E. REIF y J.M.V. ALLEN (1963) Nature 200 1332.
71. K. IKATURA, J. HUNTON, E.A. BOYSE y L.J. OLD (1971) Nature 230, 126.
72. E.S. VITETTA, J.W. UHR y E.A. BOYSE (1974) Eur. J. Immunol. 4, 276.
73. D.H. KATZ (1977) En: "Lymphocyte Differentiation, Recognition and Regulation, Acad. Press, N.Y.
74. H. CANTOR y E.A. BOYSE (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 23.

75. G.D. SNELL (1977) Immunol. Rev. 38, 3.
76. M. FELDMAN, P.C.L. BEVERLEY, J. WOODY, J.F.C. MCKENZIE (1977) J. Exp. Med. 145, 793.
77. K. OKUMURA, D.B. MURPHY, L.A. HERZENBERG, H.O. McDEVITT y L.A. HERZENBERG (1978) En: "Ir Genes and Ia Antigens" Ed. M.O. Mc Devitt, Acad. Press, N.Y.
78. C.J. HAMMERLING, S.J. BLACK y K. EICHMAN (1976) En "Leucocyte Membrane Determinants Regulation Immune Response" Ed. U.P. Eijsvoogel, Acad. Press., N.Y.
79. N.J. BOSMA, G.C. BOSMAN y J.L. OWEN (1978) Eur. J. Immunol. 8, 562.
80. L.A. HERZENBERG, K. OKUMURA, H. CANTOR, V.I. SATO, V.W. SHEN, E.A. BOYSE y L.A. HERZENBERG (1976) J. Exp. Med. 144, 330.
81. M. KIMOTO, T. KISHIMOTO, S. NOGUCHI, T. WATANABE y Y. YAMAMURA (1977) J. Immunol. 118, 840.
82. K. WARD, H. CANTOR y E.A. BOYSE (1977) En: "The Immune System: Genetics and Regulation" Ed. E. Secarz, L. Herzenberg y C. Fox, Acad. Press, N.Y.
83. G. BONNARD y W.H. WEST (1977) En: "Immunodiagnosis of Cancer." Ed. R.B. Herberman y R.K. McIntire Marcel Dekker, New York.
84. R.B. HERBERMAN y H. HOLDEN (1978) Ad. Cancer Res. 27, 305
85. H. CANTOR y E.A. BOYSE (1975) J. Exp. Med. 141, 1376.
86. S. DORSH y B. ROSER (1977) J. Exp. Med. 145, 1144.

87. R.D. BARNES, E.J. WILLIS y M. TUFFREY (1975) J. Immunog. 2, 195.
88. P.C.L. BEVERLEY, J. WOODY, M. DUNKLEY, M. FELDMAN y I. MCKENZIE (1976) Mature 262, 495.
89. M. FELDMAN y S. KONTIANEN (1976) Eur. J. Immunol. 6, 302.
90. B. HUBER, F.W. SHEN, E.A. BOYSE y H. CANTOR (1976) J. Exp. Med. 144, 1128.
91. H. CANTOR, F.W. SHEN y E.A. BOSEY (1975) J. Exp. Med. 143, 1391.
92. R.E. CONE y W.C. BROWN (1976) Immunochem. 13, 571.
93. D.N. MISRA, C.T. LADOULIS, T.J. GILL and H. BAZIN (1976) Immunochemistry 13, 613.
94. B. BENACERRAF y H.O. McDEVITT (1972) Science 175, 273.
95. A.J. MUNRO, M.J. TAUSSIG, R. CAMPBELL, H. WILLIAMS y Y. LAWSON (1974) J. Exp. Med. 140, 1579.
96. D.H. KATZ y B. BENACERRAF, Eds. En: "The Role of Products of the MHC in Immune Response", Acad. Press, N.Y.
97. J.S. McDOUGAL y D.S. GORDON (1977) J. Exp. Med. 145, 671.
98. T. TADA, M. TANIGUCHI y C.S. DAVID (1976) J. Exp. Med. 144, 713.
99. J.A. KAPP, C.W. PIERCE y B. BENACERRAF (1977) J. Exp. Med. 145, 828.
100. H. BINZ y H. WIGZELL (1975) J. Exp. Med. 142, 1218.
101. M. RAFF, M. FELDMAN y S. DE PETRIS (1973) J. Exp. Med. 137, 1024.

102. H. BINZ y H. WIGZELL (1975) J. Exp. Med. 142, 1231.
103. H. BINZ y H. WIGZELL (1976) Scand. J. Immunol. 5, 559.
104. K. RAJEWSKY y R. MOHR (1974) Eur. J. Immunol. 4, 111.
105. K. EICHMAN y K. RAJEWSKY (1975) Eur. J. Immunol. 5
106. K. EICHMAN (1977) En: "The Immune System: Genetics and Regulation", Eds. Secarz, L.A. Herzenberg y F.C. Fox, Acad. Press.
107. U. KRAWINKEL, M. CRAMER, T. IMANISHI-KARI, R.S. JACK, K. RAJEWSKI y O. MAKELA (1977) Eur. J. Immunol. 7, 566.
108. A. BASTEN, J.F.A.P. MILLER y R. ABRAHAM (1975) J. Exp. Med. 141, 547.
109. P. MARRACK y J.W. KAPPLER (1978) J. Exp. Med. 147, 1596.
110. J.D. STOBO (1972) Transp. Rev. 11, 60.
111. T. WATANARE, C. GARRISON FATHMAN y A. COUTINHO (1977) Immunol. Rev. 35, 3.
112. J. JANDINSKI, H. CANTOR, T. TADAKUMA, D.L. PEAVY y C.W. PIERCE (1976) J. Exp. Med. 143, 1382.
113. H.Y. TSE y R.D. DUTTON (1977) J. Exp. Med. 146, 747.
114. C. MARTINEZ ALONSO, R.R. BERNABE, E. MORENO y F. DIAZ ESPADA (1978) J. Immunol. Meth. 22, 361.
115. E.L. LARSSON, J. ANDERSSON y A. COUTINHO (1978) Eur. J. Immunol. 8,
116. G.D. BONNARD, J.M. ALVAREZ, R.D. HERBERMAN, M.O. DE LANDAZURI y D.A. MORGAN (1978) En: "Human Lymphocyte Differentiation", Ed. B. Serrou y C. Rosenfeld, North Holland.

117. E.L. LARSSON, J. ANDERSSON y A. COUTINHO (1979) Some-
tido a publicación.
118. F.H. BACH, C.G. CORVALIN, O.J. KUPERMAN, B.J. ALTER y
M.L. BACH (1977) Immunol. Rev. 35, 76.
119. K. LINDALHL y J. SAFWENBERG (1971) En: Proc. of the VI
Leukocyte Culture Conference, Acad. Press.
120. F.H. BACH, M.L. BACH y P.M. SONDEL (1976) Nature 259, 273.
121. H. WALDMAN (1977) Immunol. Rev. 35, 121.
122. H. WALDMAN y A. MUNRO (1974) Immunol. 27, 53.
123. P. MARRACK y J.W. KAPPLER (1976) J. Immunol. 116, 1373.
124. T. TADA, T. TAKEMORI, K. OKUMURA, M. NONAKA y T. TAKUHISA
(1978) J. Exp. Med. 147, 446.
125. J.M. PHILLIPS y H. WALDMAN (1977) Nature 268, 641.
126. S.L. SWAIN, P.E. TREFTS, Y.S. TSE y R.W. DUTTON (1977)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41
127. R.M. ZINKERNAGEL, G.N. CALLAHAN , A. ALTHAGE, S. COOPER,
A. KLEIN y J. KLEIN (1978) J. Exp. Med. 147, 882.
128. R.M. ZINKERNAGEL, G.N. CALLAHAN, A. ALTHAGE, S. COOPER,
J.W. STREIFEIN y J. KLEIN (1978) J. Exp. Med. 147, 889.
129. P. ERB y M. FELDMAN (1975) J. Exp. Med. 142, 460.
130. E. WECKER, A. SCHIMPL, T. HUNING y L. KUHN (1975) Ann.
N.Y. Acad. Sci. 249, 258.
131. J.CALDERON, J.M. KIELY, J.L. LEFKO y E.R. UNANUE (1975)
J. Exp. Med. 142, 151.
132. A. SCHIMPL y E. WECKER (1972) Nature 237, 15.

133. R.R. BERNABE, C. MARTINEZ ALONSO y A. COUTINHO (1979)
Eur. J. Immunol., en prensa.
134. G. MULLER, L. HUBNER, A. SCHIMPL y E. WECKER (1978)
Immunochem. 15, 33.
135. D.H. KATZ, D. ARMERDING y Z. ESHLAR (1976) En:"The Role
of Products of the Histocompatibility Gene Complex in
Immune Response", Ed. D.H. Katz y B. Benacerraf, Acad.
Press.
136. M.J. TAUSSIG y A.J. MUNRO (1974) Nature 251, 63.
137. P. ERB y M. FELDMAN (1975) Eur. J. Immunol. 5, 759.
138. S. HABU y M.C. RAFF (1977) Eur. J. Immunol. 7, 451.
139. D.W. THOMAS, U. YAMASHITA y E.M. SHEVACH (1977) Immunol.
Rev. 35, 97.
140. P.E. LIPSKY y A.J. ROSENTHAL (1975) J. Exp. Med. 141, 138.
141. J. MILLER y M.A. VADAS (1977) Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. 41, 579.
142. P. ERB, B. MEIER, D. KRAUS, H. VON BOEHMER y M. FELDMAN
(1978) Eur. J. Immunol. 8, 768.
143. J.S. McDOUGAL y D.S. GORDON (1977) J. Exp. Med. 145, 693.
144. I. LEFKOVITS (1972) Eur. J. Immunol. 2, 360.
145. J. ANDERSSON, A. COUTINHO y F. MELCHERS (1977) J. Exp. Med.
145, 1520.
146. M. SCHERIER (1978) J. Exp. Med. 148, 1612.
147. J. ANDERSSON y F. MELCHERS (1975) En:"Cellular Selection
and Regulation of Immune Response", Ed. G.M. Edelman, Raven
Press, N.Y.

148. A.L. LUZZATI, I. LEFKOVITS y B. PERNIS (1973) Eur. J. Immunol. 3, 632.
149. B.A. ASKONAS, A.R. WILLIAMSON y B.E.G. WRIGHT (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1398.
150. M. TALAL (1977) Ed. En:"Autoimmunity: Genetic, Immunogenetic and Clinical Aspects", Acad. Press, N.Y.
151. D. PRIMI, L. HAMMARSTRAN, C.I.E. SMITH y G. MOLLER (1977) J. Exp. Med. 145, 21.
152. H. KOHLER (1975) Immunol. Rev. 27, 24.
153. N. BENACERRAF y R.N. GERMAIN (1978) Immunol. Rev. 38 70.
154. G. MOLLER, Ed. (1978) Immunol. Rev. 40.
155. N.J. JERNE (1975) Harvey Lecture (1976) 70, 93.
156. N.K. JERNE (1974) Ann. Immunol. 125C, 375.
157. J. URBAIN (1976) Ann. Immunol. 124C, 357.
158. H. BINZ y H. WIGZELL (1977) Prog. Allerg.
159. N.K. JERNE (1974) En:"Cellular Selection and Regulation in the Immune Response", Ed. G.M. Edelman, Raven Press, N.Y.
160. H. DICKLER (1974) Adv. Immunol. 24, 167.
161. H. WALDMAN, H. POPE, L. BRENT y K. BIGHOUSE (1978) Nature 274, 166.
162. J. SPRENT (1978) J. Exp. Med. 148, 1838.
163. J.F.A.P. MILLER, M.A. VADAS, A. WHITELAW y J. GAMBLE (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2486.
164. J.W. SCHRADER, B.A. CUNNINGHAM y G.M. EDELMAN (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 5066.

165. H. VON BOEHMER, W. HAAS y H. POHLIT (1978) J. Exp. Med.
148
166. H. VON BOEHMER, W. HAAS y N.K. JERNE (1978) Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 75, 2439.
167. N.K. JERNE (1971) Eur. J. Immunol. 1, 1.
168. M. NABHOLZ y M. MIGGIANO (1977) En: "T and B Cells in Im-
mune Recognition", Ed. F. Loor y G. Roelants.
169. B. BENACERRAF (1974) Ann. Pasteur Inst. 125, 143.
170. B. BENACERRAF y D.H. KATZ (1975) Adv. Cancer Research 21,
121.
171. J.A. BERZOFSKY, A.N. SCHECTER, G.M. SHEARER y D.H. SACHS
(1977) J. Exp. Med. 145, 111.
172. R.D. GORDON y E. SIMPSON (1977) Transp. Proc. 9
173. F.L. OWEN, S.T. JU, y A. NISONOFF (1977) J. Exp. Med.
145, 1559.
174. R. WOODLAND y H. CANTOR (1978) Eur. J. Immunol. 8, 600.
175. D. HETZELBERGER y K. EICHMAN (1978) Eur. J. Immunol. 8,
846.
176. K. EICHMAN, I. FALK y K. RAJEWSKY (1978) Eur. J. Immunol.
8, 853.
177. L.J. GUILBERT y N.N. ISCOVE (1976) Nature 263, 594.
178. N.N. ISCOVE y F. MELCHERS (1978) J. Exp. Med. 147, 923.
179. M.H. JULIUS, E. SIMPSON y L.A. HERZENBERG (1973) Eur. J.
Immunol. 3, 465.
180. J.A. LY y R.I. MISHELL (1974) J. Immunol. Meth. 5, 239.
181. G. LANDGREN, C.F. ZUKOSKI y G. MOLLER (1968) Clin. Exp.
Immunol. 3. 817.

182. R.G. MILLER y R.A. PHILLIPS (1969) J. Cell. Physiol. 73, 191.
183. K. KURNING y H. WIGZELL (1978) En: "Abstracts 12th Leucocyte Culture Conference"
184. C. GUTIERREZ, R.R. BERNABE, J. VEGA y M. KREISLER (1979) Sometido para publicación.
185. J. SPRENT (1973) Cell. Immunol. 7, 10.
186. J. SPRENT, J.F.A.P. MILLER y G.F. MITCHEL (1971) Cell. Immunol. 2, 171.
187. K.U. HARTMAN (1971) J. Exp. Med. 133, 1325.
188. R. MISHELL y R.W. DUTTON (1967) J. Exp. Med. 120, 423.
189. M.B. RITTENBERG y K.L. PRATT (1969) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 575.
190. V.I. PASANEN y O. MAKELA (1969) Immunology 16, 399.
191. E. GRONOWICZ, A. COUTINHO y F. MELCHERS (1976) Eur. J. Immunol. 6, 558.
192. E.A. KABAT (1976) En: "Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry"
193. J. ANDERSSON, A. COUTINHO, W. LERNHARDT y F. MELCHERS (1977) Cell 10, 27.
194. K. RAJEWSKY y K. EICHMAN (1977) Contemporary Topics in Immunobiology 7, 69.
195. C.A. JANEWAY, N. SAKATO y H.N. EISEN (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2357.
196. C.A. JANEWAY, R.A. MURGITA, F.C. WEINBOUN, P. ASOFSKY y H.

- WIGZELL (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4582.
197. S.F. SULLMAN y A. FEINSTEIN (1977) Eur. J. Immunol. 7, 421..
198. H. WALDMAN, I. LEFKOVITS y A. FEINSTEIN (1976) Immunol. 31, 353.
199. N.K. JERNE (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 133.
200. M. FELDMAN (1972) J. Exp. Med. 136, 737.
201. C.W. PIERCE y J.A. KAPP (1976) Contemp. Top, Immunobiol. 5, 91.
202. J. ANDERSSON, A. COUTINHO y F. MELCHERS (1978) J. Exp. Med. 148,
203. S. GILLIS y K.A. SMITH (1977) Nature 268, 154.
204. S. GILLIS, M.M. FERM, W. OU y K.A. SMITH (1978) J. Immunol. 120, 2027.
205. J.M. ALVAREZ, M.O. LANDAZURI, G. BONNARD y R. HERBERMAN (1978) J. Immunol. 121, 1270.
206. J. KLEIN (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41,
207. G. MULLER, L. HUBNER, A. SCHIMPL y E. WECKER (1978) Immunochem. 15
208. R.R. BERNABE, C. MARTINEZ ALONSO, E.L. LARSSON y A. COUTINHO (1979) Sometido para publicación.
209. N.K. JERNE (1967) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32 591.
210. J. ANDERSSON, A. COUTINHO y F. MELCHERS (1979) En: "Lymphocyte Differentiation" Ed. B. Pernis, en prensa.

211. G. MOLLER (1978) Ed. Immunol. Rev. 40.
212. C.A. JANEWAY, N. SAKATO y H.N. EISEN (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2357.
213. F.L. OWEN, S.T. JU y A. NISSONOFF (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2084.
214. M. HOFFMAN y R.W. DUTTON (1971) Science 172, 1047.
215. G. MOLLER, H. LENKE y H. OPITZ (1976) Scand. J. Immunol. 5, 269.
216. E.R. UNANUE, J.M. KIELY y J. CALDERON (1976) J. Exp. Med. 144, 155.
217. A. COUTINHO y G. MOLLER (1974) Scand. J. Immunol. 3, 133.
218. A. COUTINHO y G. MOLLER (1975) Advanc. Immunol. 21, 213.
219. P. MARRACK, L. HARWELL, J.W. KAPPLER, D. KAWAHARA, J.E. SWIERKOWZ (1979) En: "Recent Developments in Immunological Tolerance in Macrophage Function" Ed. P. Baram, C.W. Pierce y J.R. Battista, en prensa.